

KRZYSZTOF DWIECKI¹, KRZYSZTOF POLEWSKI²

¹Katedra Biochemii i Analizy Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²Katedra Fizyki
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

WPLYW GENISTEINY I DAIDZEINY NA PROCES ROZPUSZCZANIA MEMBRANY LIPIDOWEJ W OBECNOŚCI DETERGENTU

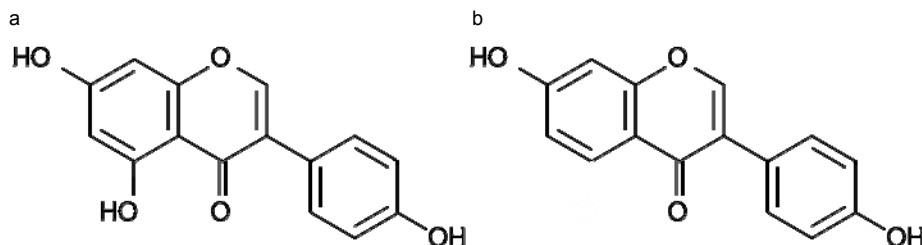
Streszczenie. W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące wpływu izoflawonów sojowych – genisteiny i daidzeiny na proces rozpuszczania lipidowej membrany dipalmitynofosfatydylocholinowej (DPPC) w obecności anionowego detergentu siarczanu dodecylu sodu (SDS). Genisteina i daidzeina chronią membranę DPPC przed solubilizacją w obecności SDS, przy czym daidzeina, dzięki zdolności oddziaływania z hydrofilową fazą dwuwarstwy, efektywniej (przy mniejszych stężeniach) zapobiega rozpuszczeniu błony. Naruszenie równowagi hydrofilowo-hydrofobowej dwuwarstwy w obecności detergentu SDS prowadzi albo do całkowitej solubilizacji membrany (w obecności 50 μM GEN), albo do powstania struktury o zwiększonej odporności na działanie detergentów (w obecności 200 μM GEN oraz 50 i 200 μM DAI), której całkowite rozpuszczenie wymaga zastosowania stężeń SDS wielokrotnie przekraczających stężenia stosowane do naruszenia struktury pierwotnej membrany.

Słowa kluczowe: daidzeina, genisteina, izoflawony, membrana lipidowa, liposomy, detergenty

Wstęp

Surfaktanty, które są powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym i gospodarstwie domowym, mogą mieć negatywny wpływ na stabilność membran lipidowych. Detergenty powodują rozerwanie struktury membrany i przekształcenie liposomów w struktury micelarne (OTEIZA i IN. 2005). Oddziaływania między cząsteczkami detergentu a fosfolipidami błony prowadzą do zmiany hydrofobowo-hydrofilowej równowagi błony i w efekcie do zniszczenia dwuwarstwy (DWIECKI i IN. 2007 a). Obecność polifenolowych barwników roślinnych – flawonoidów w membranie lipidowej może zmieniać jej strukturę i właściwości, w tym stabilność w obecności detergentów. Zaobser-

wowano, że katechiny chronią membrany przed destrukcyjnym wpływem detergentów, co jest związane z ich oddziaływaniem z polarną częścią błony, a szczególnie z grupami hydroksylowymi (VERSTRAETEN i IN. 2003). Inkubacja liposomów złożonych z fosfatydylocholino (PC) i fosfatydyloseryny (PS) z flawonolami i procyjanidynami powoduje zwiększenie ilości detergentu Triton X-100 potrzebnego do rozerwania struktury membrany. Akumulacja procyjanidyn na powierzchni liposomów zabezpiecza hydrofobowy rdzeń membrany przed penetracją surfaktantów (VERSTRAETEN i IN. 2003). Podobne działanie ochronne stwierdzono w przypadku: kempferolu, naringeniny, epigalokatechiny, galusanu epigalokatechiny i genisteiny (OTEIZA i IN. 2005). Największy efekt ochronny w stosunku do membrany narażonej na działanie detergentów wykazują flawonoidy hydrofilowe. Powstawanie wiązań wodorowych między flawonoidem i polarną częścią membrany determinuje zdolność tych związków do oddziaływania z powierzchnią membrany i ochrony przed wpływem detergentów. Możliwość powstania wiązań wodorowych zależy od liczby i rozmieszczenia grup hydroksylowych flawonoidu oraz jego trójwymiarowej struktury, a także od ilości grup OH w hydrofilowej części membrany. W przypadku flawonoli ochronne działanie w stosunku do membrany jest bezpośrednio skorelowane z ilością grup OH. Obecność grupy metoksyowej przy 4. węglu pierścienia C nie wpływa na zdolność flawonoidów do tworzenia wiązań wodorowych, podczas gdy obecność podwójnego wiązania pomiędzy 2. i 3. węglem pierścienia C ma kluczowe znaczenie. Obecność dodatkowych grup hydroksylowych w epigalokatechinie znacznie zwiększa ochronne działanie wobec membrany (OTEIZA i IN. 2005). Genisteina i daidzeina są zaliczane do klasy izoflawonów (HARBORNE i WILLIAMS 2000, HAVSTEEN 2002). Daidzeina ma dwie grupy OH – przy 7. węglu pierścienia A i 4'. węglu pierścienia B, natomiast w cząsteczce genisteiny występuje dodatkowa grupa hydroksylowa przy 5. węglu pierścienia A (rys. 1).



