

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЕЛЕНИТА НАТРИЯ С СЕРОСОДЕРЖАЩИМИ ВОССТАНОВИТЕЛЯМИ

П.А. Молодцов, С.В. Макаров, И.А. Деревеньков, А.С. Макарова

Павел Алексеевич Молодцов*, Сергей Васильевич Макаров, Илья Александрович Деревеньков, Анна Сергеевна Макарова

Кафедра технологии пищевых продуктов и биотехнологии, Ивановский государственный химико-технологический университет, пр. Шереметевский, 7, Иваново, Российская Федерация, 153000

E-mail: tyrtere1995@gmail.com*

Изучено влияние белков – бычьего сывороточного альбумина (БСА) и трипсина из поджелудочной железы свиньи – на взаимодействие селенита натрия с гидроксиметансульфинатом (ГМС) натрия и диоксидом тиомочевин (ДОТМ) в водных растворах различной кислотности. Установлено, что в присутствии трипсина и особенно бычьего сывороточного альбумина количество наноселена с малыми размерами частиц (около 100 нм), образующееся при взаимодействии селенита и ГМС в нейтральных и слабокислых средах, значительно больше, чем в отсутствие белков, а селен с размерами частиц более 150 нм практически отсутствует; наблюдается также уменьшение индукционного периода при образовании селена – этот эффект обусловлен наличием в белках цистиновых фрагментов, образующих при взаимодействии с ГМС цистеин, восстанавливающий селенит. Аналогичный эффект на индукционный период оказывают добавки цистина и особенно селеноцистина, не влияющие, однако, на размеры частиц образующегося наноселена. В щелочных средах гидроксиметансульфинат натрия не восстанавливает селенит, введение БСА не приводит к образованию селена. В этих средах селенит реагирует с диоксидом тиомочевин, однако введение бычьего сывороточного альбумина и трипсина не влияет на взаимодействие ДОТМ-селенит. Очевидно, влияние дополнительно образовавшегося цистеина на возникновение селена очень мало, т.к. диоксид тиомочевин является очень сильным восстановителем в щелочных средах и его взаимодействие с селенитом протекает с высокими скоростями. Реакция селенита с диоксидом тиомочевин в слабокислых и нейтральных растворах при комнатной температуре не протекает, добавление белков не приводит к образованию селена.

Ключевые слова: селен, белки, селенит, гидроксиметансульфинат натрия, диоксид тиомочевин

INFLUENCE OF PROTEINS ON THE INTERACTION BETWEEN SODIUM SELENITE AND SULFUR-CONTAINING REDUCTANTS

P.A. Molodtsov, S.V. Makarov, I.A. Dereven'kov, A.S. Makarova

Pavel A. Molodtsov*, Sergei V. Makarov, Ilya A. Dereven'kov, Anna S. Makarova

Department of Food Technology and Biotechnology, Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Sheremetevskiy ave., 7, Ivanovo, 153000, Russia

E-mail: tyrtere1995@gmail.com*

The influence of proteins – bovine serum albumin (BSA) and trypsin from porcine pancreas – on the interaction between sodium selenite and sodium hydroxymethanesulfinate (HMS) and thiourea dioxide (TDO) in aqueous solutions has been studied. It is shown that in the presence of trypsin and especially BSA the quantity of small-sized particles of nanoselenium (≈ 100 nm) formed in the course of reaction between selenite and HMS in neutral and weakly acidic solutions is significantly higher than in the absence of proteins, and large-sized particles (> 150 nm) do not form at all. The addition of proteins leads also to the decrease in induction period of selenium formation. This effect is due to the presence of cystine fragments in the proteins, which in reaction

with HMS form cysteine reducing selenite. Cystine and especially selenocystine have a similar effect. However, cystine and selenocystine do not influence the size of particles of nanoselenium. In alkaline solutions HMS does not react with selenite, the addition of BSA does not lead to the formation of selenium. Thiourea dioxide reduces selenite in alkaline solutions, but the addition of proteins has no effect on the interaction of TDO and selenite. Obviously, the influence of additionally formed cysteine is too small since thiourea dioxide itself reacts with selenite very fast in alkaline solutions. In neutral and weakly acidic solutions reaction of TDO with selenite does not proceed at room temperature, and the addition of proteins does not lead to the formation of selenium.

