

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ НЕГАТИВНОГО ВЛИЯНИЯ СВИНЦОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ИХ МОДИФИКАЦИЯ РЕГУЛЯТОРАМИ ЭКСПРЕССИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Дзугкоев С.Г.¹, Дзугкоева Ф.С.¹, Маргиева О.И.¹, Алборова О.П.², Хубулова А.Е.¹

¹Институт биомедицинских исследований – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», Владикавказ, e-mail: patbiochem@mail.ru;

²Гемотест, Владикавказ

Целью данного исследования было изучение механизмов модификации эффектов свинцовой интоксикации под влиянием регуляторов экспрессии eNOS в эксперименте у крыс. В эксперименте были использованы линейные крысы-самцы одного возраста: интактные и со свинцовой интоксикацией (120 голов). Дизайн исследования: группа 1 – контроль; группа 2 – интоксикация раствором ацетата свинца; группа 3 – ацетат свинца + L-нитроаргинин метиловый эфир; группа 4 – ацетат свинца + L-аргинин. В исследовании проводилось изучение состояния про- и антиоксидантной системы, продукции стабильных метаболитов оксида азота (NO_x), обмена холестерина, уровня экспрессии NO-синтазы (eNOS) в эндотелии сосудов и активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы слоев почечной ткани, а также в печени. Результаты подвергались статистической обработке. Сатурнизм вызвал развитие окислительного стресса, снижение содержания NO_x в плазме крови, нарушение биодоступности L-аргинина для eNOS и дисфункцию эндотелия. Показателями нарушения функции почек были данные активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы и содержание МДА. О повреждении гепатоцитов свидетельствовало изменение активности органоспецифических ферментов в крови и Na⁺/K⁺-АТФ-азы. L-аргинин проявлял антиоксидантные свойства, повышал содержание NO_x и уровень экспрессии eNOS. Ингибитор eNOS – L-нитроаргинин метиловый эфир показал противоположные L-аргинуину эффекты. Биохимическими маркерами повреждения клеток почек и печени при сатурнизме являются показатели окислительного стресса, дефицит NO_x и нарушение гемодинамики в них. В этих механизмах участвовали фармакологические вещества: ингибитор eNOS – L-нитроаргинин метиловый эфир, вызывавший снижение уровня экспрессии энзима, и индуктор eNOS - L-аргинин, повысивший степень выраженности этого показателя. В механизмах токсичности свинца участвовало нарушение обмена холестерина, способствующее сниженной доступности L-аргинина для eNOS и продукции NO_x. Следовательно, L-аргинин можно рекомендовать как регулятор окислительного стресса и NO-продуцирующей функции эндотелия и при других патологиях.

Ключевые слова: уксуснокислые соли свинца, перекисное окисление липидов, ферменты адаптивной системы, конечные метаболиты оксида азота, эндотелиальная дисфункция, аргинин, L-NAME, функция почек.

ANALYSIS OF THE MECHANISMS OF THE NEGATIVE INFLUENCE OF LEAD INTOXICATION AND THEIR MODIFICATION BY EXPRESSION REGULATORS OF ENDOTHELIAL NO-SYNTASE IN THE EXPERIMENT

Dzugkoev S.G.¹, Dzugkoeva F.S.¹, Margieva O.I.¹, Alborova O.P.², Khubulova A.E.¹

¹Institute for Biomedical Research – branch of the Federal State Budgetary Institution of Science of the Federal Scientific Center «Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences», Vladikavkaz, e-mail: patbiochem@mail.ru;

²Hemotest, Vladikavkaz

The aim of this study was to study the mechanisms of modification of the effects of lead intoxication under the influence of eNOS expression regulators in an experiment in rats. In the experiment, linear male rats of the same age were used: intact and with lead intoxication (120 heads). Study design: group 1 – control; group 2 – intoxication with a solution of lead acetate; group 3 – lead acetate + L-nitroarginine methyl ester; group 4 – lead acetate + L-arginine. The study examined the state of the pro- and antioxidant system, the production of stable nitric oxide (NO_x) metabolites, cholesterol metabolism, the expression level of NO-synthase (eNOS) in the vascular endothelium, and the activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the layers of the renal tissue, as well as in the liver. The results were subjected to statistical processing. Saturnism caused the development of oxidative stress, a decrease in the content of NO_x in blood plasma, a violation of the bioavailability of L-arginine for eNOS, and endothelial dysfunction. Indicators of impaired renal function were Na⁺/K⁺-ATPase activity data and MDA content. Damage to hepatocytes was evidenced by changes in the activity of organ-specific enzymes in the blood