Rys. 1. Wzory strukturalne genisteiny (a) i daidzeiny (b)
Fig. 1. Genistein (a) and daidzein (b) structural formulas

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu izoflawonów sojowych – genisteiny i daidzeiny na proces rozpuszczania fosfatydylocholinowej membrany lipidowej w obecności detergentu. Użycie polifenoli o zbliżonej budowie chemicznej pozwala na stwierdzenie, czy liczba grup OH w cząsteczce izoflawonu rzutuje na jego ochronne działanie w stosunku do błony lipidowej poddanej działaniu surfaktantu.

Material i metody

Przygotowanie liposomów (membran lipidowych)

Liposomy przygotowano według MACDONALDA i IN. (1991) z własnymi modyfikacjami. Odpowiednie ilości dipalmitynofosfatydylocholino (DPPC) (Sigma-Aldrich, Niemcy) rozpuszczonej w chloroformie (POCh, Polska) oraz izoflawonów: genisteiny (GEN) i daidzeiny (DAI) (LCLabs, USA) rozpuszczonych w metanolu (POCh, Polska) zmieszano w kolbce stożkowej ze szlifem i rozpuszczalnik odparowano za pomocą wyparki próżniowej w czasie 3 min w temperaturze 40°C. Powstały film uwodniono 0,1 M buforem fosforanowym (pH 7,4) poprzez intensywne mieszanie na mieszadle magnetycznym przez 10 min w temperaturze powyżej temperatury głównego przejścia fazowego membrany (50°C). Uwodnione membrany, w celu uzyskania liposomów o jednolitych rozmiarach, ekstrudowano za pomocą ekstrudera LiposoFast Basic LF-1 (Avestin Inc., Kanada). Przeprowadzono 11 pasaży w temperaturze powyżej temperatury głównego przejścia fazowego błony, a średnica porów użytej membrany wynosiła 1000 nm.

Pomiary turbidometryczne (rozproszenia światła) przez membrany lipidowe DPPC w obecności izoflawonów i detergentu siarczanu dodecyłu sodu

Pomiar rozproszenia światła przez liposomy DPPC zawierające genisteinę i daidzeinę w obecności anionowego detergentu siarczanu dodecyłu sodu (SDS) (Sigma-Aldrich, Niemcy) wykonano według LEHTONENA i IN. (1996). Rozproszenie wyznaczono przez pomiar absorbancji (ABS) przy długości fali $\lambda = 420$ nm. Liposomy DPPC (272 μM) zawierały 50 i 200 μM odpowiednich izoflawonów. Wykonano pomiary kinetyki zmian absorbancji (rozproszenia światła) w obecności 25 mM SDS oraz pomiary absorbancji zawiesiny membran w zależności od stężenia SDS (0,5-33 mM detergentu). Pomiary wykonano w kuwecie kwarcowej 1×1 cm w temperaturze 22°C za pomocą spektrofotometru S 1000 (Ocean Optics, Holandia).