Key words: selenium, proteins, selenite, sodium hydroxymethanesulfinate, thiourea dioxide

Для цитирования:

Молодцов П.А., Макаров С.В., Деревеньков И.А., Макарова А.С. Влияние белков на взаимодействие селенита натрия с серосодержащими восстановителями. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2022. Т. 65. Вып. 4. С. 56–61

For citation:

Molodtsov P.A., Makarov S.V., Dereven'kov I.A., Makarova A.S. Influence of proteins on the interaction between sodium selenite and sulfur-containing reductants. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2022. V. 65. N 4. P. 56–61

ВВЕДЕНИЕ

Селен является незаменимым микроэлементом, необходимым для функционирования биологических систем [1]. Он существует в неорганических (селенат, селенит, селеноводород) и в органических формах (селеноцистеин, селенометионин, метанселениновая кислота и др.) [2]. Селен входит в состав таких ферментов, как глутатионпероксидаза, тиоредоксинредуктаза, йодтирониндейодидаза и т.д. [3].

В настоящее время актуальны исследования в области биохимии наноразмерного селена [4]. Наноселен обладает сравнительно низкой токсичностью и используется в качестве средства доставки биологически активных соединений [5]. Наноселен проявляет высокую антиоксидантную активность [6]. Для его получения широко используется восстановление селенита [7-11].

Ранее нами изучено взаимодействие селенита натрия с серосодержащими восстановителями – гидроксиметансульфинатом (ГМС) натрия и диоксидом тиомочевины (ДОТМ) в водных растворах различной кислотности [12]. Показано, что указанные реакции можно использовать для получения селена, причем размер частиц селена зависит от концентраций реагентов, их соотношения, pH, а также времени выдержки реакционной системы. Установлено, что в реакции с селенитом участвует продукт распада ГМС и ДОТМ – сульфокислотная кислота $S(OH)_2$ (сульфокислот SO_2H) [12]. Важным преимуществом гидроксиметансульфината натрия по сравнению с диоксидом тиомочевины является его способность восстанавливать селенит в слабых и нейтральных, т.е. физиологических, средах [12]. Следовательно, исследование

редокс процесса с его участием и влияния различных соединений на его скорость, состав и свойства продуктов будет способствовать лучшему пониманию механизмов восстановления селенита, использующегося в качестве кормовой добавки [13].

Известно, что существенное влияние на свойства продукта восстановления селенита – селена оказывают белки, в частности, бычий сывороточный альбумин (БСА), которые повышают стабильность их коллоидных растворов [14,15]. Значительно меньшее внимание уделяется, однако, влиянию белков на скорость образования селена. В настоящей работе изучено влияние бычьего сывороточного альбумина и трипсина из поджелудочной железы свиньи на образование селена при взаимодействии селенита натрия с гидроксиметансульфинатом натрия и диоксидом тиомочевины.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Селенит натрия, гидроксиметансульфинат натрия дигидрат, диоксид тиомочевины, L-цистин, селено-L-цистин, бычий сывороточный альбумин и трипсин из поджелудочной железы свиньи (Sigma-Aldrich) использовались без дополнительной очистки. Другие использованные в работе вещества имели марку «х.ч.». Для поддержания постоянного значения pH использовали ацетатный, фосфатный, карбонатный и тетраборатный буферные растворы. Значение pH раствора контролировали с помощью pH-метра Мультитест IPL-103 (SEMICO), снабженного комбинированным стеклянным электродом ЭСК-10601/7. Электронные спектры записывали на спектрофотометре Сору 50 в термостатируемых кварцевых кюветках толщиной 1 см. Все реакции изучали в анаэробных условиях в среде аргона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в электронных спектрах слабокислых и нейтральных водных растворов, содержащих селенит, ГМС и БСА, наблюдается рост оптической плотности во времени в диапазоне длин волн 210-550 нм (рис. 1), отсутствующий в спектрах растворов БСА-ГМС и БСА-селенит. Образуется продукт желтого цвета; этот цвет не изменяется в течение нескольких суток. В отсутствие БСА взаимодействие селенита с ГМС в слабокислых и нейтральных средах сопровождается изменением цвета раствора от желтого к оранжевому и bathochromным сдвигом максимума поглощения в электронном спектре [12] (аналогичные изменения цвета наблюдались при восстановлении селенита глюкозой в водных растворах [16]). Установлено, что указанные изменения обусловлены образованием селена [12].

