

PATRYCJA KŁOS, ANNA ŁOZA, ELEONORA LAMPART-SZCZAPA,
JACEK KARCZEWSKI

OCENA LEKTYNOPODOBNYCH WŁAŚCIWOŚCI GLOBULIN Z NASION ŁUBINU WĄSKOLISTNEGO (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS*, ODM. BARON)

Streszczenie

Łubin, w porównaniu z innymi roślinami strączkowymi, zawiera niewielkie ilości związków antyżywniowych, w tym lektyn. Dowiedziono jednak, że w jego nasionach znajdują się substancje lektynopodobne, co może być czynnikiem ograniczającym zastosowanie łubinu w żywieniu człowieka.

Celem przeprowadzonych badań była ocena lektynopodobnych właściwości globulin łubinu wąskolistnego poprzez sprawdzenie, czy białka te mogą stymulować proliferację limfocytów oraz powodować aglutynację erytrocytów człowieka.

Wyizolowane erytrocyty poddawano działaniu wybranych frakcji białkowych. Wynik doświadczenia oceniano mikroskopowo. Limfocytom w hodowli podawano odpowiednio: frakcje globulinowe oraz mitogen. Na podstawie ilości inkorporowanej do DNA limfocytów znakowanej radioaktywnie tymidyny określano stopień proliferacji. Proliferację limfocytów oceniano również z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Wśród erytrocytów poddanych działaniu łubinowych globulin nie zaobserwowano zjawiska aglutynacji. Podobnie, w populacji limfocytów inkubowanych z badanymi białkami łubinu nie stwierdzono podwyższonego poziomu proliferacji komórek. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że badane frakcje globulin łubinu nie wykazują typowej dla lektyn zdolności aglutynowania erytrocytów. Nie indukują również proliferacji limfocytów. Otrzymane wyniki świadczą o tym, że białka te, spożyte z pokarmem, nie mogą spowodować wystąpienia reakcji odpornościowej, wywołanej zlepianiem i aktywacją limfocytów, czy hemaglutynacją.

Słowa kluczowe: globuliny łubinu, właściwości lektynopodobne, aglutynacja, proliferacja

Wprowadzenie

Nasiona łubinu, coraz częściej stosowane w przemyśle spożywczym w krajach Europy Zachodniej i Australii, są, obok soi, uznawane za najbogatsze źródło warto-

Dr P. Kłos, mgr inż. A. Łoza, dr hab. E. Lampart-Szczapa, Katedra Biochemii i Analizy Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań, dr J. Karczewski Katedra Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań

ściowego białka roślinnego [5, 24]. O ich atrakcyjności stanowi korzystny skład aminokwasowy białka, porównywalny z pełnowartościowym białkiem sojowym oraz zawartość wielu związków o właściwościach potencjalnie prozdrowotnych, jak choćby błonnik [17], związki fenolowe czy tokoferole [20]. Wszystkie te zalety sprawiają, że nasiona łubinu są przydatnym surowcem do produkcji żywności funkcjonalnej [6, 17, 25] oraz żywności specjalnego przeznaczenia [30].

Rodzina strączkowych, do której należy łubin, obfituje w gatunki zawierające znaczne ilości substancji antyżywniowych, w tym lektyn. Substancje te mogą wywołać reakcję odpornościową, poprzez związanie się z receptorami na powierzchni komórek układu immunologicznego i ich aktywowanie. Odpowiadają także za aglutynację czerwonych krwinek [1, 4, 21]. W przeciwieństwie do większości roślin strączkowych, łubin zawiera niewielkie ilości lektyn i innych substancji antyżywniowych [20]. Dowiedziano jednak, że wśród globulin nasion łubinu znajdują się substancje o właściwościach lektynopodobnych, wiążące N-glikozylowane białka [10, 12]. Ustalono też, że ekstrakty białkowe z nasion łubinu białego mają właściwości aglutynujące [13].

W literaturze światowej liczne są doniesienia na temat występowania reakcji alergicznej po spożyciu produktów wzbogaconych łubinem [8, 11, 23, 27]. Silne właściwości alergizujące łubinowych białek przyczyniły się do umieszczenia łubinu na liście głównych alergenów pokarmowych, obok białek mleka, jaja, czy soi oraz wprowadzenia obowiązku znakowania produktów wzbogaconych łubinem [7]. Jak dotąd, brak jednak informacji na temat mitogennego oddziaływania białek łubinu na komórki układu immunologicznego, pomimo wykrycia wśród globulin łubinu białek o właściwościach zbliżonych do lektyn. Brak również doniesień na temat aglutynowania erytrocytów człowieka przez białka pochodzące z nasion łubinu wąskolistnego, będącego najbardziej popularnym gatunkiem uprawnym łubinu (obok łubinu żółtego) w Polsce [30].

Celem badań było przeanalizowanie właściwości lektynopodobnych globulin z nasion łubinu wąskolistnego poprzez sprawdzenie czy białka te mogą, podobnie jak większość lektyn, stymulować podziały komórkowe limfocytów oraz powodować aglutynację erytrocytów człowieka. Takie właściwości białek łubinu, będących składnikiem żywności, mogłyby mieć negatywny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego człowieka.