Pomiar natężenia emisji fluorescencji i widm emisji fluorescencji izoflawonów

Pomiar natężenia emisji fluorescencji daidzeiny w liposomach DPPC w obecności siarczanu dodecyłu sodu (SDS) wykonano przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 260$ nm i emisji $\lambda = 465$ nm. Liposomy DPPC (272 μM) zawierały 50 i 200 μM daidzeiny. Wykonano pomiary kinetyki zmian natężenia emisji fluorescencji w obecności 25 mM SDS w czasie do 120 min oraz pomiary natężenia emisji w zawiesinie membran w zależności od stężenia SDS (0,5-33 mM detergentu). Dodatkowo wykonano pomiar widm emisji fluorescencji daidzeiny (50 μM) w buforze fosforanowym (0,1 M; pH 7,4), zawiesinie liposomów DPPC (104 μM) i micelach SDS (15 mM). Pomiary wykonano w kuwecie kwarcowej 1×1 cm w temperaturze 22°C za pomocą spektrofluorymetru RF 5001 (Shimadzu, Japonia). Pomiarów natężenia i widm emisji genisteiny nie wykonano ze względu na brak natywnej fluorescencji tego izoflawonu.

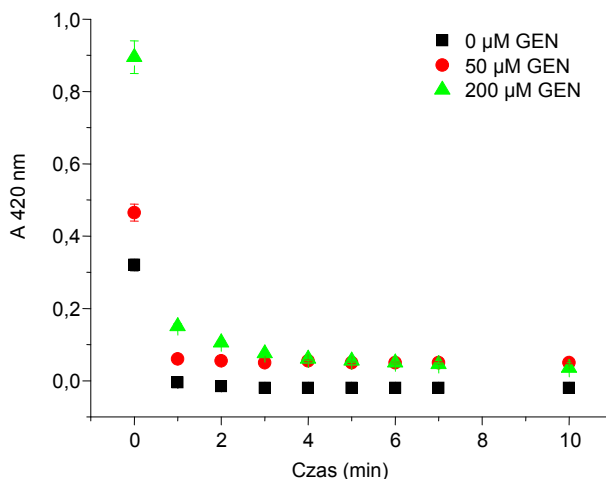
Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano za pomocą programów OriginPro 7.5 oraz Microsoft Excel. Wszystkie analizy wykonano co najmniej w trzech powtórzeniach. Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem Tukeya (poziom istotności $\alpha = 0,05$).

Wyniki i dyskusja

Pomiary turbidometryczne

Pomiaru absorbancji (ABS) dokonywano poza pasmami absorpcji składników roztworu. Rejestrowane wartości były skutkiem zjawiska rozproszenia światła przez cząstki o różnych rozmiarach, a więc wartość ABS była proporcjonalna do wielkości tych cząstek. Początkowa wartość rozproszenia w zawiesinie liposomów DPPC w obecności GEN (rys. 2) była większa niż w przypadku membrany niezawierającej flawonoidów, co jest prawdopodobnie związane ze wzrostem rozmiarów liposomów w wyniku ich agregacji. Zjawisko agregacji liposomów w obecności izoflawonów zostało opisane przez LEHTONENA i IN. (1996).

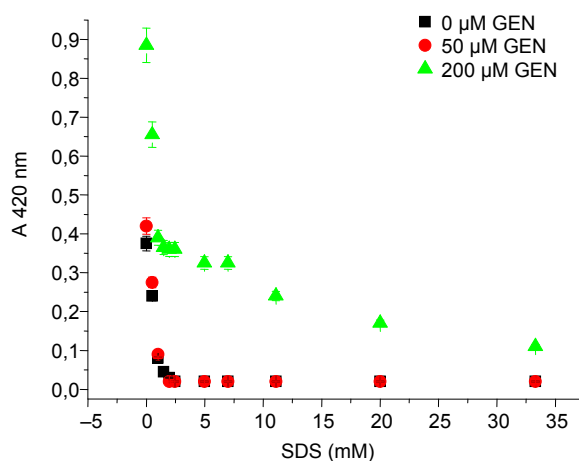


Rys. 2. Zależność absorbancji ($\lambda = 420$ nm) dyspersji liposomów DPPC (272 μ M) w obecności genisteiny i SDS (25 mM) od czasu inkubacji w temperaturze 22°C

Fig. 2. Relationship between DPPC liposomes dispersion (272 μ M) absorbance ($\lambda = 420$ nm) and time of incubation in the presence of genistein and SDS (25 mM) at 22°C

Dodanie anionowego detergentu, siarczanu dodecyłu sodu (SDS), w stężeniu powyżej krytycznego stężenia micelnego (25 mM) do zawiesiny liposomów DPPC (272 μ M) powodowało gwałtowne (w czasie do 1 min) zmniejszenie wartości absorbancji dla