and Na⁺/K⁺-ATPase. L-arginine exhibited antioxidant properties, increased the content of NO_x and the level of eNOS expression. The eNOS inhibitor L-nitroarginine methyl ester showed the opposite effects of L-arginine. Biochemical markers of damage to kidney and liver cells during saturnism are indicators of oxidative stress, NO_x deficiency and hemodynamic disturbances in them. These mechanisms involved pharmacological substances: an eNOS inhibitor, L-nitroarginine methyl ester, which caused a decrease in the expression level of the enzyme, and an eNOS inducer, L-arginine, which increased the severity of this indicator. The mechanisms of lead toxicity have been implicated in impaired cholesterol metabolism, contributing to reduced availability of L-arginine for eNOS and NO_x production. Therefore, the use of L-arginine can be recommended as a regulator of oxidative stress and NO-producing endothelial function in other pathologies.

Keywords: lead acetate salts, lipid peroxidation, enzymes of the adaptive system, end nitric oxide metabolites, endothelial dysfunction, arginine, L-NAME, kidney function.

Внимание отечественных и зарубежных ученых к исследованию механизмов токсичности химических факторов окружающей среды на показатели здоровья человека не ослабевает. Доминируют среди ксенобиотиков соли тяжелых металлов в виде различных соединений. С учетом производственных выбросов, а также загрязнения внешней среды транспортными средствами содержание солей тяжелых металлов в экосистеме часто, по данным Роспотребнадзора России, превышает уровень ПДК. Наиболее токсичными среди химических загрязнителей считаются свинец и его соли, которые вызывают многообразие изменений, по мнению ВОЗ. Систематизация и анализ данных являются определяющим фактором приоритетности изучения механизмов их влияния [1–3]. Анализируя эффекты действия соединения свинца на животных и человека, следует отметить факторы риска: загрязнение окружающей среды, стойкость, их способность аккумулироваться в биологических средах и, соответственно, достаточно высокая аккумуляция в живом организме [4–6]. Вызывая гипоксию, ацетат свинца индуцирует развитие процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) и нарушение продукции конечных метаболитов оксида азота NO_x как основного вазодилататора. Оксидативный стресс сопровождается развитием дисфункции эндотелия и повышением тонуса сосудов – вазоконстрикцией и гипертензией. Одновременно в условиях окислительного стресса происходит повреждение клеток внутренних органов, в частности почек и печени [7–9]. Важная роль при токсическом поражении почек отводится Na⁺/K⁺-АТФ-азе как компоненту натриевого насоса, определяющей реабсорбцию натрия в канальцах почек [10].

Однако на основании существующих данных можно отметить, что совокупные исследования по изучению роли про- и антиоксидантных систем в развитии дисфункции эндотелия и патологии почек и печени, а также эффективности фармакологических препаратов, регулирующих метаболизм оксида азота при свинцовой интоксикации, недостаточно представлены в доступной литературе. Вышеизложенное явилось мотивацией для проведения данного научного исследования.

Цель исследования – изучение механизмов развития токсических эффектов свинцовой интоксикации и их изменения фармакологическими веществами, выполняющими роль регуляторов экспрессии eNOS, в эксперименте у крыс.

Материалы и методы исследования. В исследовании использованы линейные крысы-самцы одной возрастной категории (10–14 месяцев), массой 200–280 г: интактные – контрольные (20 крыс) и на фоне систематического введения раствора уксуснокислой соли свинца (5 мг/кг массы животного парентерально 30 дней, 60 крыс). Интактным животным (20 крыс) и крысам с экспозицией ацетатом свинца производили инъекции фармакологических веществ: аминокислоты L-аргинин (10 мг/кг, Ajinomoto, Япония) и L-NAME (25 мг/кг, «Сигма Олдридж», США). Дизайн исследования: 1-я группа – интактные крысы – контрольная (20 крыс); 2-я опытная группа – 20 крыс с систематической интоксикацией, вызванной парентеральной инъекцией раствора ацетата свинца (5 мг/кг массы тела животного); 3-я группа – 20 крыс с экспозицией ацетатом свинца и L-NAME; 4-я группа – 20 крыс с интоксикацией ацетатом свинца + L-аргинин. Опыты проводили в соответствии с требованиями международных организаций по работе с животными в эксперименте и протоколом № 6 от 26.12.2018 г. этического Комитета ИБМИ.