Materiał i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły wybrane frakcje globulin łubinu wąskolistnego, odmiany Baron, uzyskane w wyniku ekstrakcji [14] i filtracji żelowej globulin. Ekstrakcję prowadzono przez 4 h, w temp. pokojowej, z użyciem buforu o pH 8, zawierającego: 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂ oraz 1 mM PMSF. Filtrację żelową wykonywano w kolumnie chromatograficznej (szklana kolumna, 45 cm x 3 cm, Labart) wypełnionej zło-

żem Sephadex G 200 (Sigma). Na szczyt kolumny nanoszono 10 ml uzyskanego ekstraktu globulinowego. Rozdział prowadzono przy prędkości przepływu 0,76 ml/min, stosując 50 mM bufor Tris-HCl, pH 7,5 w ilości równej całkowitej objętości kolumny. W otrzymanych frakcjach oznaczano stężenie białka metodą wg Bradford [3]. Profil elucyjny globulin przedstawiono na rys. 1. Do badań wybrano trzy frakcje globulinowe (1, 2, 3), o największym stężeniu białka, wynoszącym odpowiednio: 676, 177 i 144 µg/ml. Elektroforetyczną ocenę mas cząsteczkowych badanych frakcji wykonywano metodą wg Laemmli [19], w 10 % żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS.

W testach proliferacji limfocytów i aglutynacji erytrocytów używano krwi uzyskanej od pięciu zdrowych dawców (po 10 ml) (Wojewódzka Stacja Krwiodawstwa w Poznaniu). W przypadku testów proliferacji krew pobierano na kryształki heparyny litowej (S-Monovette[®], Sarstedt), do testów aglutynacji – na cytrynian sodu (POCH). Na badania na tkankach ludzkich uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Poznaniu (numer uchwały: 1139/05).

Ilościowy odczyn aglutynacji (wg Kabat i Mayer) [18]

Krew pobierano do probówek zawierających 0,38 % roztwór cytrynianu sodu (cztery objętości krwi na jedną objętość cytrynianu). Po dokładnym wymieszaniu krew sączono przez warstwę gazy do probówki wirówkowej i wirowano (300 x g, 5 min). Po zebraniu surowicy krwinki zawieszano w płynie fizjologicznym (0,9 % NaCl) (do 10 ml) i wirowano (300 x g, 5 min). Supernatant usuwano, a krwinki płukano jeszcze dwukrotnie. Po ostatnim wirowaniu (200 x g, 5 min) krwinki zawieszano w płynie fizjologicznym, w stosunku 1:10. Do dołków płytki 96-dołkowej nakrapiano po 50 µl zawiesiny krwinek uzyskanej z krwi grupy A, B lub 0, a następnie uzupełniano do 100 µl frakcjami globulinowymi (odpowiednio: frakcją nr 1, 2 lub 3). Stężenie białka w badanych frakcjach wcześniej wyrównywano za pomocą 50 mM buforu Tris-HCl, pH 7,5. Kontrolę ujemną stanowiły krwinki inkubowane w roztworze soli fizjologicznej. W kontroli dodatniej zawiesinę krwinek poddawano działaniu PHA (Sigma, nr kat. L9132). Krwinki inkubowano następnie z badanymi globulinami przez 30 min, w temp. 37 °C, w inkubatorze Kebo Assab (Kebo Assab AB). Po tym czasie preparaty nanoszono na szkiełka podstawowe i oglądano pod mikroskopem (Olympus BX50) przy powiększeniu x 100, z użyciem olejku imersyjnego.

Założenie hodowli limfocytów (wg Seski i wsp.) [28]

Z krwi pobieranej na heparynę litową izolowano limfocyty, stosując metodę wg Boyum i wsp. [2]. Rozcieńczoną podłożem hodowlanym (D-MEM) (Gibco, nr kat. 31885-023), w stosunku 1:1, krew podwarstwiano roztworem gradientowym Gradisol L (Aqua Medica, nr kat. H9003C) (3:1) i wirowano (30 min, 400 x g). Wyodrębnioną

po wirowaniu interfazę zbierano i uzupełniano (do 20 ml) płynem Hanksa (HBSS) (Gibco, nr kat. 24020-091), wzbogaconym gentamycyną (1 ml/100 ml płynu), a następnie wirowano (10 min, 400 x g). Osad limfocytów przepłukiwano HBSS z dodatkiem gentamycyny (w ilości - jak wyżej). W otrzymanym osadzie komórek ustalano liczbę limfocytów, zliczając je za pomocą cytometru przepływowego Cytoron Absolute (Ortho Diagnostic Systems, A Johnson&Johnson Company). Zawiesinę wyizolowanych limfocytów rozcieńczano do stężenia 4 mln komórek/ml za pomocą D-MEM wzbogaconego gentamycyną (1 ml/100 ml medium) i surowicą cielecą płodową (Gibco, nr kat. 10106-151) o końcowym stężeniu - 10 %. Tak przygotowane limfocyty stanowiły materiał do założenia hodowli. Hodowlę limfocytów prowadzono w jałowych płytkach 96-dółkowych, U-kształtnych. W fazie początkowej do każdego dołka dodawano po 100 μ l przygotowanej wcześniej zawiesiny limfocytów o stężeniu 4 mln komórek/ml oraz odpowiednio:

- A/ po 100 μ l fitohemaglutyniny roślinnej PHA, rozpuszczonej w D-MEM do stężenia 2 μ g/ml (kontrola dodatnia),
- B/ po 100 μ l odpowiedniej frakcji globulinowej (próby badane), rozpuszczonej w D-MEM do stężenia 2 μ g/ml,
- C/ po 100 μ l D-MEM (kontrola ujemna).

Tak przygotowane płytki umieszczano w inkubatorze do hodowli komórkowych. Hodowlę prowadzono (w zależności od jej przeznaczenia) przez 24 lub 72 h, przy nasyceniu powietrza 5 % CO₂, w temp. 37 °C.

Cytometryczny pomiar proliferacji limfocytów

Po upływie 24 h od momentu założenia hodowli, przenoszono po 50 μ l zawiesiny komórkowej do szklanych probówek. Do wszystkich dodawano, starannie mieszając, po 2 μ l przeciwciał skierowanych przeciwko cząsteczkom CD3, znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) (BD Pharmingen, nr kat. 555339) oraz przeciwciał przeciwko cząsteczkom CD25, znakowanych FITC (BD Pharmingen, nr kat. 555431). Próby inkubowano przez ok. 20 min, w ciemności. Po tym czasie dodawano do nich po 400 μ l płynu do lizy erytrocytów (8,26 g/l NH₄Cl, 1,0 g/l K₂CO₃, 0,037 g/l EDTA, pH 7,2), a następnie dokonywano pomiaru stopnia proliferacji limfocytów, przy użyciu cytometru przepływowego FACScan (Becton Dickinson).

Ocena proliferacji limfocytów z wykorzystaniem znakowanej H³-tymidyny (wg Seski i wsp.) [28]

W trzecim dniu od momentu założenia hodowli (72 h) komórkom podawano znakowaną H³-tymidynę (Prospecta, nr kat. 24041) w ilości 1 μ l/studzienkę. Po sześciu

godzinach inkubacji z H^3 -tymidyną, hodowle przenoszono na filtry (Whatman). Filtry suszono w temperaturze pokojowej, a następnie umieszczano w rękawach foliowych z 4 ml płynu scyntylacyjnego (PerkinElmer, nr kat. 1200-437) i mierzono radioaktywność w liczniku scyntylacyjnym MicroBeta[®] TRILUX (Wallac). Na podstawie ilości inkorporowanej do DNA limfocytów, znakowanej radioaktywnie tymidyny, określano stopień proliferacji komórek.

Otrzymane wyniki poddawano obróbce statystycznej, wykorzystując do tego celu program Statistica[™] PL 7.0 (StatSoft). W celu określenia czy próba losowa pochodzi z populacji o rozkładzie normalnym stosowano test Shapiro-Wilka. W celu porównania wartości średnich badanych cech wykorzystano analizę wariancji w odniesieniu do układów czynnikowych o zróżnicowanej bądź równej liczbie obserwacji, a różnice międzygrupowe oceniono testem Tukey'a przy równej liczności prób. W zastosowanych testach wartość $p < 0,05$ była uważana za statystycznie istotną.

Wyniki i dyskusja

Spośród uzyskanych w wyniku filtracji żelowej frakcji globulinowych, do badań wybrano trzy (frakcje nr 1, 2 i 3), o najwyższym stężeniu białka, wynoszącym odpowiednio: 676, 177 i 144 $\mu\text{g/ml}$ (rys. 1).

