

PATRYCJA KŁOS, ELEONORA LAMPART-SZCZAPA

**CYTOMETRYCZNA OCENA APOPTOZY NA PODSTAWIE
POMIARU AKTYWNOŚCI KASPAZ JAKO METODA ANALIZY
ODDZIAŁYWAŃ BIAŁEK ŁUBINU WĄSKOLISTNEGO (*LUPINUS
ANGUSTIFOLIUS*, ODMIANA BARON) NA UKŁAD
IMMUNOLOGICZNY CZŁOWIEKA**

Streszczenie

Białko łubinowe, ze względu na dużą wartość odżywczą i funkcjonalność, znajduje coraz szersze zastosowanie w żywieniu człowieka. Czynnikiem ograniczającym wykorzystanie protein łubinu jako składnika żywności może być jego niekorzystne oddziaływanie na komórki układu immunologicznego człowieka.

W celu zbadania tego wpływu przeanalizowano białka łubinu (*L. angustifolius*, odmiana Baron) w celu sprawdzenia ich zdolności do indukowania apoptozy w populacji hodowlanej ludzkich limfocytów, wykorzystując metodę cytometrycznego pomiaru aktywności kaspaz.

Materiał do założenia hodowli stanowiły limfocyty wyizolowane z krwi osoby atopowej. Komórki hodowlane poddano działaniu odpowiednio: induktora apoptozy (fitohemaglutyniny roślinnej, PHA) oraz ekstraktu białka łubinowego. Po upływie 48 h od momentu założenia hodowli dokonano cytometrycznego pomiaru poziomu apoptozy poprzez ocenę aktywności kaspaz w populacji komórek hodowlanych.

Wykazano podwyższoną, w stosunku do próby kontrolnej, aktywność kaspazową w limfocytach, którym podano ekstrakt białka łubinowego. Uzyskane wyniki dowodzą zdolności badanych białek łubinowych do indukowania apoptozy (wzmóżonej aktywności kaspaz) w hodowli ludzkich limfocytów.

Słowa kluczowe: łubin, białka, apoptoza, kaspazy, limfocyty, cytometria

Wprowadzenie

Łubin, jako źródło białka, zyskuje obecnie coraz szersze znaczenie w żywieniu człowieka [6]. Białko nasion łubinu charakteryzuje się dużą wartością odżywczą i funkcjonalnością porównywalną z białkiem sojowym.

Czynnikiem ograniczającym wykorzystanie łubinu jako składnika żywności może być stwierdzona niedawno zdolność zawartych w nim białek do wpływania na odpowiedź układu immunologicznego człowieka [3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 15]. W literaturze dostępne są doniesienia na temat występowania objawów reakcji alergicznej, w tym również tak niebezpiecznych, jak szok anafilaktyczny po spożyciu produktów zawierających dodatek białek łubinu [5, 7, 8, 9, 11, 14, 15] lub inhalacji pyłu pochodzącego z mąki łubinowej [3, 12]. Ponadto stwierdzono, że istnieje zagrożenie wystąpieniem reakcji krzyżowych pomiędzy alergenami pochodzącymi z łubinu oraz z orzeszków ziemnych [1, 4, 8, 9] czy soi [1].

Niebezpieczeństwo może stanowić również fakt, że łubin, jak pozostałe rośliny strączkowe, wykazuje zdolność akumulacji metali ciężkich, w tym niklu [13], które mogą działać jako tzw. hapteny i w ten sposób stymulować odpowiedź układu immunologicznego.

Innego rodzaju wpływem na układ odpornościowy może być zdolność pewnych substancji do indukowania apoptozy limfocytów [10]. Jak dotąd, w literaturze brak danych na temat wykazywania takich właściwości przez białka łubinowe czy też doniesień o próbach wykonania sprawdzających je testów.