Эксперимент заканчивался у контрольных и опытных крыс забором крови под рауш-наркозом в пробирки с цитратом натрия с последующим центрифугированием для получения плазмы. Эритроцитарную массу, дважды промытую физиологическим раствором, подвергали лизису. При температуре +4°C гомогенизировали извлеченные образцы тканей почек и печени. По данным содержания малонового диальдегида (МДА) определяли концентрацию конечного продукта ПОЛ в гемолизате эритроцитов, в гомогенатах почечной и печеночной тканей по колориметрическому методу Т. Asacawa с тиобарбитуровой кислотой. Оценивали состояние антиоксидантной системы (АОС) организма по активности ее ферментов – каталазы в плазме крови по спектрофотометрическому методу М.А. Королюка (1988) и супероксиддисмутазы (СОД) в гемолизате эритроцитов методом окисления адреналина (Т.В. Сирота, 1999), концентрации феррооксидазы – церулоплазмينا (ЦП). Определяли обмен холестерина (ХС) по данным общего ХС (ОХС), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и триглицеридов (ТАГ) в плазме крови наборами («Витал», Россия). Активность специфических для органов ферментов: трансаминаз – аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ), мембранного гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) и экскреторного энзима – щелочной фосфатазы (ЩФ) – в плазме крови определяли, также используя наборы фирмы «Витал». Конечные метаболиты оксида азота (NO_x) в плазме крови исследовали, применяя метод В.А. Метельской (цит. по С.Г. Дзугкоеву) [11].

В эндотелии аорты у подопытных животных всех групп методом вестерн-блотинга исследовали уровень воспроизводства эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) на базе биохимической лаборатории ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» МЗ России. Активность АТФ-азы, активируемой Na и K, изучали в гомогенатах коркового и мозгового слоев почек, а также печени методом J.C. Scow (1957). Рассчитывали показатель активности на 1 мг белка в час (мкмоль Pн/мг белка/ч, где Pн – неорганический фосфор).

Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel. В соответствии с критерием Шапиро–Уилка полученные данные имели нормальное распределение, поэтому в дальнейшем применяли параметрический метод статистики. Данные были представлены в виде среднего значения (M) и ошибки среднего ($\pm m$). Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента, различие между группами считали статистически значимым при уровне $p < 0,05$. Коэффициенты корреляции определяли по Пирсону.

Результаты исследования и их обсуждение. Экспозиция свинцом биологических систем, включая целостный организм животных и человека, способствует развитию анемии, которая в дальнейшем приводит к гипоксии тканей. В этих условиях возникает дефицит кислорода и его превращение в активные радикалы кислорода (АРК), которые интенсифицируют процесс ПОЛ. Несмотря на присутствие свободнорадикального окисления (СРО) в клетках, в физиологических условиях для обеспечения их нормальной жизнедеятельности активация ПОЛ может стать причиной неблагоприятных проявлений и патологических процессов. При анализе литературных данных учитывали, что тема изучена недостаточно и, как следствие, представлены незначительные сведения о токсических эффектах свинца: активации СРО в крови и клетках внутренних органах, его взаимосвязи с другими процессами метаболизма, включая регуляцию продукции NO, активность эндотелиальной NO-синтазы и участие в этих процессах влияния регуляторов воспроизводства eNOS – L-аргинина и его модифицированного производного – L-NAME. При анализе определенного в результате исследования характера изменений про- и антиокислительной системы на фоне экспозиции ацетатом свинца по данным статистически значимого увеличения концентрации МДА в эритроцитах в клетках почечной и печеночной тканей выявлена интенсификация липопероксидации (табл. 1). АОС организма находится во взаимодействии с процессами СРО. Состояние АОС оценивали по активности СОД, каталазы и концентрации ЦП. Результаты исследования свидетельствуют о нарушении однонаправленности изменения активности ферментов АОС: об уменьшении функциональной активности СОД и, наоборот, о возрастании уровня каталазы и ЦП (табл.

