

ОРГАНИЧЕСКИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТЫ: КАК РАЗОБРАТЬСЯ В КРИТЕРИЯХ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ИХ ЭФФЕКТИВНОСТЬ?

Г. АЙДИНЯН, канд. с.-х. наук, технический директор,
А. БЫКОВА, технический специалист, компания Alltech Россия

Органические микроэлементы — сравнительно новая и достаточно сложная для понимания область в современной науке о кормлении. Целью данной статьи является попытка познакомить читателя с обзором научной литературы и опубликованных результатов исследований, посвященных этой тематике.

Рассмотрим только органические формы микроэлементов — металлов: железа (Fe), цинка (Zn), марганца (Mn) и меди (Cu), поскольку подходы в отношении создания органических форм микроэлементов — неметаллов селена (Se) и йода (I) — иные и требуют отдельного обсуждения.

Сегодня доподлинно известно, что традиционно используемые в практике кормления сельскохозяйственных животных неорганические источники микроэлементов обладают множеством недостатков. Эта проблематика была подробно описана в предыдущей статье «Почти забытые микроэлементы...» в № 10'2020.

Осознание физиологически обоснованных ограничений в отношении биодоступности и усвояемости неорганических форм микроэлементов послужило толчком к поиску и разработке возможных альтернатив, которые впоследствии получили обобщенное название «органические микроэлементы». Постепенно они начали привлекать внимание коммерческих производителей, а многообещающие результаты исследований еще больше подогревали интерес научного сообщества, что в итоге привело к обособлению отдельного направления в кормовой индустрии.

Термин «органические микроэлементы» — обобщающий для большого количества различных химических соединений микроэлементов, однако всех их объединяет наличие

химической связи между атомом микроэлемента и какой-либо органической молекулой, называемой лиганд (рис. 1).

В качестве лигандов в органических формах микроэлементов могут выступать различные соединения: аминокислоты, карбоновые кислоты, сахараиды, пептиды и т.д. Именно от выбора лиганда зависят свойства и особенности органических форм микроэлементов. При этом можно выделить всего две ключевые характеристики органических форм микроэлементов (ОМЭ), которыми определяется эффективность их использования в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы:

- **стабильность** — способность ОМЭ достигать мест абсорбции в тонком отделе кишечника в неизменном виде;
- **усвояемость** — эффективность всасывания ОМЭ энтероцитами кишечника.

Для сравнения: неорганические формы микроэлементов, попадая в желудочно-кишечный тракт, легко диссоциируют с высвобождением свободных катионов того или иного металла. Свободные катионы обладают высокой реактогенностью и могут с легкостью вступать во взаимодействия с другими веществами химуса, зачастую образуя недоступные для организма соединения. Более того, сам процесс всасывания микроэлементов сопряжен с взаимным антагонизмом макро- и микроэлементов как при всасывании парацеллюлярно (движение в межклеточном пространстве) путем пассивной диффузии, так и при использовании трансцеллюлярных механизмов (движение через клетку), таких как транспортер бивалентных металлов 1 (Divalent Metal Transporter 1 / DMT 1) (J.P. Goff, 2018). Об этих и других недостатках неорганических форм микроэлементов можно также прочитать в опубликованной статье «Почти забытые микроэлементы...».

Использование ОМЭ может помочь избежать нежелательной диссоциации и высвобождения катиона микро-

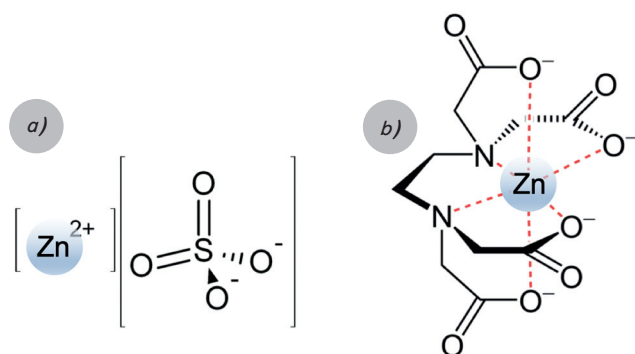


Рис. 1. Структура молекул неорганического сульфата цинка (а) и хелатной формы цинка на основе этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), выступающей в роли органического лиганда (б)

элемента. Но это возможно только в том случае, если данная органическая форма микроэлемента стабильна в пределах значений pH среды желудочно-кишечного тракта птицы. Большинство ОМЭ сохраняют стабильность при нейтральном или слабокислом значении pH тонкого отдела кишечника, где и происходит их всасывание. Но сначала ОМЭ в составе химуса должны преодолеть железистый и мышечный желудки, где pH среды значительно ниже (рис. 2).