W niniejszej pracy przeprowadzono badania pilotażowe, których celem było uzupełnienie charakterystyki białek łubinowych poprzez sprawdzenie ich zdolności do indukowania apoptozy ludzkich limfocytów. Do oceny takich właściwości łubinowych protein po raz pierwszy zastosowano metodę cytometrycznego pomiaru aktywności kaspaz.

Materiały i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły rozdrobnione w warunkach laboratoryjnych i pozbawione łuski nasiona łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*, odmiana Baron), z których ekstrahowano białko.

Materiał do założenia hodowli stanowiły limfocyty izolowane z krwi (pobranej w Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa w Poznaniu) osoby (kobieta, lat 59) cierpiącej na alergię z powodu długotrwałego zawodowego kontaktu z łubinem. Symptomy alergii u tej kobiety (objawy nosowo-spojówkowe, duszność wdechowa i wydechowa, OAS, objawy ogólne) pojawiały się wskutek wdychania pyłu z rozdrobnionych nasion łubinu, jak również spożywania produktów z jego dodatkiem. U badanej osoby nie występowały reakcje alergiczne w dzieciństwie ani wcześniej w życiu dorosłym. Testy skórne wykazały słabo dodatnią (+) odpowiedź na groszek zielony. Wyniki testów komercyjnych były ujemne.

Poszczególne etapy doświadczenia to: ekstrakcja białek łubinu, izolacja limfocytów z krwi, założenie hodowli komórkowej oraz cytometryczny pomiar apoptozy.

Na badania z wykorzystaniem materiału ludzkiego uzyskano pozwolenie Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Poznaniu.

Ekstrakcja białek łubinu

Preparat łubinowy (1 g) zawieszano w 6 ml buforu Tris- HCl (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 500 mM NaCl). Po dokładnym wymieszaniu zawiesinę inkubowano 0,5 h w temp. 4°C, a następnie wirowano (Hermle Z400K) przez 20 min, przy 400 x g. Do supernatantu dodawano 4 M siarczan(VI) amonu do końcowego stężenia 0,2 M. Roztwór umieszczano na 30 min w kuwecie z lodem. Po upływie tego czasu roztwór wirowano przez 20 min, przy 10000 x g. W supernatancie oznaczano stężenie białka metodą Bradford [2]. Otrzymany ekstrakt białkowy oczyszczano, stosując filtry mikrobiologiczne Millex-GV o średnicy porów 0,2 µm (Millipore). Tak przygotowany ekstrakt białkowy przechowywano w temp. 4°C, nie dłużej niż jeden miesiąc.

Izolacja limfocytów

Krew, w ilości 10 ml, pobierano jałowo do probówek typu S-Monovette (Sarstedt) zawierających kryształki heparyny litowej. Wszystkie etapy izolacji limfocytów wykonywano przy stole o laminarnym przepływie powietrza (Microflow Microsafe SL).

Pobraną krew przenoszono do probówek wirówkowych (Blue MaxTMJr. Polypropylene Conical Tube), (Becton-Dickinson Labware) i rozcieńczano medium hodowlanym (D-MEM), (Gibco) w stosunku 1:1, dodając gentamycynę (Polfa Tarchomin) do stężenia końcowego 40 µg/ml. Tak przygotowaną mieszaninę podwarstwiano za pomocą igły punkcyjnej, roztworem gradientowym (Gradisol L), (Aqua Medica) w stosunku 3:1 i wirowano przez 30 min przy 400 x g (Hermle Z400K). Wyodrębnioną po wirowaniu warstwę limfocytów (interfaza) zbierano delikatnie i zawieszano w 5 ml płynu Hanksa (HBSS), (Gibco), wzbogaconego gentamycyną, o stężeniu końcowym 40 µg/ml. Mieszaninę wirowano przez 10 min, przy 400 x g. Osad limfocytów zawieszano w 5 ml 0,9% NaCl i wirowano przez 10 min przy 300 x g. Osad komórek ponownie zawieszano w 5 ml 0,9% NaCl, po czym ustalano liczbę wyizolowanych limfocytów, zliczając je za pomocą cytometru przepływowego (Cyturon Absolute), (Ortho Diagnostic Systems, A Johnson&Johnson Company). Mieszanina przygotowana do liczenia komórek zawierała 100 µl limfocytów zawieszonych w 0,9% NaCl oraz 400 µl płynu lizującego (Ortho Diagnostic Systems, A Johnson&Johnson Company). Zawiesinę wyizolowanych limfocytów rozcieńczano do stężenia 2 mln komórek/ml za pomocą D-MEM wzbogaconego gentamycyną (końcowe stężenie 40 µg/ml) i surowicą z dziesięciodniowych cieląt (NCS), (Gibco) o końcowym stężeniu 10%. Tak przygotowane limfocyty stanowiły materiał do założenia hodowli.