1). Неоднозначность изменения активности ферментов обусловлена различием их молекулярной структуры. Следует отметить, что каталаза оказывается более оберегаемой, чем СОД, так как в ее молекуле присутствуют четыре молекулы гема и 4 НАДФН (никотинамидадениндинуклеотидфосфат).

Как правило, ксенобиотики подвергаются окислению в микросомах паренхиматозной клетки печени, при этом происходят их обеззараживание и выделение с мочой. Анализ результатов исследования позволил отметить, что АРК при интоксикации ацетатом свинца запускают развитие системного оксидативного стресса и одновременно снижение концентрации в плазме крови NO_x (табл. 1).

Таблица 1

Влияние регуляторов экспрессии eNOS на характер изменений показателей окислительного стресса и липидного обмена при сатурнизме в эксперименте

Показатели	Единицы измерения	Контроль	Ацетат свинца	Ацетат свинца + L-NAME	Ацетат свинца + L-аргинин
МДА, эритроциты	нмоль/мл	4,74±0,16	6,32±0,015 ^a	6,59±0,03 ^{б,в}	6,05±0,01 ^{г,д}
МДА, корковое вещество	нмоль /мг белка	3,18±0,22	5,54±0,02 ^a	5,67±0,02 ^{б,в}	3,40±0,01 ^{г,д}
МДА, мозговое вещество	нмоль /мг белка	4,25±0,059	5,33±0,009 ^a	5,48±0,015 ^{б,в}	5,19±0,009 ^{г,д}
МДА, гепатоцит	нмоль /мг белка	1,73±0,05	3,36±0,007 ^a	3,52±0,013 ^{б,в}	3,21±0,01 ^{г,д}
СОД	усл.ед.	88,05±0,07	54,94±0,081 ^a	51,97±0,318 ^{б,в}	57,18±0,38 ^{г,д}
Каталаза	мкат/л	225,56±29,09	382,36±0,31 ^a	395,41±3,01 ^{б,в}	370,17±3,12 ^{г,д}
ЦП	мг/л	339,14±6,59	432,29±1,14 ^a	448,6±3,18 ^{б,в}	416,3±3,71 ^{г,д}
NO_x	мкмоль	50,95±0,65	29,38±0,029 ^a	27,33±0,32 ^{б,в}	31,07±0,29 ^{г,д}
ОХС	ммоль/л	1,88±0,03	4,67±0,009 ^a	5,02±0,014 ^{б,в}	4,32±0,009 ^{г,д}
ХС ЛПНП	ммоль/л	1,09±0,01	4,15±0,02 ^a	4,54±0,005 ^{б,в}	3,77±0,015 ^{г,д}
ХС ЛПВП	ммоль/л	0,673±0,01	0,27±0,006 ^a	0,205±0,009 ^{б,в}	0,31±0,001 ^{г,д}
ТАГ	ммоль/л	0,246±0,011	0,55±0,009 ^a	0,61±0,007 ^{б,в}	0,49±0,007 ^{г,д}

Примечание:

^a – $p < 0,001$ – достоверность ацетата свинца относительно контроля; ^б – $p < 0,001$ – достоверность ацетата свинца + L-NAME относительно контроля; ^в – $p < 0,001$ – достоверность ацетата свинца + L-NAME относительно ацетата свинца; ^г – $p < 0,001$ – достоверность ацетата свинца + L-аргинин относительно ацетата свинца, ^д – $p < 0,001$ – достоверность ацетата свинца + L-аргинин относительно ацетата свинца+ L-NAME.

Корреляционный анализ взаимосвязи между возрастанием концентрации МДА в крови и убыванием уровня NO_x демонстрирует наличие отрицательной сильной связи между этими субстратами ($r = -0,69$, $p < 0,001$). Причем можно отметить, что большое значение имеет нарушение сигнального пути L-аргинин-NO-синтаза-NO. Образующиеся конечные метаболиты NO_x играют решающую роль в осуществлении вазодилаторного действия NO.