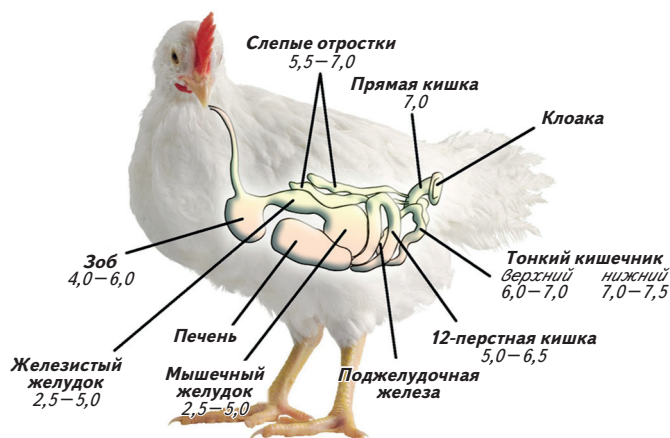


Рис. 2. Среднее значение pH в различных участках пищеварительной системы птицы

Здесь проявляется своеобразная «ахиллесова пята» многих ОМЭ: по мере смещения pH среды в кислую сторону они постепенно диссоциируют, в результате чего химическая связь между органической молекулой (лигандом) и микроэлементом теряется и он высвобождается в виде свободного катиона. Именно по этой причине органические формы микроэлементов, легко диссоциирующие при кислом pH, не обладают преимуществом по сравнению с неорганическими формами микроэлементов.

Наиболее ранними коммерческими препаратами по праву считаются микроэлементы на основе аминокислот и карбоновых кислот (H.D. Ashmead, 1992).

АМИНОКИСЛОТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ СТАБИЛЬНОСТЬ

Простейшим представителем таких соединений являются комплексы, в которых каждый атом микроэлемента связан с одной молекулой аминокислоты.

Существенный недостаток аминокислотных комплексов заключается в том, что они, не будучи нейтральными, сохраняют положительный заряд, вследствие чего более склонны к всевозможным взаимодействиям с другими веществами по мере прохождения по пищеварительному тракту. Другим уязвимым местом аминокислотных комплексов, в которых каждый атом микроэлемента связан только с одной аминокислотой, как правило, является их невысокая стабильность. Так, при кислом pH комплексы меди с лизином и с глутаминовой кислотой довольно легко дис-

социируют: уже при pH ниже 3,5 около 70% микроэлемента теряет связь с соответствующей аминокислотой и переходит в форму свободных катионов Cu^{2+} . В результате катионы микроэлементов могут вступать в нежелательные взаимодействия с другими веществами.

Аналогичная закономерность справедлива и для аминокислотных комплексов железа, которое само по себе является более трудно «хелатируемым» микроэлементом, чем медь. Например, при pH ниже 4,0 аминокислотный комплекс железа с лизином практически полностью диссоциирует, высвобождая катионы Fe^{2+} (рис. 3). Стабильность комплекса Fe с глутаминовой кислотой еще ниже.

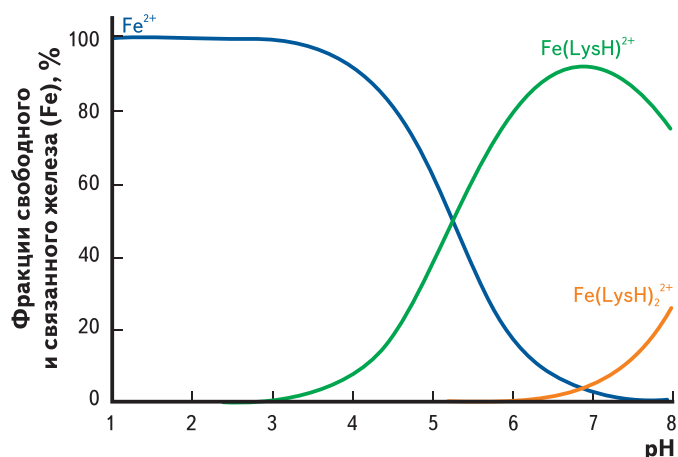


Рис. 3. Стабильность комплекса железа (Fe) с лизином (Lys) при разных значениях pH (синяя кривая — свободный микроэлемент)

Аминокислотные хелаты и их стабильность

Аминокислотные хелаты отличаются от описанных выше аминокислотных комплексов тем, что каждый атом микроэлемента связан не с одной, а с двумя аминокислотами. Термины «комплекс» и «хелаты» нередко вызывают путаницу, особенно когда речь идет об ОМЭ.

