



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 5/00 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2022117920, 01.07.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.07.2022

Дата регистрации:
28.04.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 01.07.2022

(45) Опубликовано: 28.04.2023 Бюл. № 13

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Токтаревой
Т.М.

(72) Автор(ы):

Маклаков Данил Витальевич (RU),
Надеждин Сергей Викторович (RU),
Бурда Юрий Евгеньевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: CN 107574145 A, 12.01.2018.

ROBERTSON A., KARP W., BRODERSEN R.
Comparison of the binding characteristics of
serum albumins from various animal species //
Dev Pharmacol Ther. 1990. N 15(2). P. 106-11. RU
2624139 C2, 30.06.2017.

(54) Состав бессывороточной питательной среды для культивирования мезенхимных стволовых клеток свиньи

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Представлен состав бессывороточной питательной среды для культивирования мезенхимных стволовых клеток свиньи (свМСК), который включает базовую питательную среду DMEM/F12 (1:1). А также дополнительно содержит следующие компоненты (мг/л): аминокислоты: L-Аланин - 4,45, L-Аргинин - 73,75, L-Аспарагин - 7,50, L-Аспарагиновая кислота - 6,65, L-Цистин - 31,29, L-Глютаминовая кислота - 7,35, L-Глютамин - 182,5, L-Цистеин - 8,78, L Глицин - 9,38, L-Гистидин - 15,74, L-Изолейцин - 27,24, L-Лейцин - 29,53, L-Лизин HCl

- 45,63, L-Метионин - 8,62, L-Фенилаланин - 17,74, L-Пролин - 8,63, L-Серин - 13,13, L-Треонин - 26,73, L-Триптофан - 4,51, L-Тирозин - 27,90, L-Валин - 26,43; транспортные белки: Свиной сывороточный альбумин - 1000-2000, Трансферин - 50-100, Фетуин - 500-1000; гормоны: Гидрокортизон - 0,1-0,5, Прогестерон - 0,1-0,5, Инсулин - 5-10. Изобретение позволяет получить новый состав бессывороточной питательной среды для культивирования мезенхимных стволовых клеток свиньи (свМСК) с сохранением пролиферативной активности и дифференцировочного потенциала. 3 ил., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 5/00 (2023.02)

(21)(22) Application: **2022117920, 01.07.2022**

(24) Effective date for property rights:
01.07.2022

Registration date:
28.04.2023

Priority:

(22) Date of filing: **01.07.2022**

(45) Date of publication: **28.04.2023** Bull. № 13

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Toktarevoj T.M.**

(72) Inventor(s):

**Maklakov Danil Vitalevich (RU),
Nadezhdin Sergej Viktorovich (RU),
Burda Yuriy Evgenevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **COMPOSITION OF A SERUM-FREE NUTRIENT MEDIUM FOR CULTURING PORCINE MESENCHYMAL STEM CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: composition of a serum-free nutrient medium for the cultivation of porcine mesenchymal stem cells (svMSC), which includes the basic nutrient medium DMEM/F12 (1:1), is presented. It also additionally contains the following components (mg/l): amino acids: L-Alanine — 4.45, L-Arginine — 73.75, L-Asparagine — 7.50, L-Aspartic acid — 6.65, L-Cystine — 31.29, L-Glutamic acid — 7.35, L-Glutamine — 182.5, L-Cysteine — 8.78, L-Glycine — 9.38, L-Histidine — 15.74, L-Isoleucine — 27.24, L-Leucine — 29.53, L-Lysine HCl — 45.63, L-Methionine — 8.62, L-Phenylalanine — 17.74, L-

Proline — 8.63, L-Serine — 13.13, L-Threonine — 26.73, L-Tryptophan — 4.51, L-Tyrosine — 27.90, L-Valine — 26.43; transport proteins: Porcine serum albumin — 1,000–2,000, Transferin — 50–100, Fetuin — 500–1,000; hormones: Hydrocortisone — 0.1–0.5, Progesterone — 0.1–0.5, Insulin — 5–10.