В этом плане нами изучались действие L-аргинина и L-NAME на активность ПОЛ, содержание его метаболитов, а также продукцию NO_x и экспрессию eNOS. В исследовании, проведенном нами, показана роль увеличенной концентрации МДА в клетках крови и нарушении продукции NO_x . Помимо этих изменений, показано нарушение паренхиматозных клеток печени. Для установления причины недостаточного образования NO_x исследовали уровень экспрессии eNOS. Данные показали, что L-NAME вызвал активацию процесса ПОЛ, снижение уровня NO_x вследствие ингибирования функциональной активности eNOS на 23,9%, в противоположность этому L-аргинин повысил данный показатель на 29,05% (табл. 1). Нормализуя про- и антиоксидантную систему, L-аргинин вызвал возрастание продукции и содержание NO_x как основных вазодилататоров.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют об участии аминокислоты L-аргинина и его модифицируемого производного – L-NAME в управлении степени воспроизводства эндотелиальной NO-синтазы.

Свою вспомогательную роль в нарушении биодоступности L-аргинина к NO-синтазе играет нарушение в метаболизме холестерина: повышение уровня ОХС и атерогенных β -липопротеинов (табл. 1). Полученные результаты при интоксикации ацетатом свинца показали рост в сыворотке крови содержания ОХС, ХС ЛПНП и снижение ХС ЛПВП (табл. 1). Дефицит NO_x сопровождается гемодинамическими изменениями, в частности в нефроне, и угнетением активности АТФ-азы, активируемой Na и K в обоих слоях почек, при интоксикации ацетатом свинца и его комбинации с L-NAME (рис. 1).

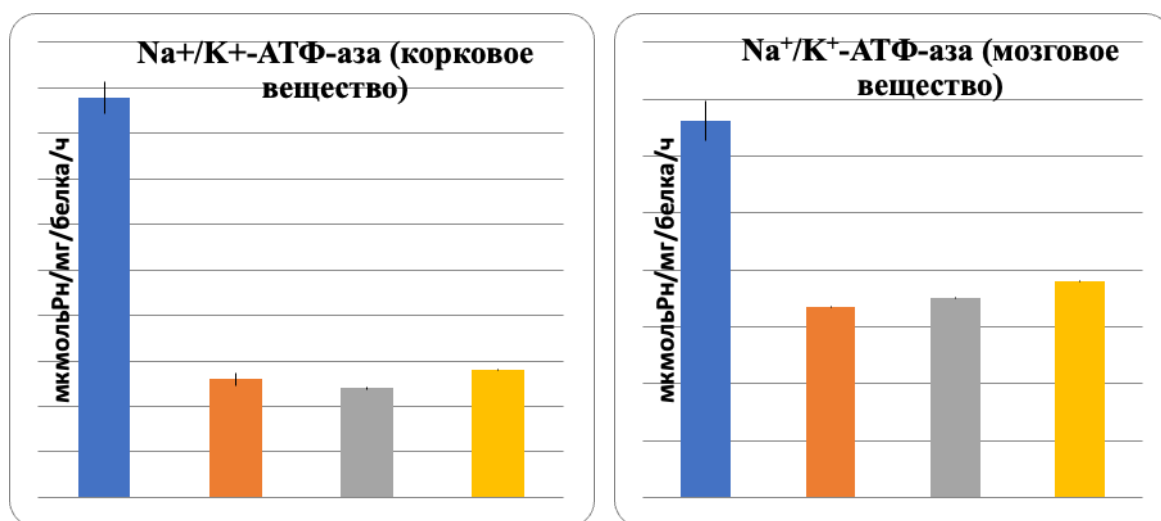


Рис. 1. Характер изменений активности Na^+/K^+ -АТФ-азы при сатурнизме под влиянием регуляторов экспрессии eNOS

Данные показали повреждение паренхимы печени при интоксикации свинцом и в комплексе с L-NAME. Показаны увеличение в них уровня МДА и понижение активности

Na⁺/K⁺-АТФ-азы. Показателем нарушения функции паренхиматозных клеток печени являются изменения уровня органоспецифических ферментов в плазме крови: АлАТ, АсАТ, ГГТП и щелочной фосфатазы (рис. 1, 2). На фоне введения L-аргинина подопытным животным произошли снижение интенсивности ПОЛ в клетках почечной и печеночной тканей и, наоборот, возрастание активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы в них (рис. 1). Показателем позитивного влияния L-аргинина является снижение в плазме крови уровня активности ферментов, специфических для органов: АлАТ, АсАТ, ГГТП и ЩФ (рис. 2).

Таким образом, метаболическими показателями нарушения гидрофобности паренхиматозных клеток печени являются повышение их проницаемости по данным уровня активности органоспецифических ферментов плазмы крови и изменения активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы в паренхиматозных клетках печени.