Założenie hodowli limfocytów

Hodowlę prowadzono w jałowych płytkach 96-dołkowych, płaskodennych (TC plates, flat bottom), (Sarstedt). W fazie początkowej do każdego dołka dodawano po 100 μ l przygotowanej wcześniej zawiesiny limfocytów o stężeniu 2 mln komórek/ml oraz odpowiednio: A – 100 μ l fitohemaglutyniny roślinnej (PHA), (Wellcome) rozpuszczonej w D-MEM, do stężenia końcowego 10 μ g/ml (kontrola pozytywna); B – 100 μ l ekstraktu białka łubinowego, rozpuszczonego w D-MEM, do stężenia końcowego 10 μ g/ml (próba badana); C – 100 μ l D-MEM (kontrola negatywna). Tak przygotowane płytki umieszczano w inkubatorze do hodowli komórkowych (CO₂ Incubator), (ASSAB Medicin AB). Hodowlę prowadzono przez 48 h, przy nasyceniu powietrza 5% CO₂, w temp. 37°C. Doświadczenie wykonywano trzykrotnie w każdym wariancie.

Cytometryczny pomiar apoptozy

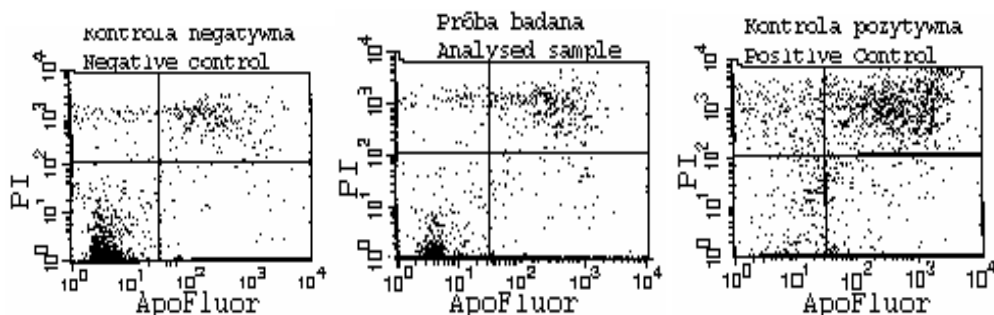
Podczas analizy cytometrycznej korzystano z zestawu do detekcji apoptozy z zastosowaniem barwienia dwukolorowego (ApoFluor^R Green Apoptosis Detection Kit), (ICN Biomedicals). Po 48 h od momentu rozpoczęcia hodowli zawiesinę komórkową (po 300 μ l z każdego wariantu doświadczenia) przenoszono do sterylnych tub. Do każdej z nich dodawano po 10 μ l barwnika 30X ApoFluor Green, po czym mieszano, delikatnie obracając tuby. Wybarwianą zawiesinę komórek pozostawiano przez 1 h (bez dostępu światła) w inkubatorze do hodowli komórkowych, przy nasyceniu powietrza 5% CO₂, w temp. 37°C. W celu wymieszania zawartości tub dwukrotnie przerywano okres inkubacji. Po 1 h do zawiesiny komórkowej dodawano 2 ml 1X buforu myjącego. Próby starannie mieszano, a następnie wirowano przy 400 x g przez 5 min. Supernatant usuwano, a komórki zawieszano, dokładnie rozbijając osad, w 1 ml 1X buforu myjącego i powtarzano etap płukania. Po drugim płukaniu do komórek dodawano 400 μ l 1X buforu myjącego, a następnie 2 μ l PI (jodku propidionowego) i mieszano kilkakrotnie obracając tuby. Próby pozostawiano przez 1 h bez dostępu światła w kuwecie z lodem, po czym mierzono aktywność kaspazową wybarwionych komórek z wykorzystaniem cytometru przepływowego.