EFFECT: invention makes it possible to obtain a new composition of a serum-free nutrient medium for cultivating porcine mesenchymal stem cells (svMSCs) while maintaining proliferative activity and differentiation potential.

1 cl, 3 dwg, 3 ex

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к области разработки искусственных бессывороточных питательных сред для культивирования мезенхимных стволовых клеток млекопитающих и может быть использовано в фармацевтической и биотехнологической промышленности.

5 В настоящее время клеточные питательные среды повсеместно используются как биотехнологическими, так и фармацевтическими компаниями для получения различных продуктов, таких как гормоны, ферменты, антигены, антитела и др. Питательные среды для роста клеток млекопитающих обычно представляют собой смесь питательных
10 веществ органического и неорганического происхождения, эмульгированных или растворенных в жидкой или полутвердой фазе. Для культивирования мезенхимных стволовых клеток (далее МСК) используют адаптированные питательные среды, которые должны обеспечивать способность МСК к пролиферации и дифференцировке в специализированные клетки (сосудистые, нервные, липидные, костные, хрящевые и др.). Важность сбалансированного и стабильного состава питательных сред особенно
15 актуальна при их использовании в биотехнологических процессах в условиях биореакторов особенно при масштабном промышленном производстве. Сегодня основной добавкой в питательную среду является сыворотка крови, например, эмбриональной телячьей или крупного рогатого скота (КРС), которую обычно добавляют в количестве не более 10%. Однако кроме положительных свойств
20 применение сыворотки крови в качестве добавки к питательным средам имеет и отрицательный аспект, который заключается в неконтролируемом составе компонентов, специфичности, контаминации, наличии ингибиторов роста и сложности стандартизации от партии к партии. В связи с вышеизложенным растет спрос на разработку альтернативных питательных сред без добавления сыворотки крови млекопитающих.
25 Эта потребность частично удовлетворяется коммерческими продуктами, например, AdvanceSTEMTM (HyClone), Advanced Stem Cell Media, NutriStem XF, доступными в настоящее время. Однако они не полностью покрывают потребности биотехнологической промышленности и требуют тонкой адаптации МСК к питательной среде.

30 Описание аналога. Известна бессывороточная среда для мезенхимных стволовых клеток животных, патентная заявка № CN106282102A, в которой используется базовая питательная среда DMEM и MCDB201 (1:1) с добавлением факторов роста (фактор роста фибробластов -FGF, тромбоцитарный фактор роста BB - PDGF-BB, трансформирующий фактор роста бета - TGF-β, фактор роста гепатоцитов - HGF),
35 липидного концентрата, гормонов (инсулина, дексаметазона), бычьего сывороточного альбумина, витамина Е и поверхностно-активных веществ (Плюроник-F (полоксамер), Твин 80).

Недостатками аналога является качественный и количественный состав питательной бессывороточной среды, в которую входят такие компоненты как факторы роста и
40 гормон дексаметазон. Включение факторов роста и дексаметазона в состав питательной среды не только способствуют пролиферации мезенхимных стволовых клеток, но и активируют процессы их дифференцировки в различные типы клеток (Bella E., Buetti-Dinh A., Licandro G. Dexamethasone Induces Changes in Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells via SOX9 and PPARγ, but Not RUNX2 // Int. J. Mol. Sci. 2021. N
45 22(9), 4785). Поэтому факторы роста не желательно вводить в состав питательной среды на этапе масштабирования клеточной биомассы МСК, они должны использоваться только на этапе дифференцировки МСК в требуемый тип клетки. Наряду с этим в качестве базовой питательной среды используют коммерческую питательную среду