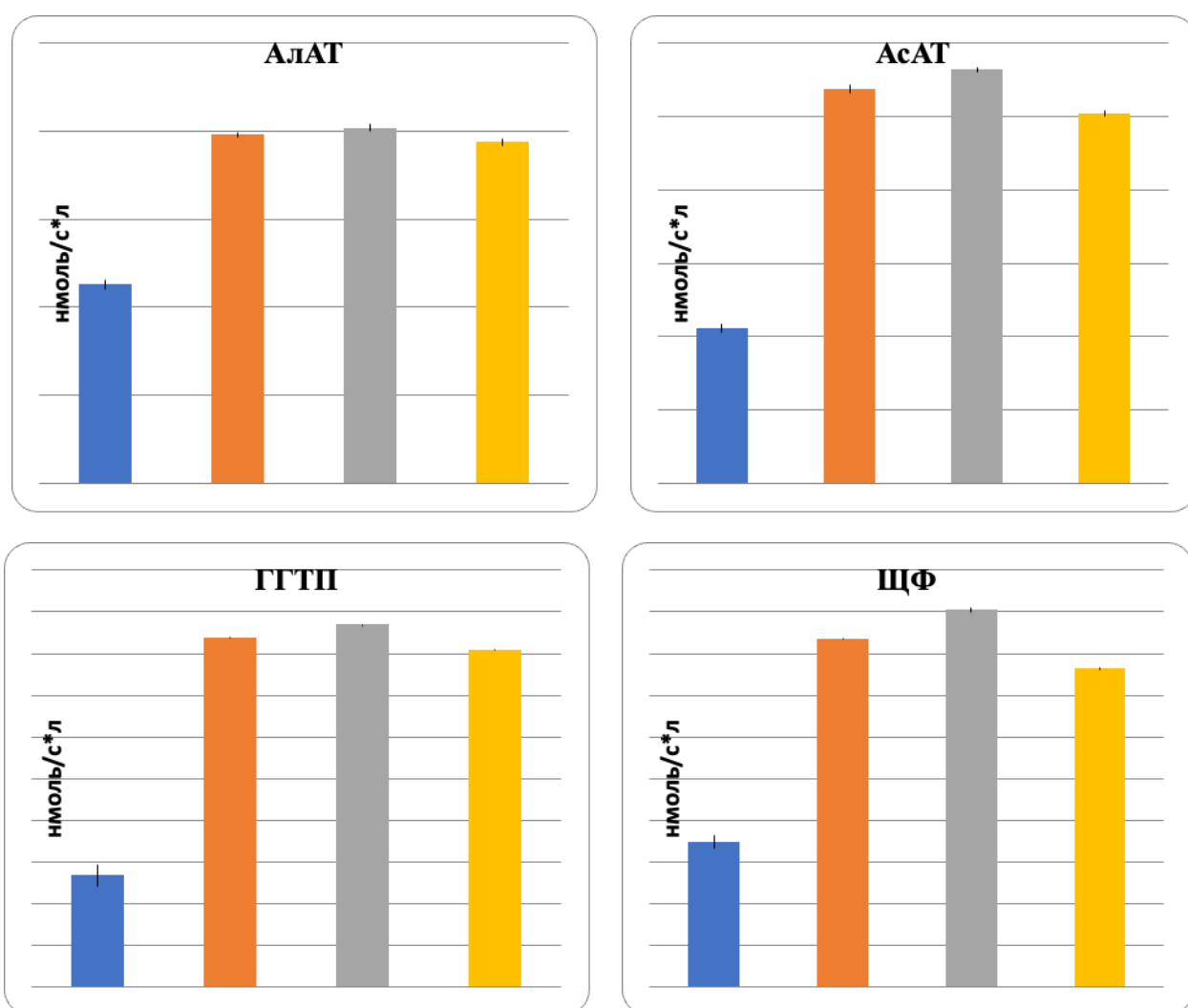


Рис. 2. Характер изменений активности органоспецифических ферментов под влиянием регуляторов экспрессии eNOS

Обсуждая эти результаты, можно утверждать, что свинцовая интоксикация вызывает активацию липопероксидации и дефицит NO_x вследствие более низкого уровня воспроизводства eNOS. Эти биохимические изменения лежат в основе механизмов нарушения функционального состояния эндотелия сосудов и микроциркуляции – основных патогенетических звеньев нефропатии и гепатопатии при сатурнизме.