Wyniki i dyskusja

Wykonywane badania miały na celu scharakteryzowanie immunogennych właściwości łubinowych protein poprzez sprawdzenie ich zdolności do indukowania apoptozy ludzkich limfocytów. Zastosowana, pierwszy raz w odniesieniu do łubinu, metoda umożliwiła sprawdzenie poziomu apoptozy komórek po podaniu badanego ekstraktu białka łubinowego poprzez ocenę aktywności kaspaz.

W przeprowadzonych analizach wykazano prawie dwukrotnie wyższą, w stosunku do próby kontrolnej, aktywność kaspazową wśród limfocytów, którym

podano ekstrakt białka łubinowego (rys. 1 i 2). Stwierdzono również przeszło trzykrotnie słabszą aktywność kaspaz w komórkach poddanych działaniu łubinowych protein niż w limfocytach, którym podano fitohemaglutyninę roślinną (PHA) (rys. 1 i 2).



Rys. 1. Ogólny obraz populacji limfocytów hodowlanych.

Fig. 1. Overall view of events in a lymphocyte culture.

Cytogramy:

Część dolna prawa wykresu – odsetek komórek żywych, w których zaobserwowano wzmożoną aktywność kaspaz (indukcja apoptozy); część dolna lewa wykresu – komórki żywe, niewykazujące aktywności kaspazowej;

Część górna prawa wykresu – komórki martwe (apoptyczne i nekrotyczne); część górna lewa wykresu – komórki martwe, nekrotyczne.

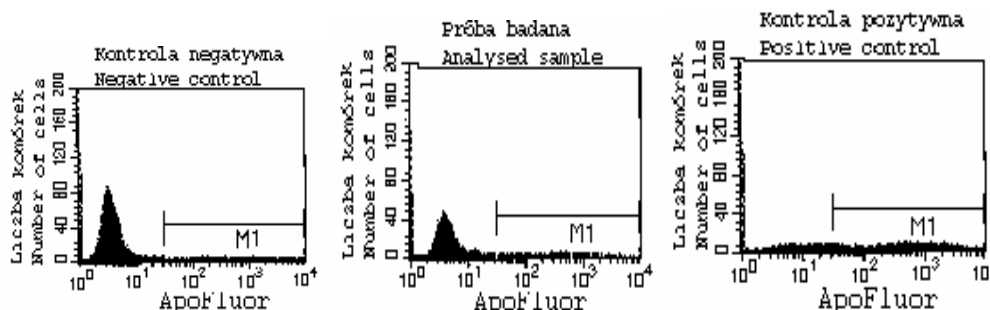
Cytograms:

LR – living, caspase-positive cells in which an increased activity of caspases was stated (induction of apoptosis); LL – living, caspase-negative cells showing no activity of caspases;

UR – dead cells (apoptotic and necrotic); UL – dead, necrotic cells.

Uzyskane wyniki pozwalają wstępnie wnioskować o zdolności białek łubinu do indukowania programowanej śmierci komórki (apoptozy) w populacji ludzkich limfocytów.