DMEM и MCDB201 (1:1). Однако более сбалансированным составом для разработки бессывороточной питательной среды является базовая питательная среда DMEM/F12 (Butler M. Serum-free media: standardizing cell culture systems // Pharm. Bioprocess. 2013. N 1(4). P. 1-4). Дополнительным отрицательным фактором данной питательной среды является наличие только одного белка транспортера – сывороточного бычьего альбумина. Необходимо отметить, что на эффективность транспорта биомолекул оказывает влияние и видовое различие альбуминов быка и свиньи (Robertson A., Karp W., Brodersen R. Comparison of the binding characteristics of serum albumins from various animal species // Dev Pharmacol Ther. 1990. N 15(2). P. 106-11). Таким образом, использование бычьего альбумина снижает эффективность транспорта минеральных солей, жирных кислот, гормонов и микроэлементов при культивировании мезенхимных стволовых клеток свиньи (свМСК).

Описание прототипа. Наиболее близким по своим признакам, принятым за прототип, является бессывороточная питательная среда описанная в патентной заявке № CN107574145A, в которой используют базовую питательную среду DMEM/F12 с добавлением факторов роста (фактор роста фибробластов - FGF, эпидермальный фактор роста - EGF, тромбоцитарный фактор роста ВВ - PDGF-BB, трансформирующий фактор роста бета - TGF- β , ингибирующий фактор лейкемии – LIF, инсулиноподобный фактор роста-1 – IGF-1), гормонов (гидрокортизон, инсулин, прогестерон, дексаметазон), белков (сывороточного альбумина человека, трансферрина, фетуина), липидного концентрата и адгезивных веществ (фибронектин, ламинин, коллаген, кадгерин). Данная питательная среда не может быть применена для культивирования мезенхимных стволовых клеток свиньи с сохранением мультипотентности и потенциала к дифференцировке, так как содержит факторы роста и дексаметазон стимулирующие свМСК к дифференцировке в различные типы клеток (Keum-Seok B., Joon-Beom P., Hyun-Soo K. et al. Neuron-Like Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells // Yonsei Medical Journal. 2011. 52(3) P. 401-412). Также данная питательная среда содержит сывороточный альбумин человека, что снижает эффективность транспорта минеральных солей, жирных кислот и гормонов из-за видового различия альбуминов человека и свиньи (Robertson A., Karp W., Brodersen R. Comparison of the binding characteristics of serum albumins from various animal species // Dev Pharmacol Ther. 1990. N 15(2). P. 106-11).

Задачей предлагаемого изобретения является получение нового состава бессывороточной питательной среды для культивирования мезенхимных стволовых клеток свиньи (свМСК).

Технический результат - получение нового состава бессывороточной питательной среды для культивирования мезенхимных стволовых клеток свиньи (свМСК) с сохранением пролиферативной активности и дифференцировочного потенциала.

Технический результат достигается при добавлении к базовой питательной среде DMEM/F12 (1:1), содержащей дополнительно белки и гормоны, следующих компонентов (мг/л), а именно

- аминокислоты: L-Аланин - 4,45, L-Аргинин - 73,75, L-Аспарагин - 7,50, L-Аспарагиновая кислота - 6,65, L-Цистин - 31,29, L-Глютаминовая кислота - 7,35, L-Глютамин - 182,5, L-Цистеин - 8,78, L-Глицин - 9,38, L-Гистидин - 15,74, L-Изолейцин - 27,24, L-Лейцин - 29,53, L-Лизин HCl - 45,63, L-Метионин - 8,62, L-Фенилаланин - 17,74, L-Пролин - 8,63, L-Серин - 13,13, L-Треонин - 26,73, L-Триптофан - 4,51, L-Тирозин - 27,90, L-Валин - 26,43;

- транспортные белки: Свиной сывороточный альбумин - 1000-2000, Трансферин - 50-100, Фетуин - 500-1000;

- гормоны: Гидрокортизон - 0,1-0,5, Прогестерон - 0,1-0,5, Инсулин - 5-10.