Заключение. На фоне экспозиции ацетатом свинца выявлено повышение активности СРО в эритроцитах, в гомогенатах клеток коркового и мозгового слоев почечной ткани и гепатоците. Оксидативный стресс характеризуется сниженным уровнем в плазме крови NO_x вследствие пониженного уровня экспрессии NO-синтазы при свинцовой интоксикации и ее комбинации с L-NAME. Исследование влияния индуктора экспрессии eNOS – L-аргинина показало его стимулирующий эффект на процесс образования синтазы оксида азота и повышение содержания NO_x, тогда как L-NAME ингибировал уровень экспрессии eNOS. Нормализация метаболизма NO, гемодинамики и обмена холестерина способствовала улучшению функции почек и печени, о чем свидетельствуют данные активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы и уровня трансаминаз, мембранных и экскреторных ферментов в сыворотке крови при свинцовой интоксикации.

Список литературы

1. Boskabady M., Marefati N., Farkhondeh T., Farzaneh Sh., Farshbaf A., Boskabady M.H. The effect of environmental lead exposure on human health and the contribution of inflammatory mechanisms, a review // *Environment International*. 2018. Vol. 120. P. 404-420. DOI: 10.1016/j.envint.2018.08.013.
2. Levin S.M., Goldberg M. Clinical evaluation and management of lead-exposed construction workers // *American Journal of Industrial Medicine*. 2000. Vol. 37. no 1. P. 23-43. DOI: 10.1002/(sici)1097-0274(200001)37:1<23::aid-ajim4>3.0.co ;2-u.
3. de Souza I.D., de Andrade A.S., Dalmolin R.J.S. Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning // *Critical Reviews in Toxicology*. 2018. Vol. 48. no. 5. P. 375-386. DOI: 10.1080/10408444.2018.1429387.
4. Ericson B., Gabelaia L., Keith J., Kashibadze T., Beraia N., Sturua L., Kazzi Z. Elevated Levels of Lead (Pb) Identified in Georgian Spices // *Annals of Global Health*. 2020. Vol. 86. no.1. P. 124.
5. Mani M.S., Kabekkodu S.P., Joshi M.B., Dsouza H.S. Ecogenetics of lead toxicity and its influence on risk assessment // *Human & Experimental Toxicology*. 2019. Vol. 38. no. 9. P. 1031-1059.

6. Obeng-Gyasi E. Sources of lead exposure in various countries // *Reviews on Environmental Health*. 2019. Vol. 34. no. 1. P. 25-34. DOI: 10.1515/reveh-2018-0037.
7. Wronska-Nofer T., Pisarska A., Trzcinka-Ochocka M., Halatek T., Stetkiewicz J., Braziewicz J., Nofer J.R., Wasowicz W. Scintigraphic assessment of renal function in steel plant workers occupationally exposed to lead // *Journal of Occupational Health Psychology*. 2015. Vol. 57. no. 2. P. 91-99.
8. Alwaleedi S.A. Haemato-biochemical changes induced by lead intoxication in male and female albino mice // *International Journal of Recent Scientific Research*. 2015. Vol. 6. no 5. P. 3999-4004.
9. López-Vanegas N.C., Hernández G., Maldonado-Vega M., Calderón-Salinas J.V. Leukocyte apoptosis, TNF- α concentration and oxidative damage in lead-exposed workers // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2020. Vol. 15. no. 391. P. 114901. DOI:10.1016/j.taap.2020.114901.
10. Omobowale T.O., Oyagbemi A.A., Akinrinde A.S., Saba A.B., Daramola O.T., Ogunpolu B.S., Olopade J.O. Failure of recovery from lead induced hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defence system in Wistar rats // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014. Vol. 37. no. 3. P. 1202-1211.
11. Дзугкоев С.Г., Дзугкоева Ф.С., Маргиева О.И., Можаяева И.В. Коррекция эндотелиальной дисфункции при никелевой интоксикации ингибиторами экспрессии eNOS и аргиназы в эксперименте // *Современные проблемы науки и образования*. 2018. № 4. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27787> (дата обращения: 17.07.2023). DOI: 10.17513/spno.27787.