В соответствии с определением Международного союза теоретической и прикладной химии (International Union of Pure and Applied Chemistry / IUPAC) под термином «хелаты» подразумеваются соединения, в которых между центральным атомом металла и органическим лигандом образуются два или более отдельных мест связывания.

Характерная особенность истинных хелатов заключается в образовании ими не только ковалентных, но и координационных (дативных) химических связей между лигандом и микроэлементом, в результате чего происходит формирование характерных гетероциклических колец, центральным звеном которых является микроэлемент (Kozłowski и др., 1999; S.D. Ashmead, 2001).

Простейший представитель аминокислотных хелатов — глицинаты (биглицинаты), в которых соответствующие микроэлементы связаны с двумя молекулами аминокислоты глицин (McMurphy и Fay, 1995; Atkins и Beran, 1992).

Важное преимущество истинных хелатов состоит в том, что эти соединения нейтральны и не имеют положительного заряда в отличие от описанных выше аминокислотных комплексов, где каждый атом микроэлемента связан только с одной молекулой аминокислоты. Тем не менее опубликованные в научной литературе исследования показывают, что аминокислотные хелаты микроэлементов на основе глицина не обладают высокой стабильностью. Так, данные В. Ding (2009) наглядно демонстрируют стабильность биглицината железа только в нейтральной или слабокислой среде (рис. 4). По данным автора, стабильность значительно снижается по мере снижения pH с 5,5 до 1,3, а после инкубации в течение 30 мин в условиях, имитирующих желудочную среду (pH 1,3), диссоциирует около 95% биглицината железа.

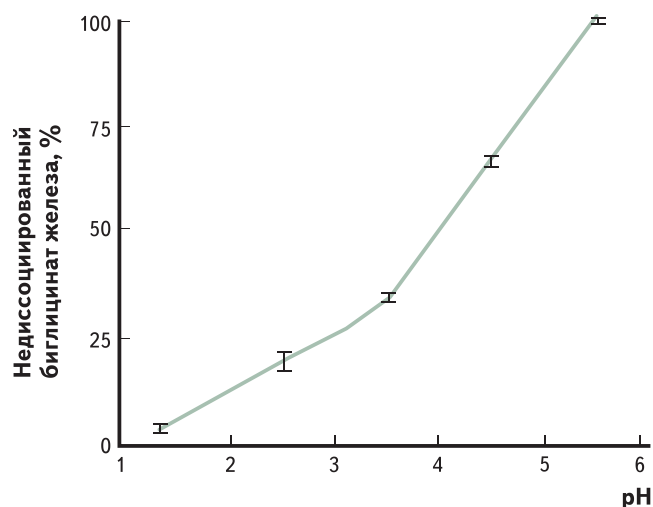


Рис. 4. Стабильность биглицината железа при разных значениях pH

Биодоступность и усвояемость аминокислотных комплексов. Новые данные

Еще недавно утверждения о более высокой по сравнению с неорганическими аналогами усвояемости аминокислотных комплексов микроэлементов, основанные на более ранних исследованиях, казались вполне обоснованными и не требовали дополнительных аргументов. Однако новые научные данные в очередной раз доказывают, что реальное положение вещей может оказаться весьма контринтуитивным. Об этом свидетельствуют опубликованные в журнале *Biometals* в 2017 г. исследования А.К. Sauer и др., изучавших биодоступность различных форм цинка (с глутаминовой кислотой, лизином и метионином) на примере линии эпителиальных клеток кишечника *Caco-2*.

Поразительный и важный вывод этого исследования состоит в том, что усвояемость аминокислотных комплексов микроэлементов статистически значимо снижается в присутствии свободных форм тех же аминокислот. Показательно, что этот эффект был в равной степени выражен для всех изученных аминокислотных комплексов (рис. 5).