Предлагаемый состав бессывороточной питательной среды позволяет обеспечить пролиферативную активность свМСК за счет увеличения в 2 раза заменимых и не заменимых аминокислот по сравнению с базовой питательной средой DMEM/F12 и введения дополнительно транспортных белков и гормонов, обеспечивающих эффективное увеличение клеточной биомассы свМСК без запуска процесса дифференцировки в другие типы клеток, но с сохранением дифференцировочного потенциала свМСК за счет исключения из состава питательной среды факторов роста и синтетического гормона дексаметазона.

Из уровня техники заявленный состав бессывороточной питательной среды для культивирования мезенхимных стволовых клеток свиньи (свМСК) не известен, что подтверждает соответствие условию новизна. Также неочевидно влияние входящих в заявленный состав ингредиентов на достижение технического результата - возможность культивирования мезенхимных стволовых клеток свиньи (свМСК) с сохранением пролиферативной активности и дифференцировочного потенциала полученной биомассы, что подтверждает соответствие условию изобретательский уровень.

Изобретение характеризуют следующие графические материалы.

Фиг. 1. Диаграмма оценки пролиферативной активности свМСК, культивированных в питательной среде DMEM/F12, с содержанием 10% сыворотки КРС и 1% раствора пенициллина-стрептомицина и в предложенной бессывороточной питательной среде Serum Free Media, с содержанием 1% раствора пенициллина-стрептомицина.

Фиг. 2. Фотограммы – свМСК на 9 день культивирования. Фиг.1а - свМСК культивированные в питательной среде DMEM/F12 с содержанием 10% сыворотки КРС. Фиг.1б – свМСК, культивированные в разработанной бессывороточной питательной среде. Видно, что в каждом случае свМСК плотно покрывают всё поле зрения на поверхности дна культурального флакона, имеют типичную морфологию и представлены веретенновидными фибробластоподобными клетками.

Фиг. 3. Диаграмма оценки дифференцировочного потенциала свМСК в остеогенном направлении, культивированных в питательной среде DMEM/F12 с содержанием 10% сыворотки КРС с остеоиндуктивной добавкой DMEM/F12+OST и в разработанной бессывороточной питательной среде с остеоиндуктивной добавкой Serum Free Media+OST. Контроль питательная среда DMEM/F12 с содержанием 10% сыворотки КРС без остеоиндуктивной добавки DMEM/F12.

Изобретение осуществляют следующим образом.

Мезенхимные стволовые клетки свиньи (свМСК) были получены из красного костного мозга бедренных костей свиньи возрастом 7 дней и хранились в морозильной камере в криосреде при температуре минус 80°C. Для апробации разработанного бессывороточного состава питательной среды, включающей DMEM/F12 (1:1), содержащей дополнительно белки и гормоны, следующих компонентов (мг/л), а именно

- аминокислоты: L-Аланин - 4,45, L-Аргинин - 73,75, L-Аспарагин - 7,50, L-Аспарагиновая кислота - 6,65, L-Цистин - 31,29, L-Глютаминовая кислота - 7,35, L-Глютамин - 182,5, L-Цистеин - 8,78, L Глицин - 9,38, L-Гистидин - 15,74, L-Изолейцин - 27,24, L-Лейцин - 29,53, L-Лизин HCl - 45,63, L-Метионин - 8,62, L-Фенилаланин - 17,74, L-Пролин - 8,63, L-Серин - 13,13, L-Треонин - 26,73, L-Триптофан - 4,51, L-Тирозин - 27,90, L-Валин - 26,43;

- транспортные белки: Свиной сывороточный альбумин - 1000-2000, Трансферин - 50-100, Фетуин - 500-1000,