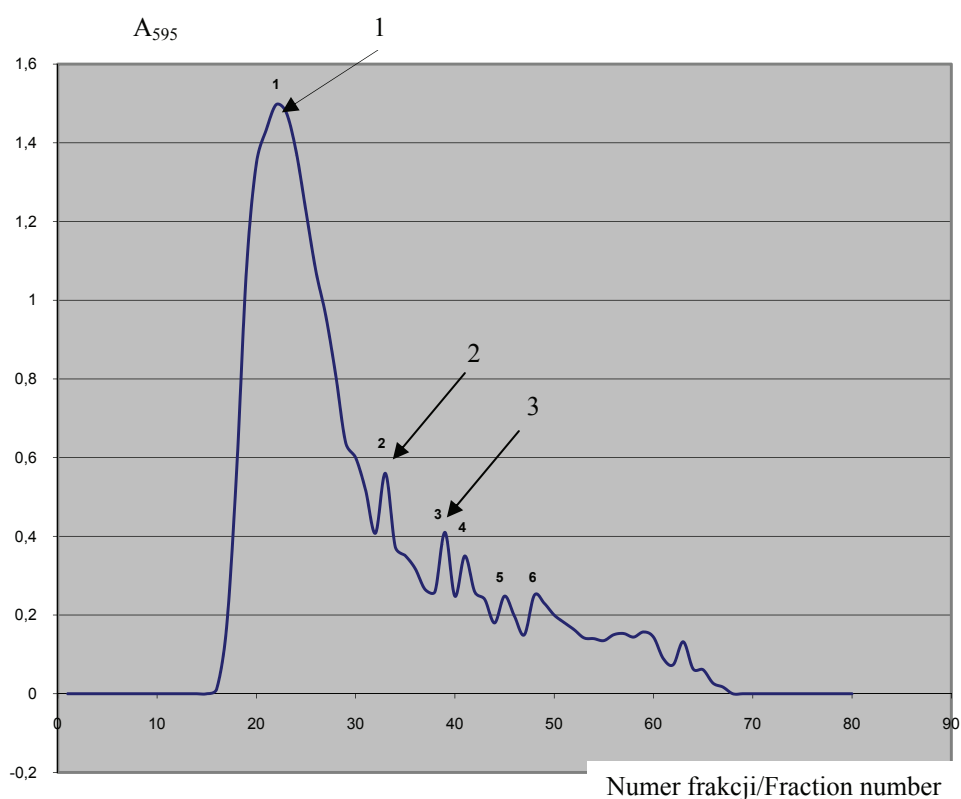
Elektroforetyczna ocena mas cząsteczkowych badanych frakcji globulin łubinu wykazała obecność białek o wielkości $35 \cdot 10^3$ - $55 \cdot 10^3$ Da, we frakcji nr 1 oraz białek o masach cząsteczkowych ok. $35 \cdot 10^3$, $40 \cdot 10^3$, $55 \cdot 10^3$ i $90 \cdot 10^3$ Da, we frakcjach nr 2 i 3 (fot. 1).

Właściwości aglutynujące globulin zawartych w badanych frakcjach badano poprzez inkubację poszczególnych frakcji białkowych z erytrocytami izolowanymi z krwi człowieka, w układzie grupowym A, B, 0. W obserwowanych pod mikroskopem preparatach erytrocytów nie zaobserwowano obecności, charakterystycznych dla aglutynujących krwinek, konglomeratów komórek (fot. 2 i 3). Na tej podstawie stwierdzono, że żadna z badanych frakcji nie miała, typowej dla lektyn, zdolności aglutynowania czerwonych krwinek.

W celu oceny mitogennych właściwości globulin łubinu zastosowano cytometryczną ocenę proliferacji komórek. Metoda ta pozwala oszacować ilość limfocytów T (stanowiących większą część populacji limfocytów), ulegających proliferacji pod wpływem badanej substancji.

Badane globuliny łubinu nie wykazywały właściwości mitogennych w stosunku do limfocytów człowieka (rys. 2). Ilość proliferujących limfocytów T, poddanych działaniu łubinowych globulin, w niewielkim stopniu różniła się statystycznie od ilości proliferujących komórek, hodowanych jedynie z pożywką (kontrola ujemna). Poziomy proliferacji w populacji komórek poddanych działaniu frakcji nr 2 i 3 (białka o masach cząsteczkowych $35 \cdot 10^3$, $4 \cdot 10^3$, $55 \cdot 10^3$ i $90 \cdot 10^3$ Da) nie różniły się statystycznie między

sobą i były niewiele niższe od poziomu proliferacji komórek kontrolnych. Liczba dzielących się limfocytów T, hodowanych w obecności globulin z frakcji nr 1 (białka o wielkości $35 \cdot 10^3 - 55 \cdot 10^3$ Da), różniła się nieznacznie statystycznie od ilości dzielących się komórek, poddanych działaniu pozostałych dwóch frakcji i była nieznacznie wyższa od liczby limfocytów kontrolnych. Statystycznie istotne różnice poziomu proliferacji komórek zaobserwowano natomiast pomiędzy populacjami limfocytów hodowanych w obecności analizowanych frakcji, a populacją limfocytów, którym podano mitogen (kontrola dodatnia). Poziom ten był znacząco wyższy w komórkach poddanych działaniu PHA (rys. 2).