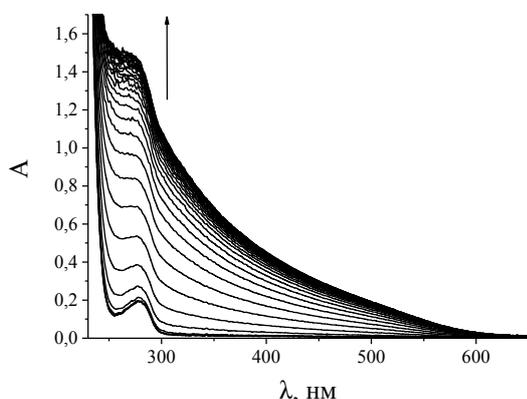


Рис. 1. Изменения электронных спектров при взаимодействии селенита и ГМС в присутствии БСА; $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]_0 = 3,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $[\text{ГМС}]_0 = 6,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л; $[\text{БСА}]_0 = 5,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л; pH 7,0; 25 °С, стрелкой показано направление изменения спектров во времени

Fig. 1. Spectral changes in the course of reaction of selenite and HMS in the presence of BSA; $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]_0 = 3.0 \cdot 10^{-3}$ M; $[\text{HMS}]_0 = 6.0 \cdot 10^{-4}$ M; $[\text{BSA}]_0 = 5.0 \cdot 10^{-6}$ M; pH 7.0; 25 °C, the arrow indicates the direction of spectral changes in time

Известно, что максимум поглощения наноселена зависит от размера его частиц – чем он больше, тем больше значение длины волны максимума поглощения. Так спектр с максимумом при 310-320 нм отвечает селену с диаметром частиц около 100 нм, а спектр с максимумом при 550 нм – селену, имеющему средний размер частиц около 150 нм [17]. В настоящей работе установлено, что в присутствии БСА количество образующегося наноселена с малыми размерами частиц (около 100 нм) значительно больше, чем в отсутствие белка, а селен с размерами частиц более 150 нм практически отсутствует (рис. 2, кр. 4). Влияние БСА на размеры частиц наноселена проявляется уже при концентрациях 10^{-6} моль/л.

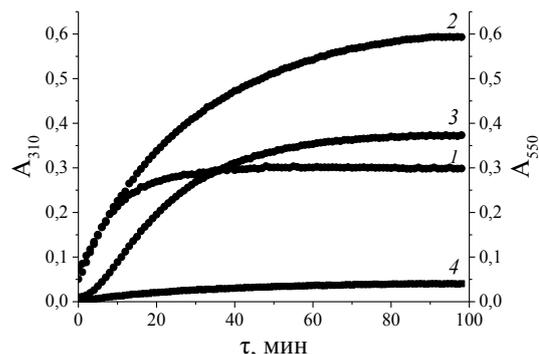
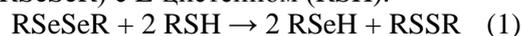
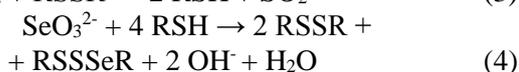


Рис. 2. Изменение A_{310} (кривые 1 и 2) и A_{550} (кривые 3 и 4) при взаимодействии селенита и ГМС в отсутствие (1,3) и в присутствии (2,4) БСА; $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]_0 = 3,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $[\text{ГМС}]_0 = 6,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л; $[\text{БСА}]_0 = 5,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л; pH 5,0; 25 °С
Fig. 2. Changes in A_{310} (curves 1 and 2) and A_{550} (curves 3 and 4) in the course of reaction of selenite and HMS in the absence (1,3) and in the presence (2,4) of BSA; $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]_0 = 3.0 \cdot 10^{-3}$ M; $[\text{HMS}]_0 = 6.0 \cdot 10^{-4}$ M; $[\text{BSA}]_0 = 5.0 \cdot 10^{-6}$ M; pH 5.0; 25 °C