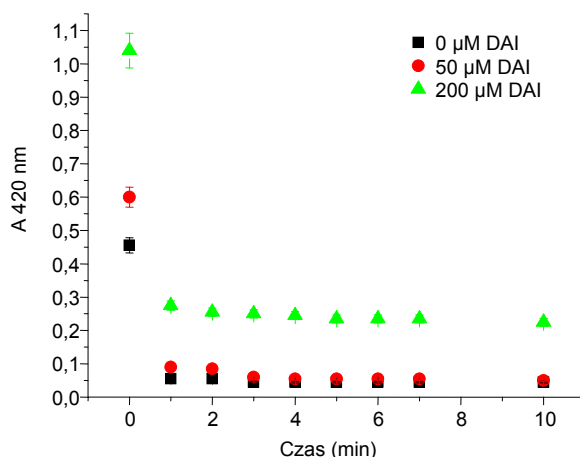
długości fali $\lambda = 420$ nm do poziomu absorbancji próbki referencyjnej, bez detergentu, (rys. 2). Oznacza to całkowitą solubilizację liposomów i przekształcenie ich w zawierające detergent micelle. W obecności $50 \mu\text{M}$ genisteiny solubilizacja również następowała w czasie do 1 min. Wartość rozproszenia spadała po 1 min inkubacji do 0,06 i nie zmieniała się w sposób statystycznie istotny ($\alpha = 0,05$) w czasie do 10 min inkubacji. Przy stężeniu $200 \mu\text{M}$ GEN proces solubilizacji kończył się po 4 min inkubacji. Po 10 min inkubacji nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między rozproszeniem zawiesiny DPPC w obecności 50 i $200 \mu\text{M}$ GEN i przy nieobecności flawonoidu. Całkowita solubilizacja membrany DPPC przy nieobecności i w obecności $50 \mu\text{M}$ GEN następowała przy stężeniu SDS = $1,48$ mM (rys. 3), a więc poniżej krytycznego stężenia micelizacji (CMC) równego w przypadku SDS $8,27$ mM (w temperaturze pokojowej) (POLEWSKI 1996). Dalszy wzrost stężenia detergentu nie powodował statystycznie istotnych zmian ABS. Wartość ABS membrany przy stężeniu $200 \mu\text{M}$ GEN była dwukrotnie większa niż w obecności $50 \mu\text{M}$ i przy nieobecności GEN, co świadczy o prawdopodobnym wzroście rozmiarów liposomów w obecności dużego stężenia flawonoidu. Największy spadek rozmiarów liposomów (wartości ABS) obserwowano w obecności $200 \mu\text{M}$ GEN przy stężeniu SDS do 1 mM, natomiast dalszy przyrost stężenia detergentu (do 33 mM) powodował mniej gwałtowne zmiany absorbancji, jednak nawet przy stężeniu 33 mM SDS nie następowała całkowita solubilizacja membran.



Rys. 3. Zależność absorbancji ($\lambda = 420$ nm) dyspersji liposomów DPPC ($272 \mu\text{M}$) w obecności genisteiny od stężenia SDS

Fig. 3. Relationship between DPPC liposomes dispersion ($272 \mu\text{M}$) absorbance ($\lambda = 420$ nm) and concentration of SDS in the presence of genistein

Dodatek SDS (25 mM) do zawiesiny DPPC zawierającej $50 \mu\text{M}$ daidzeiny powodował całkowitą solubilizację membrany w czasie do 1 min (rys. 4). Stosunkowo duża wartość absorbancji początkowej DPPC w obecności daidzeiny (420 nm) jest prawdopodobnie skutkiem agregacji liposomów w obecności tego izoflawonu. LEHTONEN i IN.

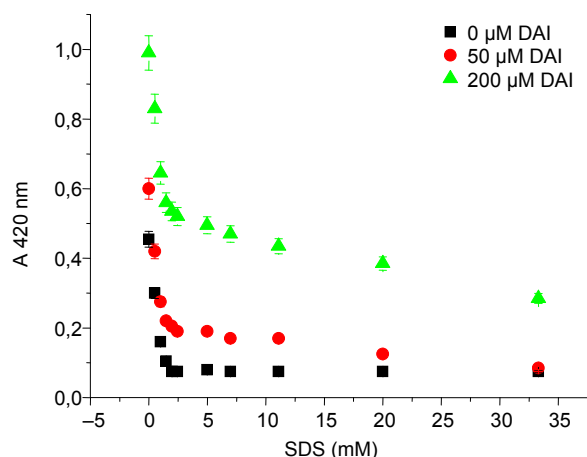


Rys. 4. Zależność absorbancji ($\lambda = 420$ nm) dyspersji liposomów DPPC (272 μ M) w obecności daidzeiny i SDS (25 mM) od czasu inkubacji w temperaturze 22°C
 Fig. 4. Relationship between DPPC liposomes dispersion (272 μ M) absorbance ($\lambda = 420$ nm) and time of incubation in the presence of daidzein and SDS (25 mM) at 22°C