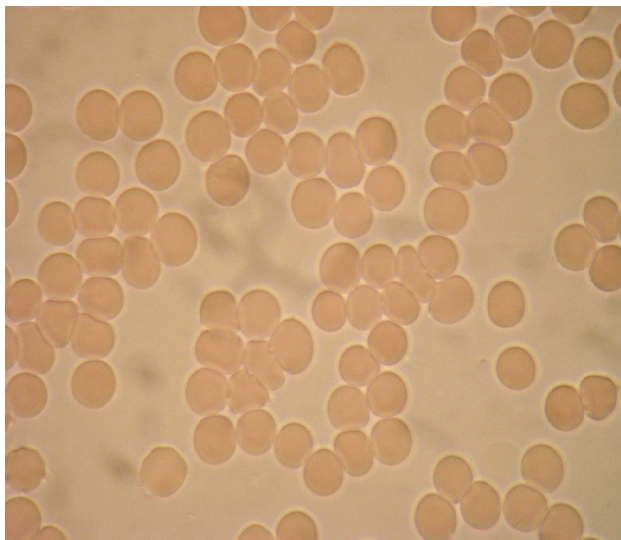
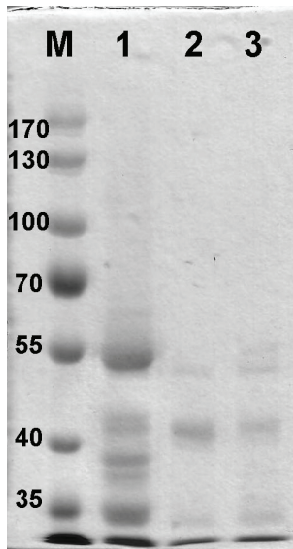


Objaśnienia: / Explanatory notes:

1, 2, 3 – frakcje globulinowe o najwyższym stężeniu białka (odpowiednio: 676, 177 i 144 $\mu\text{g/ml}$) / globulin fractions with the highest protein concentration (676, 177 and 144 $\mu\text{g/ml}$, respectively); A_{595} – absorbancja przy $\lambda=595$ nm / absorbance at $\lambda=595$ nm.

Rys. 1. Rozdział globulin łubinu w kolumnie chromatograficznej

Fig. 1. The separation of lupin globulins in a chromatographic column.

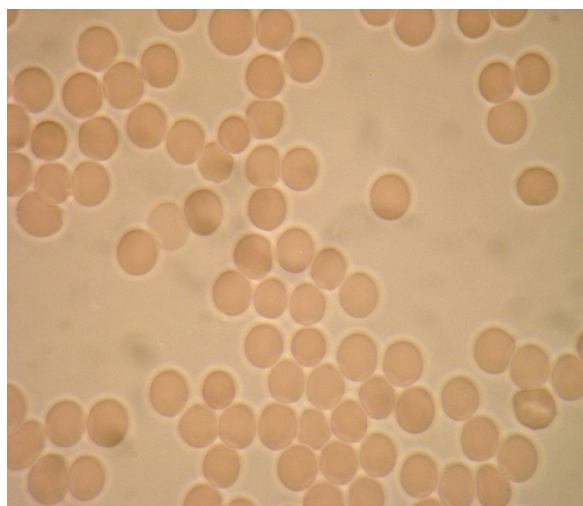


Fot. 1. Elektroforegram SDS-PAGE trzech badanych frakcji globulinowych (1, 2, 3). M – wzorzec mas cząsteczkowych (10^3 Da).

Fot. 2. Krwinki grupy B inkubowane z frakcją globulinową nr 2 (powiększenie x100).

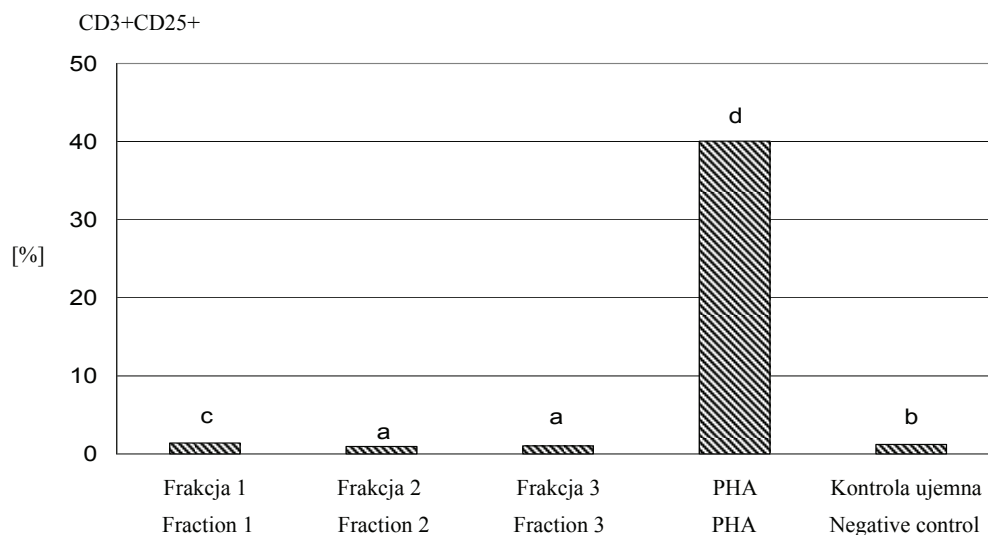
Phot. 1. Electrophoregram (SDS-PAGE) of the three globulin fractions (1, 2, 3) investigated. M – molecular weight marker (10^3 Da).

Phot. 2. B-group erythrocytes incubated with globulin fraction No. 2 (magnification of 1x100).



Fot. 3. Krwinki grupy B inkubowane w roztworze soli fizjologicznej (0,9 % NaCl), bez dodatku frakcji globulinowych – kontrola ujemna (powiększenie x100).