Świadczy o tym wzmożona aktywność kaspaz (enzymów szlaku apoptycznego) w komórkach, które poddano działaniu ekstraktu łubinowych protein. Aktywność tę zaobserwowano u 6,19% komórek całej populacji hodowlanej (wartość średnia z trzech pomiarów). Jest ona zdecydowanie silniejsza w stosunku do aktywności kaspaz, widocznej w populacji kontrolnej limfocytów (3,33%), choć nie tak duża jak w komórkach poddanych działaniu silnego induktora apoptozy (PHA) (22,36%).



Rys. 2. Liczba komórek w populacji hodowlanej ulegająca apoptozie.

Fig. 2. The number of apoptotic events in the lymphocyte culture undergoing apoptosis.

Histogramy:

Bramka M1 – komórki z aktywnymi kaspazami; pik przed bramką M1 – komórki niewykazujące aktywności kaspazowej.

Histograms:

Peak before the M1 region: Caspase-negative cells (they occur to the left of the M1 region); M1 Gate: caspase-positive cells (they lie within the M1 region).

Uruchomienie programowanej śmierci komórki w populacji limfocytów może być efektem pobudzenia tych komórek przez białka łubinu do nadmiernych podziałów. Zjawisko proliferacji limfocytów jest odpowiedzią tych komórek na kontakt z czynnikiem szkodliwym dla organizmu. Ma ono na celu neutralizację oraz usunięcie poza ustrój czynnika szkodliwego. Naturalnym następstwem proliferacji limfocytów jest ich apoptoza, powodująca delecję komórek, które spełniły już swoją funkcję eliminacji antygeny i stają się zbędne dla organizmu. W tym kontekście powodowanie apoptozy przez łubinowe proteiny świadczy o ich niekorzystnym wpływie na organizm człowieka.

Istnieje też duże prawdopodobieństwo, że poza wykazanim, niespecyficznym stymulowaniem apoptozy limfocytów, będącej efektem ich proliferacji, białka łubinu mogą specyficznie indukować podziały tych komórek w organizmie człowieka. Mimo, iż jednoznacznie nie udowodniono jeszcze zależności pomiędzy apoptozą a występowaniem alergii, taki mechanizm działania łubinowych protein może być jedną z przyczyn występowania objawów reakcji alergicznej u osób, które spożywały produkty zawierające dodatek łubinu [5, 7, 8, 9, 11, 14, 15] lub narażone były na inhalację pyłu z mąki łubinowej [3, 12].

Aby jednak odpowiedzieć na pytanie czy białka łubinowe mają zdolność do specyficznego stymulowania limfocytów człowieka do podziałów i w efekcie do apoptozy, niezbędne jest przeprowadzenie dodatkowych testów, z udziałem większej grupy reprezentatywnej osób atopowych i nieatopowych, jako grupy kontrolnej.

Dokładne zbadanie wpływu wywieranego przez łubinowe proteiny na komórki układu immunologicznego człowieka może przyczynić się do wyeliminowania

czynników ograniczających zastosowanie preparatów białka łubinowego w żywności i żywieniu.

Wnioski

1. Zastosowana w badaniach, mających charakter pilotażowy, metoda cytometrycznej oceny apoptozy na podstawie pomiaru aktywności kaspaz umożliwiła:
 - uzupełnienie informacji na temat oddziaływań łubinowych protein na układ immunologiczny człowieka,
 - ustalenie, że białka te mają zdolność inicjowania programowanej śmierci komórki w populacji ludzkich limfocytów, manifestowanej jednak znacznie słabiej w porównaniu z fitohemaglutyniną roślinną (PHA), powszechnie znaną jako silny induktor apoptozy.
2. Rezultaty przeprowadzonych badań dowodzą, że białka łubinu mają niespecyficzny wpływ na limfocyty człowieka.