При проведении реакции восстановления селенита гидроксиметансульфинатом в нейтральных средах в присутствии БСА наблюдается уменьшение индукционного периода образования селена (рис. 3). Очевидно, этот эффект связан с наличием в альбумине групп, способных восстанавливаться и образовывать соединение, взаимодействующее с селенитом; таковыми могут быть присутствующие в БСА цистинные фрагменты [18]. Были проведены опыты по восстановлению селенита гидроксиметансульфинатом в присутствии L-цистина и его селеносодержащего аналога – селено-L-цистина. Установлено, что введение L-цистина приводит к уменьшению индукционного периода (рис. 3, кр. 3). При проведении реакции в присутствии селено-L-цистина индукционный период практически отсутствует (рис. 3, кр. 4). Очевидно, образующийся при восстановлении селено-L-цистина селено-L-цистеин взаимодействует с селенитом с большей скоростью, чем L-цистеин. Действительно, ранее нами показано, что селено-L-цистин является эффективным катализатором процессов восстановления аквабаламина L-цистеином [19]. Реакция включает стадии образования селено-L-цистеина (RSeH) по реакции селено-L-цистина (RSeSeR) с L-цистеином (RSH):



и его взаимодействия с аквабаламином. Можно полагать, что уменьшение индукционного периода при образовании селена в присутствии БСА обусловлено восстановлением продуктом распада ГМС – сульфоксилатом (см. реакцию 2) фрагмента белка – L-цистина до L-цистеина (реакция 3) и взаимодействием последнего с селенитом с образованием селена (известно, что селен является продуктом реакции селенита с тиолами [19, 20]) (реакции 4, 5 [19]):



Таким образом, в настоящей работе показано, что цистеин (селеноцистеин)-содержащие белки способны восстанавливать селенит в нейтральных водных растворах.

Следует отметить, однако, что L-цистин и селено-L-цистин практически не влияют на количество образующегося при восстановлении селенита селена с размерами частиц около 100 нм (сравните кривые 1, 3 и 4 на рис. 3). По-видимому, указанные аминокислоты влияют только на скорость образования селена, но не влияют на агрегацию его частиц. Действительно, установлено, что, в отличие от БСА, L-цистин и селено-L-цистин слабо влияют на величину A_{550} на плато (рис. 4). Очевидно, основное влияние на стабилизацию короткомерного селена оказывают другие аминокислоты в составе бычьего сывороточного альбумина.

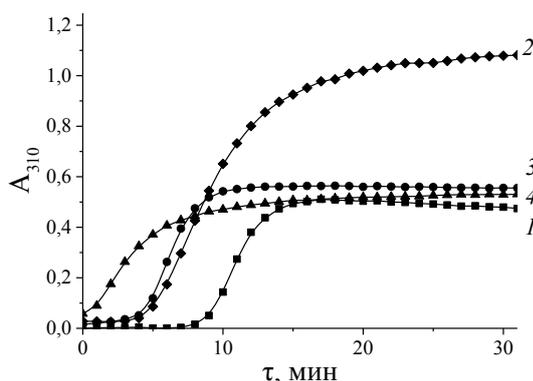


Рис. 3. Изменение A_{310} при взаимодействии селенита с ГМС в отсутствие добавок (1), в присутствии БСА (2), L-цистина (3) и селено-L-цистина (4); $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]_0 = 3,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $[\text{ГМС}]_0 = 6,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л; $[\text{БСА}]_0 = 5,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л; $[\text{L-Цистин}]_0 = [\text{Селено-L-цистин}]_0 = 1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л; pH 7,0; 25 °C