- гормоны: Гидрокортизон - 0,1-0,5, Прогестерон - 0,1-0,5, Инсулин - 5-10,

криопробирку извлекли из морозильной камеры, разморозили суспензию свМСК и добавили в культуральные флаконы площадью 25 см² (Eppendorf, Германия). Плотность посева свМСК составляла 0,7 x 10⁶. В первую серию флаконов (2 шт.) добавляли 5 мл свежей питательной среды DMEM/F12 (ООО «Биолот», РФ), содержащей 10% сыворотки КРС (ООО «Биолот», РФ) и 1% раствора пенициллина-стрептомицина (ООО «Биолот», РФ). Во вторую серию флаконов (2 шт.) добавляли 5 мл разработанной бессывороточной питательной среды, содержащей 1% раствора пенициллина-стрептомицина. Флаконы с свМСК помещали в СО₂-инкубатор и культивировали при температуре +37°С в увлажненной атмосфере 5% СО₂ в течение 9 дней. Среду меняли на свежую каждые три дня.

Для оценки пролиферативной активности свМСК использовали МТТ-тест, для оценки дифференцировочного потенциала определяли способность свМСК к дифференцировке в остеогенном направлении окрашиванием на щелочную фосфатазу.

Пример 1

Для проведения исследования готовили свМСК следующим образом: свМСК снимали со дна флакона (25 см²) аспирировали питательную среду, добавляли к клеткам 1 мл раствора Хенкса без фенолового красного (ООО НПП «ПанЭко»), инкубировали клетки с раствором в течение 1 минуты, по окончании времени инкубации раствор аспирировали. Затем к свМСК добавляли 3 мл раствора Версена-трипсина (1:1) (ООО «Биолот»), инкубировали в течение 4-5 минут, контролировали открепление клеток от дна флакона под микроскопом. По окончанию времени инкубации блокировали действие трипсина путем добавления к суспензии 3 мл полной питательной среды DMEM/F-12 (ООО НПП «ПанЭко»), содержащей 5% сыворотки КРС. Полученную суспензию переносили в пробирку, центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин, надосадочную жидкость удаляли в асептических условиях, в пробирку добавляли 2 мл полной питательной среды, тщательно ресуспендировали, подсчитывали число клеток в суспензии с помощью камеры Горяева.

Пример 2

Оценку пролиферативной активности свМСК, подготовленную по примеру 1, проводили фотометрическим методом с определением оптической плотности при помощи микропланшетного фотометра (Multiskan FC, Thermo Scientific) при длине волны 450 нм (референсная длина волны 620 нм) и реагента WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1 протокол, Roche). Мезенхимные стволовые клетки свиньи культивировали в 96-луночном планшете. Для этого в каждую лунку планшета вносили по 0,02x10⁶ свМСК. Для контроля 50% лунок планшета были заполнены питательной средой DMEM/F12 (ООО «Биолот», РФ), содержащей 10% сыворотки КРС (ООО «Биолот», РФ). Затем заполнили другие 50% лунок планшета предложенной бессывороточной питательной средой. Мезенхимные стволовые клетки свиньи культивировали в 96-луночном планшете в условиях СО₂-инкубатора при 95% влажности, температуре 37°С, 5% СО₂ в течение 72 часов. Пролиферативную активность рассчитывали по формуле:

коэффициент пролиферации (%) = (А) тест/(Б) контроль x 100%,

где (А) тест — культивирование в предложенной питательной среде, (Б) контроль — стандартная питательная среда DMEM/F12, с содержанием 10% сыворотки КРС.

В ходе оценки пролиферативной активности свМСК достоверных различий между группами установлено не было. Оптическая плотность в группе свМСК культивированных в питательной среде DMEM/F12, с содержанием 10% сыворотки

КРС и 1% раствора пенициллина-стрептомицина составила $0,83 \pm 0,1$ у.е.. В группе свМСК, культивированных в предложенной бессывороточной питательной среде, содержащей 1% раствор пенициллина-стрептомицина оптическая плотность равнялась $0,79 \pm 0,1$ у.е., что свидетельствует о сохранении клетками пролиферативной активности (фиг.1).