Phot. 3. B-group erythrocytes incubated with physiological saline (0.9 % NaCl), without the addition of globulin fractions – negative control (magnification by 1x100).

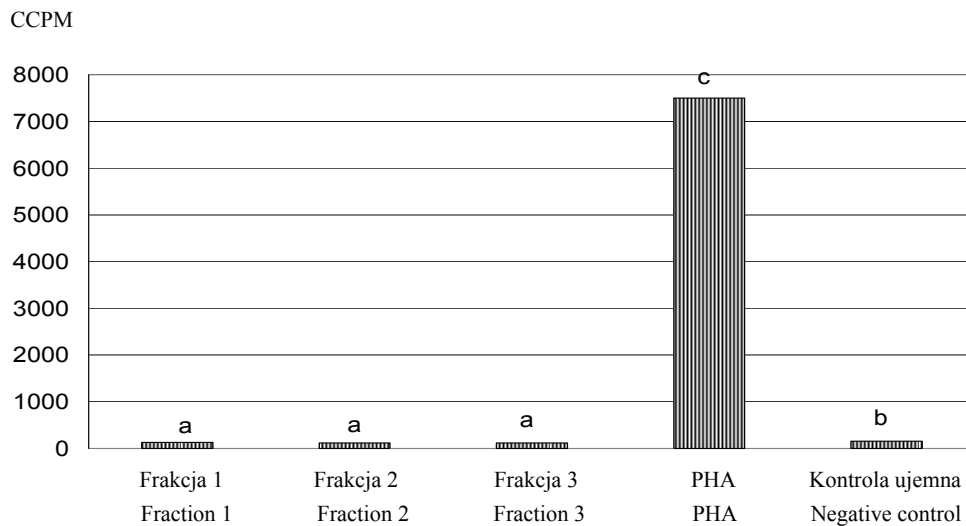


Rys. 2. Poziom proliferacji limfocytów poddanych działaniu badanych frakcji globulinowych oraz mitogenu (PHA). CD3+CD25+ - receptory obecne na powierzchni proliferujących limfocytów T. Ich udział procentowy odzwierciedla ilość dzielących się limfocytów. Inskrypcje literowe oznaczają statystycznie istotną różnicę na poziomie $p < 0,05$.

Fig. 2. Proliferation level of lymphocytes treated with the globulin fractions under analysis and the mitogen (PHA), respectively. CD3+CD25+ - receptors present on the surface of proliferating T lymphocytes. Their per-cent rate of content reflects the amount of proliferating cells. Small letters denote a statistically significant difference ($p < 0.05$).

W celu weryfikacji danych, uzyskanych podczas analizowania podziałów limfocytów pod wpływem frakcji globulinowych, zastosowano metodę oceny proliferacji komórek z wykorzystaniem trytowanej tymidyny. Metoda ta pozwala oszacować ilość wszystkich limfocytów (zarówno T, jak i B), które uległy podziałom. Przeprowadzone badania potwierdziły, że analizowane frakcje globulin łubinu nie mają właściwości mitogennych w stosunku do ludzkich limfocytów (rys. 3). Mimo, że ilość proliferujących limfocytów, poddanych wcześniej działaniu badanych frakcji globulinowych, różniła się statystycznie istotnie od poziomu proliferacji zaobserwowanego wśród limfocytów kontrolnych, różnice te były niewielkie. Poziom proliferacji badanych komórek limfocytów był nieznacznie niższy niż w przypadku populacji limfocytów kontrolnych. Porównując natomiast ilość proliferujących komórek poddanych działaniu mitogenu z poziomem proliferacji w próbach badanych, stwierdzono wystąpienie statystycznie istotnych różnic. Ilość proliferujących limfocytów, którym podczas zakładania hodowli podawano PHA, była znacznie wyższa od ilości dzielących się komórek, które poddano działaniu globulin łubinu. Jednocześnie nie stwierdzono występowania staty-

stycznie istotnych różnic poziomu proliferacji pomiędzy poszczególnymi badanymi próbami.



Rys. 3. Poziom proliferacji limfocytów poddanych działaniu badanych frakcji globulinowych oraz mitogenu (PHA). CCPM – ilość komórek zliczanych w ciągu 1 min. Inskrypcje literowe oznaczają statystycznie istotną różnicę na poziomie $p < 0,05$.

Fig. 3. Proliferation level of lymphocytes treated with the globulin fractions under analysis and the mitogen (PHA), respectively. CCPM – number of cells counted during one minute. Small letters denote a statistically significant difference ($p < 0,05$).