(1996) zaobserwowali agregacje membran z fosfatydylocholino żółtka jaja w obecności daidzeiny, co skutkowało wzrostem rozproszenia (absorbancji mierzonej przy długości fali 400 nm). Nie zaobserwowano statystycznie istotnych ($\alpha = 0,05$) zmian między membraną zawierającą 50 μ M DAI i membraną bez izoflawonu. Obecność SDS w membranie DPPC zawierającej 200 μ M DAI powodowała w czasie 1 min blisko czterokrotny spadek rozproszenia. Dalsza inkubacja w czasie do 10 min nie powodowała statystycznie istotnych zmian absorbancji, jednak wartość ta różniła się od wartości notowanej przy nieobecności DAI, solubilizacja membrany była więc niecałkowita.

Zależność ABS przy długości fali 420 nm od stężenia SDS w zawiesinie liposomów DPPC w obecności DAI przedstawiono na rysunku 5. Detergent SDS w stężeniu do 2,44 mM powoduje efektywne niszczenie struktury membrany DPPC zawierającej 50 μ M DAI, jednak przy tym stężeniu solubilizacja membrany nie była całkowita. Dalszy wzrost stężenia SDS powodował niewielkie zmiany wartości ABS i dopiero przy stężeniu detergentu równym 33 mM membrana była całkowicie rozpuszczona. W obecności 200 μ M DAI również następował gwałtowny spadek ABS zawiesiny przy stężeniu detergentu do 1,48 mM, a przy większym stężeniu zmiany absorbancji były dużo wolniejsze, jednak nawet w obecności 33 mM SDS nie wystąpiła całkowita solubilizacja membrany.

W obecności obu flawonoidów następowało pod wpływem detergentu naruszenie równowagi hydrofilowo-hydrofobowej dwuwarstwy i jej solubilizacja przy stężeniu SDS w przedziale od 0,5 do około 2,44 mM. Proces ten prowadził albo do całkowitej solubilizacji membrany (przy stężeniu GEN 50 μ M), albo do powstania struktury o zwiększonej odporności na działanie detergentów (przy stężeniu 200 μ M GEN oraz 50 i 200 μ M DAI), której całkowite rozpuszczenie wymagało zastosowania stężeń SDS



Rys. 5. Zależność absorbancji ($\lambda = 420$ nm) dyspersji liposomów DPPC ($272 \mu\text{M}$) w obecności daidzeiny od stężenia SDS

Fig. 5. Relationship between DPPC liposomes dispersion ($272 \mu\text{M}$) absorbance ($\lambda = 420$ nm) and concentration of SDS in the presence of daidzein

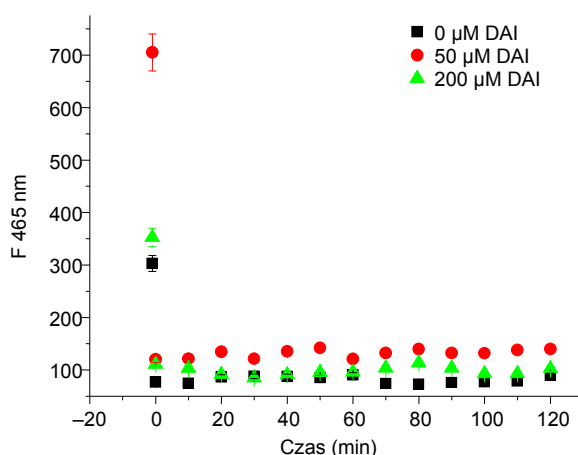
wielokrotnie przekraczających stężenia stosowane do naruszenia struktury pierwotnej membrany. Naruszenie równowagi hydrofilowo-hydrofobowej dwuwarstwy następowało zarówno w obecności DAI, jak i GEN, jednak DAI efektywniej (przy słabszych stężeniach) chroniła zmodyfikowaną w ten sposób strukturę membrany przed dalszym rozpuszczaniem.