Коэффициент пролиферации свМСК, культивированных в предложенной бессывороточной питательной среде, содержащей 1% раствора пенициллина-стрептомицина составил 95,2%, что свидетельствует о высокой пролиферативной активности без запуска процесса дифференцировки в другие типы клеток (фиг.2).

Пример 3

Оценку дифференцировочного потенциала свМСК, полученной по примеру 1, проводили в остеогенном направлении путем добавления к питательной среде остеоиндуктивной добавки, содержащей 0,1 мкМ - дексаметазон, 50 мкМ аскорбиновая кислота, 10 мМ β -глицерофосфат натрия (Пинаев Г.П., Богданова М.С. Методы культивирования клеток / Г.П. Пинаев, М.С. Богданова. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. – 278 с.). Для этого в каждую лунку 96-луночного планшета вносили по $0,02 \times 10^6$ свМСК. При этом 50% лунок планшета были заполнены питательной средой DMEM/F12 (ООО «Биолот», РФ), содержащей 10% сыворотки КРС (ООО «Биолот», РФ) с остеоиндуктивной добавкой (положительный контроль), другие 50% лунок планшета - разработанной бессывороточной питательной средой с той же остеоиндуктивной добавкой. Отрицательным контролем служили лунки без остеоиндуктивной добавки в питательную среду DMEM/F12 (ООО «Биолот», РФ), содержащей 10% сыворотки КРС (ООО «Биолот», РФ). Культивировали свМСК в 96-луночном планшете в условиях CO_2 -инкубатора при 95% влажности, температуре 37°C , 5% CO_2 , в течение 6 суток.

Дифференцировку свМСК в остеогенном направлении оценивали по накоплению щелочной фосфатазы при помощи реагента BCIP®/NBT-Blue Liquid Substrate System for Membranes (Sigma) с использованием фотометрического метода с определением оптической плотности при помощи микропланшетного фотометра (Multiskan FC, Thermo Scientific) при длине волны 450 нм. Дифференцировочный потенциал клеток рассчитывали по формуле:

коэффициент дифференцировки (%) = (А) тест/(Б) контроль $\times 100\%$, где (А) тест — культивирование свМСК в питательных средах с остеоиндуктивной добавкой, (Б) контроль — стандартная питательная среда DMEM/F12, 10% сыворотки КРС.

В ходе оценки дифференцировочного потенциала свМСК в остеогенном направлении были установлены достоверные различия с увеличением оптической плотности у свМСК, культивированных в питательных средах с остеоиндуктивной добавкой по сравнению с клетками, культивированными в питательных средах без остеоиндуктивной добавки (при $p \leq 0,05$). Оптическая плотность была больше в группе при культивировании свМСК в разработанной бессывороточной среде - $0,43 \pm 0,04$ у.е. и в группе положительного контроля $0,44 \pm 0,03$ у.е., по сравнению с группой отрицательного контроля - $0,05 \pm 0,02$ у.е., что свидетельствует о сохранении клетками дифференцировочного потенциала (фиг.3). Коэффициент дифференцировки свМСК культивированных в разработанной бессывороточной питательной среде составил 860%, у свМСК культивированных в питательной среде DMEM/F12, содержащей 10% сыворотки КРС (положительный контроль) равнялся 880%, что свидетельствует об эффективности разработанного состава бессывороточной питательной среды позволяющего сохранить дифференцировочный потенциал свМСК.

Таким образом, предлагаемый состав бессывороточной питательной среды

обеспечивает культивирование свМСК в стандартных условиях (95% влажность, 37°C температура, 5% CO₂) с сохранением пролиферативной активности и дифференцировочного потенциала.