W warunkach *in vivo*, antygeny wnikaające do organizmu wiążą się swoiście z receptorami na powierzchni limfocytów i powodują odpowiedź proliferacyjną tylko określonego ich klonu (od ok. 0,01 do 0,1 % klonów), skierowanego przeciwko danemu antygenowi. Zjawisko to umożliwia unieszkodliwienie, a następnie usunięcie z ustroju czynników patogennych i jest korzystne dla organizmu [15, 22]. Lektyny, wiążąc określone reszty węglowodanowe na powierzchni limfocytów, powodują ich aglutynację, a w konsekwencji poliklonalną aktywację podziałów komórkowych. Dzieje się tak dlatego, że proliferujące komórki nie są specyficzne względem działającego mitogenu [26, 29]. W konsekwencji aktywowania tak dużej liczby limfocytów dochodzi do masowego wytwarzania cytokin prozapalnych, skutkującego zwiększeniem przepuszczalności naczyń krwionośnych i szokiem, co jest zdecydowanie szkodliwe dla organizmu [22]. W tym kontekście wynik badań, świadczący o braku właściwości mitogennych głównych frakcji globulinowych łubinu, jest wiadomością pozytywną. Oznacza bowiem, że białka te mogą być przyjmowane jako składnik pożywienia, bez

obawy o wystąpienie niepożądanego reakcji immunologicznej, spowodowanej zlepianiem i aktywacją limfocytów człowieka.

Brak zdolności aglutynowania czerwonych ciałek krwi jest również korzystnym zjawiskiem. W zlepionych krwinkach może dochodzić do przerwania integralności błony i uwalniania hemu do przestrzeni pozakomórkowej. Hem, który wydostał się z erythrocytu, jest toksyczny dla otaczających tkanek i może pobudzać odpowiedź zapalną, w tym również produkcję wolnych rodników tlenowych przez neutrofile [16].

Pomimo, że globuliny stanowią większość białek nasion łubinu (ok. 87 %) [9], nie można wykluczyć aktywności mitogennej i aglutynującej wśród pozostałych łubiniowych protein. Aby więc ocenić jednoznacznie czy białko łubinu wąskolistnego, będące cennym składnikiem żywności, nie wykazuje zdolności stymulowania podziałów ludzkich limfocytów lub zlepiania czerwonych krwinek, należałoby powyższe badania wykonać także z udziałem pozostałych frakcji globulinowych oraz z frakcją albuminową.

Wnioski

1. Żadna z analizowanych frakcji globulin łubinu wąskolistnego nie wykazuje właściwości mitogennych w stosunku do ludzkich limfocytów.
2. Badane białka nie aglutynują również erythrocytów człowieka.
3. W celu pełnej oceny właściwości lektynopodobnych białek nasion łubinu wąskolistnego niezbędne jest przeanalizowanie pozostałych frakcji globulinowych oraz frakcji albumin.

Praca została zrealizowana w ramach grantu MNiSzW nr 31206831/3782. Była prezentowana podczas XIII Ogólnopolskiej Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Łódź, 28 - 29 maja 2008 r.

Literatura

- [1] Alencar N.M., Assreny A.M., Alencar V.B., Melo S.C., Ramos M.V., Cavada B.S., Cunha F.Q., Ribeiro R.A.: The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vitro neutrophil migration by indirect mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2003, **35**, 1674-1681.
- [2] Boyum A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1968, **21 (97)**, 77-89.
- [3] 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.
- [4] Brando-Lima A.C., Saldanha-Gama R.F., das Gracas M.O. Henriques M., Monteiro-Moreira A.C.O., Moreira R.A., Barja-Fidalgo Ch.: Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: Involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, **205**, 145-154.