OTEIZA i IN. (2005) zauważyli, że zdolność flawonoidów do ochrony membrany przed wpływem detergentów jest zdeterminowana zdolnością tych związków do oddziaływania z powierzchnią membrany, co jest związane z powstawaniem wiązań wodorowych między flawonoidem i polarną częścią dwuwarstwy. Daidzeina posiada zdolność oddziaływania z hydrofilową fazą błony (DWIECKI i IN. 2007 b) i pomimo mniejszej liczby grup hydroksylowych ma większą niż genisteina zdolność tworzenia wiązań wodorowych (dane niepublikowane), stąd prawdopodobnie skuteczniej niż GEN chroni DPPC przed solubilizacją. Na podstawie badań spektroskopowych stwierdzono, że około 15% daidzeiny jest ulokowane w hydrofilowej części membrany fosfatydylocholinowej, podczas gdy pozostała część znajduje się w fazie wodnej i na granicy faz woda/membrana (DWIECKI i IN. 2009). ŁANIA-PIETRZAK i IN. (2005) zaobserwowali spadek płynności membrany fosfatydylocholinowej (PC) w obecności genisteiny. Według tych autorów GEN zmniejsza płynność PC dzięki obecności na granicy fazy polarnej i niepolarniej dwuwarstwy, gdzie ogranicza ruchliwość cząsteczek lipidu. ARORA i IN. (2000) stwierdzili obecność GEN w hydrofobowej części nienasyconej membrany SLPC (fosfatydylocholinowej podstawionej resztą kwasu stearynowego i linolowego), gdzie zmniejszała ona w sposób istotny płynność dwuwarstwy. Przepuszczalność membrany lipidowej w obecności flawonoidów rośnie wraz ze wzrostem hydrofobowości zastosowanych polifenoli (OLLILA i IN. 2002). Daidzeina gromadzi się głównie w hy-

drofilowej fazy błony, tworząc skuteczną barierę utrudniającą dostęp detergentu do dwuwarstwy, natomiast genisteina występuje głównie na granicy fazy hydrofilowej i hydrofobowej oraz w hydrofobowej części dwuwarstwy, stąd jej mniejsza niż daidzeiny skuteczność działania ochronnego.

Pomiary natężenia fluorescencji

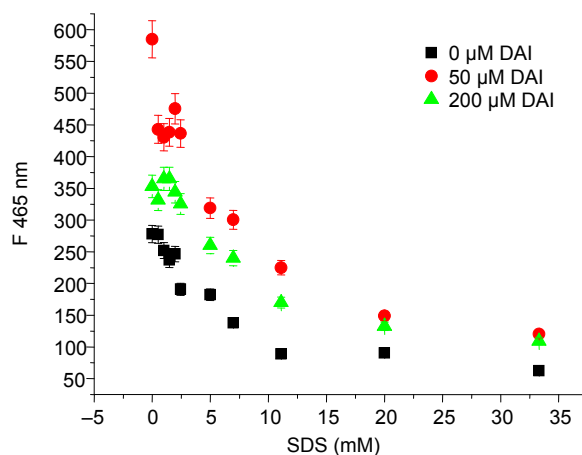
Pomiar natywnej fluorescencji daidzeiny dostarcza dodatkowych informacji o przemianach zachodzących w membranach DPPC w obecności izoflawonu i detergentu. Po dodaniu 25 mM SDS do zawiesiny liposomów obserwowano w obecności 50 μM DAI natychmiastowy spadek natężenia emisji fluorescencji (rys. 6). Spadek F przy stężeniu 200 μM DAI był zbliżony do zmian wartości emisji membrany niezawierającej izoflawonu i wynikał raczej ze zmniejszenia się wartości rozproszenia. Wartość fluorescencji w czasie dalszej inkubacji (do 120 min) nie ulegała zmianom przy stężeniu DAI 200 μM i nieznacznie rosła przy stężeniu 50 μM .