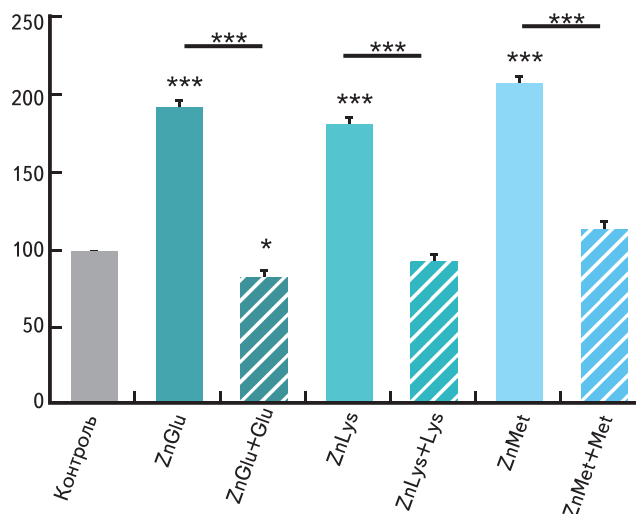


Рис. 5. Усвояемость комплексов цинка с глутаминовой кислотой (ZnGlu), лизином (ZnLys) и метионином (ZnMet) линией кишечных клеток *Caco-2* в отсутствие либо в присутствии свободных форм соответствующих аминокислот (Glu, Lys, Met)

Фактически эти выводы указывают на существование определенного антагонизма за всасывание между аминокислотными комплексами микроэлементов и свободными формами соответствующих аминокислот. Поскольку свободные аминокислоты, образованные в процессе переваривания алиментарного протеина, всасываются в тех же участках кишечника, где и аминокислотные комплексы микроэлементов, их взаимный антагонизм неизбежен.

ХЕЛАТЫ НА ОСНОВЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ: СТАБИЛЬНОСТЬ И УСВОЯЕМОСТЬ

Соединения этого типа в целом уступают по своей стабильности аминокислотным хелатам, что, в частности, обусловлено отсутствием в них функциональных аминокислотных групп. Характерным представителем являются хелаты микроэлементов с 2-гидрокси-4-метилтиобутановой кислотой, используемой в качестве лиганда. Данная кислота более известна под тривиальным названием «гидроксианалог метионина», или МГА (МНА). Молекула МГА отличается от молекулы метионина отсутствием аминокислотной группы и наличием у второго атома углерода гидроксильной группы.

Стабильность МГА-хелатов подробно описана в работе В. Diego (2008). Из ее данных следует, что при значении pH 2,5 диссоциирует около 80% МГА-хелата меди (рис. 6).

В работе того же автора была изучена и биодоступность МГА-хелатов в сравнении с неорганическими (сульфатными) формами микроэлементов. Методом *in vitro* на культуре эпителиальных клеток *Caco-2* было показано, что биодоступность МГА-хелатов цинка, меди и железа находится примерно на одном уровне с соответствующими неорганическими аналогами.

Отдельного упоминания заслуживает опубликованное в 2008 г. мнение Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA) в отношении эффективности использования МГА-хелатов цинка, меди и марганца в качестве источников микроэлементов. В документе сообщается, что предоставленные данные опытов, проведенных на различных видах сельскохозяйственных животных и птицы, свидетельствуют об отсутствии у МГА-хелатов каких-либо преимуществ по их биодоступности, безопасности, влиянию на продуктивные показатели и эффективности накопления микроэлементов в тканях организма. По мнению EFSA, МГА-хелаты по этим показателям сопоставимы с сульфатными формами соответствующих микроэлементов (The EFSA Journal (2008), 692, 1–17; 693, 1–19; 694, 1–16). Примечательно, что в отчетах также указано, что производителем не была предоставлена методика для определения стабильности МГА-хелатов.

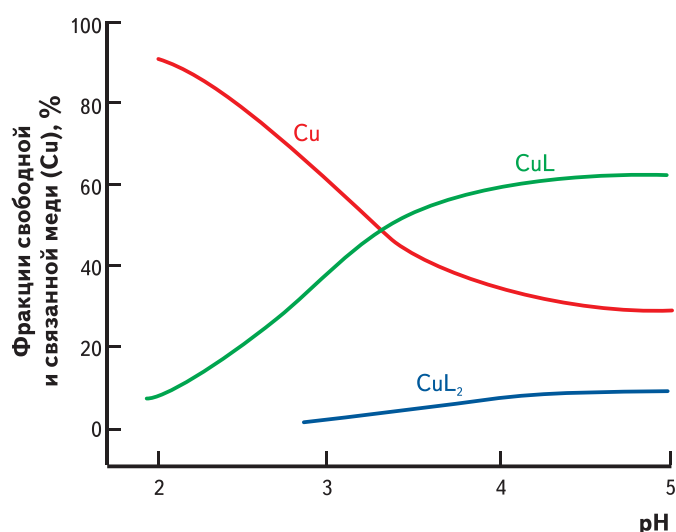


Рис. 6. Стабильность МГА-хелатов меди при разных значениях pH
(красная кривая — свободный микроэлемент)

Весьма показательны результаты J. Yuan и др. (2011). В исследованиях на бройлерах авторы установили, что при 60%-ной замене неорганических микроэлементов на МГА-хелаты не только не наблюдается положительных эффектов, но отмечается целый ряд негативных последствий: статистически значимое снижение живой массы, длины костей плюсны, активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови и экспрессии цинк-переносящих белков. Более того, увеличение падежа птицы в опытной группе, получавшей МГА-хелаты, было также статистически значимым.