5 (57) Формула изобретения

Состав бессывороточной питательной среды для культивирования мезенхимных стволовых клеток свиньи (свМСК), включающий базовую питательную среду DMEM/F12 (1:1) и также дополнительно содержащий следующие компоненты (мг/л):

- 10 - аминокислоты: L-Аланин - 4,45, L-Аргинин - 73,75, L-Аспарагин - 7,50, L-Аспарагиновая кислота - 6,65, L-Цистин - 31,29, L-Глютаминовая кислота - 7,35, L-Глютамин - 182,5, L-Цистеин - 8,78, L-Глицин - 9,38, L-Гистидин - 15,74, L-Изолейцин - 27,24, L-Лейцин - 29,53, L-Лизин HCl - 45,63, L-Метионин - 8,62, L-Фенилаланин - 17,74, L-Пролин - 8,63, L-Серин - 13,13, L-Треонин - 26,73, L-Триптофан - 4,51, L-Тирозин - 27,90, L-Валин - 26,43;
- 15 - транспортные белки: Свиной сывороточный альбумин - 1000-2000, Трансферин - 50-100, Фетуин - 500-1000;
- гормоны: Гидрокортизон - 0,1-0,5, Прогестерон - 0,1-0,5, Инсулин - 5-10.

20

25

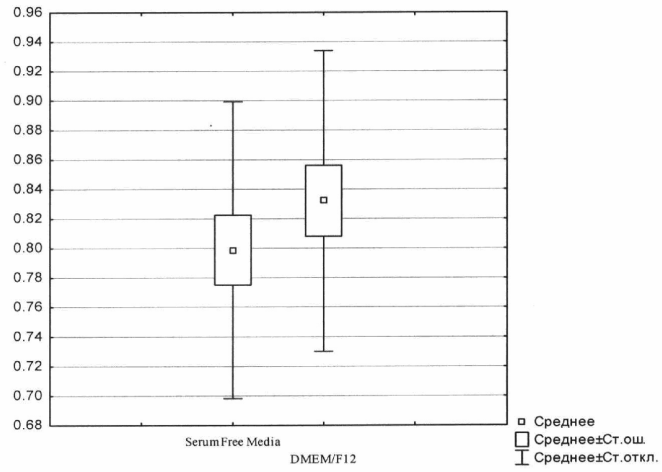
30

35

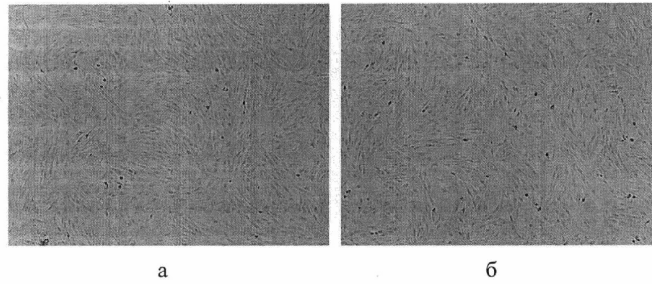
40

45

1

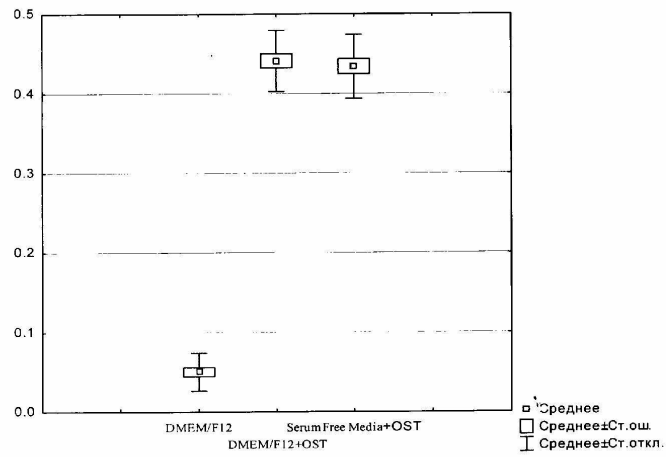


Фиг.1



Фиг. 2

2



Фиг. 3