Rys. 6. Zależność natężenia emisji fluorescencji daidzeiny ($\lambda = 465$ nm) w dyspersji liposomów DPPC (272 μM) w obecności SDS (25 mM) od czasu inkubacji w temperaturze 22°C

Fig. 6. Relationship between daidzein fluorescence intensity ($\lambda = 465$ nm) in the DPPC liposomes dispersion (272 μM) and the time of incubation in the presence of SDS (25 mM) at 22°C

Zależność natywnej fluorescencji daidzeiny w DPPC (maksimum emisji przy długości fali $\lambda = 465$ nm) od stężenia SDS przedstawiono na rysunku 7. Wzrost stężenia detergentu powodował zarówno spadek poziomu rozproszenia (DPPC przy nieobecności DAI), jak i spadek F daidzeiny (50 μM izoflawonu). Przy stężeniu DAI 200 μM nie zaobserwowano zmian poziomu emisji fluorescencji odbiegających od zmian poziomu rozproszenia DPPC przy nieobecności izoflawonu. Spadek natężenia emisji fluorescencji

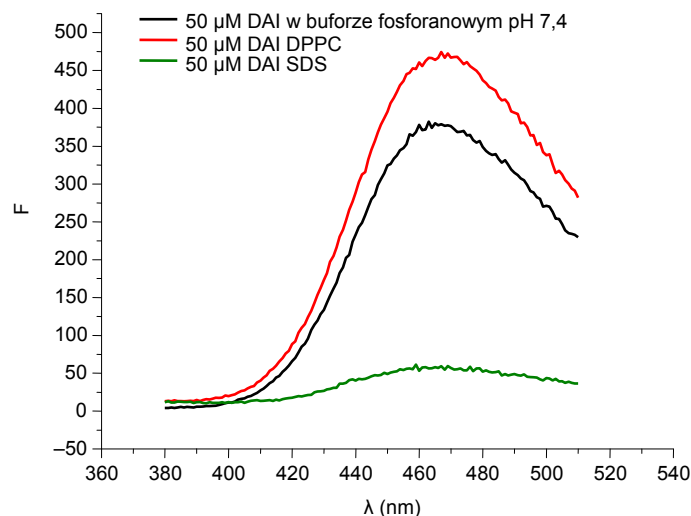


Rys. 7. Zależność natężenia emisji fluorescencji daidzeiny ($\lambda = 465$ nm) w dyspersji liposomów DPPC (272 μ M) od stężenia SDS

Fig. 7. Relationship between daidzein fluorescence intensity ($\lambda = 465$ nm) in the DPPC liposomes dispersion (272 μ M) and concentration of SDS

daidzeiny był prawdopodobnie spowodowany zmianą struktury membrany na skutek wbudowania się w nią cząsteczek detergentu, jak i oddziaływaniem izoflawonu obecnego w fazie wodnej z micelami SDS.

Wydajność kwantowa fluorescencji DAI w membranie była o przeszło 20% większa od wydajności w buforze fosforanowym (pH 7,4), natomiast natężenie emisji w 15 mM SDS było przeszło sześciokrotnie mniejsze niż w buforze (rys. 8). Obecność wzrastającego stężenia SDS w układzie powodowała z jednej strony solubilizację membrany, w wyniku czego powstawały nowe, zawierające detergent struktury (agregaty), w których warunki do wydajnej fluorescencji DAI były mniej korzystne niż w membranie, z drugiej strony obecność surfaktantu w fazie wodnej w stężeniu przekraczającym CMC (powyżej 8,27 mM) skutkowałą powstawaniem miceli SDS, w których obecności DAI wykazywała słabszą emisję fluorescencji w stosunku do środowiska buforu. Powstawanie agregatów fosfatydylocholiny i detergentu zostało zaobserwowane w obecności SDS w przypadku liposomów DPPC zawierających D- α -tokoferol (DWIECKI i IN. 2007 a). W przypadku niektórych flawonoidów odnotowują się zmiany natężenia i maksimum emisji fluorescencji w zależności od charakteru środowiska (FALKOVSKAIA i IN. 1998, SENGUPTA i SENGUPTA 2002, 2003, CHAUDHURI i in. 2007). Flawonoidy posiadające grupę OH przy 5. węglu pierścienia A zwykle nie wykazują fluorescencji lub emisja pochodząca od nich jest bardzo słaba, czym można wytłumaczyć brak fluorescencji genisteiny w analizowanych środowiskach (CHAUDHURI i IN. 2007). Stosunkowo mała wartość natężenia emisji przy stężeniu detergentu powyżej CMC może wynikać z solubilizacji membrany, jak również z obecności w micelach daidzeiny pochodzącej z fazy wodnej (buforu). Zjawisko partycji polifenoli między fazę wodną i membranę lipidową zostało opisane przez wielu autorów (AREIAS i IN. 2001, CHAUDHURI i IN. 2007, SARPIETRO i IN. 2007, CHEN i DEUSTER 2009, DWIECKI i IN. 2009).