Подобные исследования красноречиво демонстрируют, что не все органические формы микроэлементов одинаково эффективны, что в свою очередь обусловлено особенностями их химического строения, стабильностью и биодоступностью.

ОРГАНИЧЕСКИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТЫ НА ОСНОВЕ МАЛЫХ ПЕПТИДОВ

Несмотря на то что данная концепция появилась относительно недавно, в научной литературе уже имеется внушительный объем накопленных *in vitro* и *in vivo* исследований.

Термином «малые пептиды» называют цепочку из нескольких аминокислотных остатков, связанных между собой пептидными связями. Эта цепочка может быть образована различным количеством, набором и последовательностью аминокислот. Эти особенности чрезвычайно важны при создании органических микроэлементов на основе малых пептидов, поскольку далеко не любые пептиды могут быть успешно использованы в качестве лиганда для микроэлементов. В этом можно убедиться, ознакомившись с данными L.A. Vurpe (2010): различные пептидные хелаты меди обладают совершенно разной стабильностью по мере изменения pH.

Аминокислотный состав и последовательность аминокислот в пептидном остатке — ключевые характеристики, определяющие стабильность микроэлементов на основе малых пептидов.

ОРГАНИЧЕСКИЕ ФОРМЫ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ БИОПЛЕКС®

Органические формы микроэлементов Биоплекс® представляют собой истинные хелаты, в которых каждый атом микроэлемента связан с малым пептидом. Как было сказано выше, преимущество истинных хелатов состоит в том, что в их молекулах между каждым микроэлементом и лигандом образуются не только ковалентные, но и координационные (дативные) химические связи, которые обеспечивают более стойкую и стабильную связь. На рисунке 7 показано строение некоторых малых пептидов, выступающих в роли лигандов в препарате Биоплекс® Медь. Они состоят из 3–10 аминокислотных остатков (A. Yiannikouris и др., 2009).

Стабильность микроэлементов Биоплекс® подтверждена множеством экспериментов и сравнительных исследований с другими органическими формами микроэлементов. L.A. Vurpe и др. (2018), изучая стабильность различных

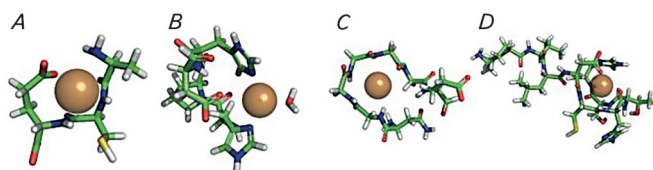


Рис. 7. Пространственная структура (компьютерное моделирование) четырех пептидов, участвующих в образовании хелатов меди в препарате Биоплекс® Медь:

A — Ала-Цис-Глу;

B — Гис-Про-Гис-Асп;

C — Асп-Гли-Гли-Гли-Гли-Гли-Гли;

D — Ала-Про-Вал-Лей-Асп-Цис-Гис-Тре-Сер-Гис

органических форм меди, установили, что даже при pH 2,8 практически 90% меди в форме Биоплекс® оставалось в связанном состоянии. Другие органические формы меди диссоциировали в значительно большей степени по мере снижения показателя pH (рис. 8).