Fig. 3. Changes in A_{310} in the course of reaction of selenite with HMS (1), in the presence of BSA (2), L-cystine (3) and seleno-L-cystine (4); $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]_0 = 3.0 \cdot 10^{-3}$ M; $[\text{HMS}]_0 = 6.0 \cdot 10^{-4}$ M; $[\text{BSA}]_0 = 5.0 \cdot 10^{-6}$ M; $[\text{L-Cystine}]_0 = [\text{Seleno-L-cystine}]_0 = 1.0 \cdot 10^{-4}$ M; pH 7.0; 25 °C

Влияние трипсина на образование селена при восстановлении селенита гидроксиметансульфинатом в слабкокислых и нейтральных средах аналогично влиянию БСА – его введение приводит к уменьшению индукционного периода при образовании селена (молекула трипсина также содержит цистиновые фрагменты [21, 22]).

Однако БСА проявляет более выраженные стабилизирующие свойства. В его присутствии частицы селена сохраняют размеры в нанодиапазоне в течение нескольких суток (окраска раствора остается желтой) (pH 5-7), в то время как в присутствии трипсина наночастицы селена теряют устойчивость в течение 2-3 ч, оседая в виде красного осадка. Этот эффект особенно выражен в слабкокислых средах.

В щелочных средах гидроксиметансульфинат не восстанавливает селенит, введение бычьего сывороточного альбумина не приводит к образованию селена. Действительно, ранее показано [23], что в щелочных растворах реакция L-цистеина с селенитом протекает с меньшими скоростями, чем в нейтральных.

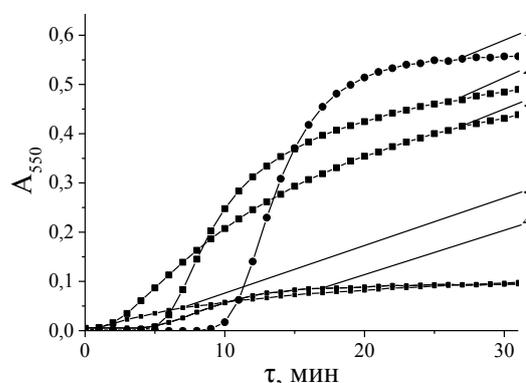


Рис. 4. Изменение A_{550} растворов селенит – ГМС (1), селенит – ГМС – L-цистин (2), селенит – ГМС – селено-L-цистин (3), селенит – ГМС – БСА (4), селенит – ГМС – БСА – селено-L-цистин (5) во времени; $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]_0 = 3,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $[\text{ГМС}]_0 = 6,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л; $[\text{L-цистин}]_0 = [\text{Селено-L-цистин}]_0 = 1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л; $[\text{БСА}]_0 = 5,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л; pH 7,0; 25 °C

Реакция селенита с диоксидом тиомочевин в слабкокислых и нейтральных растворах при комнатной температуре не протекает [12]. Установлено, что введение ДОТМ в нейтральные растворы БСА не сопровождается спектральными изменениями (известно, что ДОТМ не восстанавливает L-цистин в нейтральных средах [24]). В щелочных средах (pH > 8) ДОТМ восстанавливает селенит с образованием селена, однако введение БСА и трипсина не влияет на взаимодействие ДОТМ-селенит. Действительно, хотя ДОТМ восстанавливает L-цистин в щелочных средах [24], влияние дополнительно образовавшегося L-цистеина на возникновение селена очень мало, т.к. диоксид

тиомочевины является очень сильным восстановителем в щелочных растворах и его взаимодействие с селенитом протекает с высокими скоростями.

ВЫВОДЫ

Показано, что введение бычьего сывороточного альбумина и трипсина оказывает значительное влияние на кинетику образования и размер частиц селена, возникающего при восстановлении селенита натрия гидроксиметансульфинатом натрия. Бычий сывороточный альбумин является более эффективным стабилизатором наночастиц селена, чем трипсин. Введение белка приводит к сокращению индукционного периода образования селена в нейтральных и слабокислых средах.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, грант 20-33-90005.

Исследование проведено с использованием ресурсов Центра коллективного пользования научным оборудованием ИГХТУ (при поддержке Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2021-671).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project number 20-33-90005.