- [5] Chew P.G., Casey A.J., Johnson S.K.: Protein quality and physico-functionality of Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* cv. Gungurru) protein concentrates prepared by isoelectric precipitation or ultrafiltration. *Food Chem.*, 2003, **83**, 575-583.
- [6] Chiesa G., Marchesi M., Parolini C., Johnson S.K., Caligari S., Gilio D., Manzoni C., Castiglioni S., Lovati M.R., Sirtori C.R.: Effects of lupin proteins on lipid-lipoprotein metabolism in vitro and in vivo studies. *Proc. Final Conference of Healthy-Profood. Milan 2005*, pp. 139-148.
- [7] Directive 2006/142/EC amending Annex IIIa of Directive 2000/13/EC listing the ingredients which must under all circumstances appear on the labeling of food stuffs: *OJ L 368 p110*, 23.12.2006.
- [8] Dooper M.M.B.W., Holden L., Faeste Ch.K., Thompson K.M., Egaas E.: Monoclonal antibodies against the candidate lupin allergens α -conglutin and β -conglutin. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2007, **143(1)**, 49-58.
- [9] Duranti M., Restani P., Poniatowska M., Cerletti P.: The seed globulins of *Lupinus albus*. *Phytochemistry*, 1981, **20**, 2071-2075.
- [10] Duranti M., Gius C., Scarafoni A.: Lectin-like activity of lupin seed conglutin γ , a glycoprotein previously referred to as a storage protein. *J. Exp. Bot.*, 1995, **46**, 725-728.
- [11] Faeste C., Lovik M., Wiker H.G., Egaas E.: A case of peanut cross-allergy to lupine flour in a hot-dog bread. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004, **135**, 36-39.
- [12] Falcón A.B., Beeckmans S., van Driessche E.: Investigation on the haemagglutinating activity occurring in three species of *Lupinus*. *Cultivos Tropicales*, 2000 A, **21 (1)**, 41-45.
- [13] Falcón A.B., Beeckmans S., Van Driessche E.: Partial purification and characterization of lectin-like activities from *Lupinus albus* seeds. *Cultivos Tropicales*, 2000 B, **21 (4)**, 21-28.
- [14] Freitas R.L., Ferreira R.B., Teixeira A.R.: Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyse structural comparisons with the major classes of globulins. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2000, **51**, 341-352.
- [15] Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W. (red.): *Immunologia*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2002.
- [16] Graca-Souza A.V., Arruda M.A.B., de Freitas M.S., Barja-Fidalgo Ch., Oliveira P.L.: Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood*, 2002, **99 (11)**, 4160-4165.
- [17] Johnson S.K., Hall R., Smith S.: Australian sweet lupin kernel fibre: current evidence of health benefits. *Proc. Final Conference of Healthy-Profood, Milan 2005*, pp. 173-184.
- [18] Kabat E.A., Mayer M.M.: *Experimental Immunochemistry*, 2nd ed., Thomas, Springfield 1961.
- [19] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- [20] Lampart-Szczapa E., Korczak J., Nogala-Kałużka M., Zawirska-Wojtasik R.: Antioxidant properties of lupin seed products. *Food Chem.*, 2003 A, **83**, 279-285.
- [21] Lavastre V., Cavalli H., Ratthe C., Girard D.: Anti-inflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in vivo. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, **137**, 272-278.
- [22] Lydyard P.M., Whelan A., Fanger M.W.: *Krótkie wykłady: immunologia*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2001.
- [23] Magni Ch., Herndl A., Sironi E., Scarafoni A., Ballabio C., Restani P., Bernardini R., Novembre E., Vierucci A., Duranti M.: One- and two-dimensional electrophoretic identification of IgE-binding polypeptides of *Lupinus albus* and other legume seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53 (11)**, 4567-4571.
- [24] Papoti V., Makri E., Papalamprou E., Drakos A., Mandalon D., Doxastakis G., Kiosseoglou V.: Utilization of lupin seed protein isolates for the production of lupin biscuits and lupin pasta. *Proc. Final Conference of Healthy-Profood. Milan, 2005*, pp. 77-88.
- [25] Porres J.M., Aranda P., López-Jurado M., Urbano G.: Nutritional evaluation of protein, phosphorus, calcium and magnesium bioavailability from lupin (*Lupinus albus* var. multolupa)-based diets in

- growing rats: effect of α -galactoside oligosaccharide extraction and phytase supplementation. Br. J. Nutr., 2006, **95**, 1102-1111.
- [26] Pusztai A., Bardocz S.: Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. Trends Glycosci. Glycotechnol., 1996, **8**, 149-165.
- [27] Rojas-Hijazo B., Garcés M.M., Caballero M.L., Alloza P., Moneo I.: Unsuspected lupin allergens hidden in food. Int. Arch. Allergy Immunol., 2006, **141**, 47-50.
- [28] Seski J., Reinhalter E.R., Silva J. JR.: Abnormalities of lymphocyte transformations in women with condylomata acuminata. Obstetrics & Gynecology, 1978, **51**, 188-192.
- [29] Sharon N.: Lectin – carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. Trends Biochem. Sci., 1993, **18**, 221-226.
- [30] Stawiński S.: Łubin wąskolistny – gatunek niewykorzystanych możliwości. Agro-serwis. Rośliny strączkowe, 2007, 25-28.

EVALUATION OF LECTIN-LIKE PROPERTIES OF GLOBULINS FROM SEEDS OF NARROW-LEAFED LUPIN (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS*, VAR. BARON)

S u m m a r y

In comparison to other legume plants, lupin contains small amounts of anti-nutritional compounds, including lectins. However, it has been proved that lupin seeds may contain some lectin-like substances, which can limit the use of lupin in human nutrition.

The objective of the study was to evaluate lectin-like properties of narrow-leafed lupin seed globulins. To achieve this, their potential for stimulating lymphocyte proliferation as well as their hemagglutinating properties were analysed.

The isolated erythrocytes were treated with some selected protein fractions. The result of the experiment was microscopically assessed. The cultured lymphocytes were treated with globulin fractions and a mitogen, respectively. The amount of proliferating cells was evaluated based on the amount of radioactive thymidine incorporated into the DNA of lymphocytes. The proliferation of lymphocytes was also assessed using a flow cytometry.

No cell agglutination was found among the erythrocytes treated with the lupin globulins. Furthermore, the level of cell proliferation did not increase in the population of lymphocytes incubated with the lupin proteins studied, either. Based on the results achieved, it was found that the lupin globulin fractions analysed did not show the ability, appearing typical for lectins, to agglutinate erythrocytes. They did not induce the proliferation of lymphocytes, either. The results obtained prove that those proteins, if eaten with food products, cannot cause the immune reaction to occur owing to the agglutination and activation of lymphocytes or to hemagglutination.

Key words: lupin globulins, lectin-like properties, agglutination, proliferation ☒