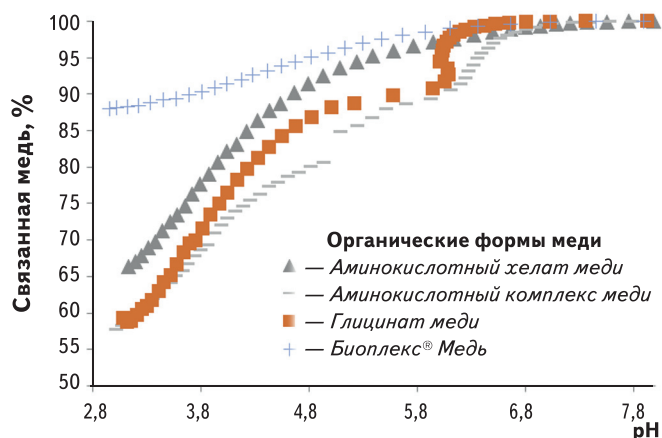


Рис. 8. Стабильность различных органических форм меди при разных значениях pH

Усвояемость органических форм Биоплекс® обусловлена совершенно иным, чем у аминокислотных комплексов или хелатов, механизмом всасывания и наряду с более высокой стабильностью является основным преимуществом данного типа хелатов. В исследованиях J.S. Radcliffe и др. (2007), проведенных на тканях кишечника цыплят-бройлеров и поросят-отъемышей, было не только установлено, что всасывание микроэлементов в форме Биоплекс® достоверно выше по сравнению с неорганической формой (рис. 9), но и был экспериментально определен вовлеченный в этот процесс механизм.

Авторы предположили, что более высокая всасываемость меди в форме Биоплекс® может быть обусловлена задействованием механизма активного транспорта малых пептидов. Для проверки этой гипотезы исследователи избирательно блокировали основной механизм трансмембранного транспорта малых пептидов — транспортер PepT1 (сокращение от Peptide transporter 1). Это приводило к снижению всасывания

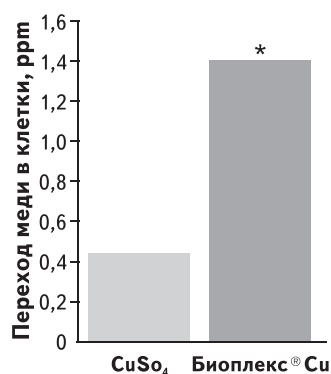


Рис. 9. Усвояемость меди из препарата Биоплекс® и сульфата меди энтероцитами кишечника

меди в форме Биоплекс®, однако никак не сказывалось на усвояемости меди в форме сульфата. Таким образом, было показано, что транспортер PepT1 играет главную роль в активном транспорте органических микроэлементов в форме Биоплекс®, обеспечивая перенос связанного с малыми пептидами микроэлемента внутрь клетки.

Следует пояснить, что в соответствии с ранними представлениями о механизмах всасывания конечных продуктов переваривания белка полипептидная цепь должна полностью гидролизоваться до отдельных аминокислот, и именно в этой форме может происходить их всасывание (Wiggins и Johnston, 1959). Однако последующие исследования не только опровергли это предположение, но и продемонстрировали, что всасывание происходит намного интенсивнее, если аминокислоты находятся в составе малых пептидов, то есть в составе короткой цепочки из нескольких аминокислотных остатков, связанных между собой пептидными связями (Adibi и Morse, 1971; Matthews, 1983). Более того, дальнейшие эксперименты показали, что 70–85% всех аминокислот в просвете кишечника всасываются в энтероциты именно в форме малых пептидов и лишь незначительная часть — в форме свободных аминокислот (Matthews, 1991; Ganapathy и др., 1994).

В 1994 г. понимание этого феномена значительно продвинулось с открытием так называемого переносчика малых пептидов PepT1. Всасывание малых пептидов в энтероциты происходит путем создания опосредованного PepT1 протонного градиента, направленного внутрь клетки (S. Newstead, 2015). Показано также, что в условиях стресса механизм PepT1 активизируется сильнее и обуславливает более эффективное всасывание малых пептидов (M. Thamocharan и др., 1999). Именно благодаря вовлечению этого механизма органические микроэлементы в форме Биоплекс® обладают высокой усвояемостью: микроэлемент переносится внутрь энтероцита, будучи связанным с пептидным остатком.

Многочисленные исследования указывают, что механизм активного транспорта малых пептидов используется для транспорта не только тысяч различных пептидов, но и структурно близких соединений. Некоторые современные лекарственные средства, изначально обладающие низкой всасываемостью, намеренно модифицируются до пептидоподобных миметиков для того, чтобы задействовать PepT1 на этапе абсорбции, в результате чего проницаемость клеточных мембран для этих веществ повышается и их усвояемость увеличивается (S. Newstead, 2016; M. Inoue и др., 2005; S.A. Adibi, 2003; Y. Zhang и др., 2013; T. Nakanishi и др., 2008; M. Brandsch, 2013). ■

С подробной информацией об эффективности использования микроэлементов в форме Биоплекс® в птицеводстве и обзором опубликованных исследований можно будет ознакомиться в следующем номере.