Literatura

- [1] Barnett D., Bonham B., Howden M.E.H.: Allergenic cross-reactions among legume foods. An in vitro study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1987, **79**, 433.
- [2] Bradford M.: A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- [3] Crespo J.F., Rodriguez J., Vives R., James J.M., Reano M., Daroca P., Burbano C., Muzquiz M.: Occupational IgE-mediated allergy after exposure to lupine seed flour. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, **108**, 295-297.
- [4] Faeste C.K., Lovik M., Wiker H.G., Egeas E.: A case of peanut cross-allergy to lupine flour in a hot dog bread. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004, **135**, 36-39.
- [5] Hefle S., Lemnske R.F., Bush R.K.: Adverse reaction to lupine-fortified pasta. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1994, **52 Suppl 37**, 113-114.
- [6] Lampart-Szczapa E.: Łubin jako potencjalny surowiec białkowy w produkcji żywności. *Rozprawy Naukowe, zeszyt 279. Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Poznań 1998.*
- [7] Matheu V., De Barrio M., Sierra Z., Gracia-Bara M.T., Tornero P., Baeza M.L.: Lupine-induced anaphylaxis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 1999, **83**, 406-408.
- [8] Mazeyrat R., Thibault M., Asensi D., Ponvert C.: Sensitisation to lupine flour: Evaluation of risk in peanut-allergic children. Poster from the 23rd European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Amsterdam 2004.
- [9] Moneret-Vautrin D.-A., Guerin L., Kanny G., Flabbee J., Fremont S., Morisset M.: Cross-allergenicity of peanut and lupine: the risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, **104**, 883-888.
- [10] Mooren F.C., Blomling D., Lechtermann A., Lerch M.M., Volker K.: Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J. Appl. Physiol.*, 2002, **93**, 147-153.
- [11] Novembre E., Moriondo M., Berardini R., Azzari C., Rossi M.E., Vierucci A.: Lupine allergy in a child. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999, **103**, 1214-1216.
- [12] Parisot L., Aparicio C., Moneret-Vautrin D.-A., Guerin L.: Allergy to lupine flour. *Allergy*, 2001, **56**, 918-919.

- [13] Reeves R.D.: Tropical hyper-accumulators of metals and their potential for phytoextraction. *Plant and Soil*, 2003, **249** (1), 57-65.
- [14] Romano C., Ferrara A., Tarallo S.: Allergic reaction to lupine seed (*Lupinus albus*). *Allergy*, 1997, **52 Suppl 37**, 113-114.
- [15] Tomaz E., Viseu R., Reis R., Lourenco M., Inacio F., Martins L.: Allergic sensitization to lupine seed. Poster from the 23rd European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Amsterdam 2004.

THE CYTOMETRIC ANALYSIS OF APOPTOSIS BASED ON THE MEASURED ACTIVITY OF CASPASES AS A METHOD OF EVALUATING THE IMPACT OF PROTEINS CONTAINED IN NARROW-LEAFED LUPINE (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS*, VAR. BARON) ON THE HUMAN IMMUNE SYSTEM

S u m m a r y

Lupine seed proteins are characterized by a high nutritional value and by functionality, and, owing to these properties they are more and more frequently used in human nutrition. However, its disadvantageous impact on the cells of the man's immunological system is a factor limiting their use as a food component.

For the purpose of investigating this impact, lupine seed proteins (*L. angustifolius*, Baron variety) were analyzed, and their ability to induce apoptosis in cultured human lymphocytes was examined using a cytometric measurement method of the activity of caspases.

Lymphocytes isolated from the blood of an atopic person constituted the investigation material. The cultured lymphocytes were treated with: apoptosis inducer (phytohemagglutinin 'PHA') and an extract of the lupine seed protein, respectively. The cytometric analysis of the activity of caspases was performed 48 hours after the cell culture was set up.

It was shown that the activity of caspases in lymphocytes was higher compared to a control sample which was treated with an extract of the lupine protein. The results obtained prove that lupine proteins have a potential to induce apoptosis (i.e. an increased activity of caspases) in the cultured human lymphocytes.

Key words: lupine, proteins, apoptosis, caspases, lymphocytes, flow cytometry ☒