The study was carried out using the resources of the Center for Shared Use of Scientific Equipment of the ISUCT (with the support of the Ministry of Science and Higher Education of Russia, grant No. 075-15-2021-671).

The authors declare the absence a conflict of interest warranting disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. **Zhao M., Luo T., Zhao Z., Rong H., Zhao G., Lei L.** Food Chemistry of Selenium and Controversial Roles of Selenium in Affecting Blood Cholesterol Concentrations. *J. Agric. Food Chem.* 2021. V. 69. N 17. P. 4935-4945. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c00784.
2. **Cupp-Sutton K.A., Ashby M.T.** Biological Chemistry of Hydrogen Selenide. *Antioxidants.* 2016. V. 5. N 4. 42 p. DOI: 10.3390/antiox5040042.
3. **Avery J.C., Hoffmann P.R.** Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients.* 2018. V. 10. N 9. 1203 p. DOI: 10.3390/nu10091203.
4. **Dawood M.A.O., Basuini M.F.E., Yilmaz S., Abdel-Latif H.M.R., Kari Z.A., Abdul Razab M.K.A., Ahmed H.A., Alagawany M., Gewaily M.S.** Selenium Nanoparticles as a Natural Antioxidant and Metabolic Regulator in Aquaculture: A Review. *Antioxidants.* 2021. V. 10. N 9. 1364 p. DOI: 10.3390/antiox10091364.
5. **Khurana A., Tekula S., Saifi M.A., Venkatesh P., Godugu C.** Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomed. Pharmacother.* 2019. V. 111. P. 802-812. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.146.
6. **Полубояринов П.А., Елистратов Д.Г., Швец В.И.** Метаболизм и механизм токсичности селенсодержащих препаратов, используемых для коррекции дефицита микроэлемента селена. *Тонкие хим. технологии.* 2019. Т. 14. Вып. 1. С. 5-24. DOI: 10.32.362/2410-6593-2019-14-1-5-24.
7. **Poluboyarinov P.A., Elistratov D.G., Shvets V.I.** Metabolism and mechanism of toxicity of selenium-containing drugs used to correct deficiency of the microelement selenium. *Tonkie Khim. Tekhnol.* 2019. V. 14. N 1. P. 5-24 (in Russian). DOI: 10.32.362/2410-6593-2019-14-1-5-24.
8. **Liang L., Jiang X., Yang W., Huang Y., Guan X., Li L.** Kinetics of selenite reduction by zero-valent iron. *Desalin. Water Treat.* 2015. V. 53. P. 2540-2548. DOI: 10.1080/19443994.2013.862868.
9. **Pettine M., Gennari F., Campanella L.** The reaction of selenium (IV) with ascorbic acid: its relevance in aqueous and soil systems. *Chemosphere.* 2013. V. 90. N 2. P. 245-250. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.06.061.
10. **Dereven'kov I.A., Salnikov D.S., Makarov S.V.** Interaction between super-reduced cobalamin and selenite. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2017. V. 91. P. 2404-2408. DOI: 10.1134/S003602441711005X.
11. **Geoffroy N., Demopoulos G.P.** Reductive Precipitation of Elemental Selenium from Selenious Acidic Solutions Using Sodium Dithionite. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2009. V. 48. N 23. P. 10240-10246. DOI: 10.1021/ie9008502.
12. **Ball S., Milne J.** Studies on the interaction of selenite and selenium with sulfur donors. Part 3. Sulfite. *Can. J. Chem.* 1995. V. 73. N 5. P. 716-724. DOI: 10.1139/v95-091.
13. **Макаров С.В., Молодцов П.А., Деревеньков И.А., Найденко Е.В.** Взаимодействие селенита натрия с гидроксиметансульфинатом натрия и диоксидом тиомочевины в водных растворах. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2021. Т. 64. Вып. 11. С. 65-70. DOI: 10.6060/ivkkt.20216411.6442.
14. **Makarov S.V., Molodtsov P.A., Dereven'kov I.A., Naidenko E.V.** Interaction of sodium selenite with sodium hydroxymethanesulfinate and thiourea dioxide in aqueous solutions. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.].* 2021. V. 64. N 11. P. 65-70 (in Russian). DOI: 10.6060/ivkkt.20216411.6442.
15. **Falk M., Lebed P., Bernhoft A., Framstad T., Kristoffersen A.B., Salbu B., Oropeza-Moe M.** Effects of sodium selenite and L-selenomethionine on feed intake, clinically relevant blood parameters and selenium species in plasma, colostrum and milk from high-yielding sows. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2019. V. 52. P. 176-185. DOI: 10.1016/j.jtemb.2018.12.009.
16. **Jain R., Jordan N., Weiss S., Foerstendorf H., Heim K., Kacker R., Hübner R., Kramer H., van Hullebusch E.D., Farges F., Lens P.N.** Extracellular polymeric substances govern the surface charge of biogenic elemental selenium nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 2015. V. 49. N 3. P. 1713-1720. DOI: 10.1021/es5043063.
17. **Zhang J.S., Gao X.Y., Zhang L.D., Bao Y.P.** Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors.* 2001. V. 15. N 1. P. 27-38. DOI: 10.1002/biof.5520150103.
18. **Jiang F., Cai W., Tan G.** Facile Synthesis and Optical Properties of Small Selenium Nanocrystals and Nanorods. *Nanosc. Res. Lett.* 2017. V. 12. P. 401-406. DOI: 10.1186/s11671-017-2165-y.

17. **Lin Z.H., Wang C.R.C.** Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles. *Mat. Chem. Phys.* 2005. V. 92. N 2-3. P. 591-594. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2005.02.023.
 18. **Dereven'kov I.A., Hannibal L., Makarov S.V., Makarova A.S., Molodtsov P.A., Koifman O.I.** Characterization of the complex between native and reduced bovine serum albumin with aquacobalamin and evidence of dual tetrapyrrole binding. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2018. V. 23. N 5. P. 725-738. DOI: 10.1007/s00775-018-1562-8.
 19. **Dereven'kov I.A., Polyakova A.Yu., Makarov S.V.** Kinetic and mechanistic studies on reaction between aquacobalamin and selenocysteine. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017. V. 2017. N 36. P. 4174-4179. DOI: 10.1002/ejic.201700973.
 20. **Cui S.Y., Jin H., Kim S.J., Kumar A.P., Lee Y.I.** Interaction of Glutathione and Sodium Selenite *In vitro* Investigated by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Biochem.* 2008. V. 143. N 5. P. 685-693. DOI: 10.1093/jb/mvn023.
 21. **Kaur J., Singh P.K.** Trypsin Detection Strategies: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2020. P. 1-19. DOI: 10.1080/10408347.2020.1846490.
 22. **Hermodson M.A., Ericsson L.H., Neurath H., Walsh K.A.** Determination of the amino acid sequence of porcine trypsin by sequenator analysis. *Biochemistry.* 1973. V. 12. N 17. P. 3146-3153. DOI: 10.1021/bi00741a002.
 23. **Gennari F., Sharma V.K., Pettine M., Campanella L., Miliero F.J.** Reduction of selenite by cysteine in ionic media. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 2014. V. 124. P. 98-108. DOI: 10.1016/j.gca.2013.09.019.
 24. **Макаров С.В., Покровская Е.А., Сальников Д.С., Аманова А.В.** Влияние L-цистеина и N-ацетил-L-цистеина на восстановительную активность диоксида тиомочевины в водных растворах. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2020. Т. 63. Вып. 10. С. 4-10. DOI: 10.6060/ivkkt.20206310.6257.
- Makarov, S.V., Pokrovskaya, E.A., Salnikov, D.S., Amanova, A.V.** Influence of L-cysteine and N-acetyl-L-cysteine on reducing activity of thiourea dioxide in aqueous solutions. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2020. V. 63. N 10. P. 4-10 (in Russian). DOI: 10.6060/ivkkt.20206310.6257.

*Поступила в редакцию 23.11.2021
Принята к опубликованию 09.02.2022*

*Received 23.11.2021
Accepted 09.02.2022*