Ryc. 8. Widmo emisji fluorescencji daidzeiny (50 μM) w buforze fosforanowym (0,1 M; pH 7,4), zawiesinie liposomów DPPC (104 μM) i micelach SDS (15 mM)

Fig. 8. Fluorescence spectrum of the daidzein (50 μM) in the phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4), DPPC liposomes suspension (104 μM) and SDS micelles (15 mM)

Wnioski

1. Genisteina i daidzeina chronią membranę DPPC przed solubilizacją w obecności detergentu siarczanu dodecylu sodu (SDS), przy czym daidzeina, dzięki zdolności oddziaływania z hydrofilową fazą dwuwarstwy, efektywniej (przy mniejszych stężeniach) zapobiega rozpuszczeniu błony.

2. Naruszenie równowagi hydrofilowo-hydrofobowej dwuwarstwy w obecności detergentu SDS prowadzi albo do całkowitej solubilizacji membrany (w obecności 50 μM GEN), albo do powstania struktury o zwiększonej odporności na działanie detergentów (w obecności 200 μM GEN oraz 50 i 200 μM DAI), której całkowite rozpuszczenie wymaga zastosowania stężeń SDS wielokrotnie przekraczających stężenia stosowane do naruszenia struktury pierwotnej membrany.

Literatura

- AREIAS F.M., REGO A.C., OLIVEIRA C.R., SEABRA R.M., 2001. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe²⁺-induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochem. Pharmacol.* 62: 111-118.
- ARORA A., BYREM T.M., NAIR M.G., STRASBURG G.M., 2000. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 1: 102-109.

- CHAUDHURI S., BANERJEE A., BASU K., SENGUPTA B., SENGUPTA P.K., 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* 41: 42-48.
- CHEN Y., DEUSTER P., 2009. Comparison of quercetin and dihydroquercetin: antioxidant-independent actions on erythrocyte and platelet membrane. *Chem.-Biol. Interact.* 182: 7-12.
- DWIECKI K., GÓRNAŚ P., JACKOWIAK H., NOGALA-KALUCKA M., POLEWSKI K., 2007 a. The effect of D-alpha-tocopherol on the solubilization of dipalmitoylphosphatidylcholine membrane by anionic detergent sodium dodecyl sulfate. *J. Food Lipids* 14: 50-61.
- DWIECKI K., NEUNERT G., POLEWSKI K., 2007 b. Affinity of genistein and daidzein to phosphatidylcholine membranes. *Chem. Phys. Lipids* 149, Suppl: 76-77.
- DWIECKI K., NEUNERT G., POLEWSKI P., POLEWSKI K., 2009. Antioxidant activity of daidzein, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvents and phosphatidylcholine liposomes. *J. Photochem. Photobiol. B* 96: 242-248.
- FALKOVSKAIA E., SENGUPTA P.K., KASHA M., 1998. Photophysical induction of dual fluorescence of quercetin and related hydroxyflavones upon intermolecular H-bonding to solvent matrix. *Chem. Phys. Lett.* 297: 109-114.
- HARBORNE J.B., WILLIAMS C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- HAVSTEEN B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96: 67-202.
- LEHTONEN J.Y.A., ADLERCREUTZ H., KINNUNEN P.K.J., 1996. Binding of daidzein to liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1285, 1: 91-100.
- ŁANIA-PIETRZAK B., HENDRICH A.B., ŻUGAJ J., MICHALAK K., 2005. Metabolic O-demethylation does not alter the influence of isoflavones on the biophysical properties of membranes and MRP1-like protein transport activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 2: 428-434.
- MACDONALD R.C., MACDONALD R.I., MENDO B.P.M., TAKESHITA K., SUBBARAO N.K., HU L., 1991. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1061, 2: 297-303.
- OLLILA F., HALLING K., VUORELA P., VUORELA H., SLOTTE J.P., 2002. Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 399, 1: 103108.
- OTEIZA P., ERLEJMAN A.G., VERSTRAETEN S.V., KEEN C.L., FRAGA C.G., 2005. Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface. *Clin. Dev. Immunol.* 12, 1: 19-25.
- POLEWSKI K., 1996. Spectroscopic studies of rose bengal in heterogeneous systems. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 28: 163-172.
- SARPIETRO M.G., SPATAFORA C., TRINGALI C., MICIELI D., CASTELLI F., 2007. Interaction of resveratrol and its trimethyl and triacetyl derivatives with biomembrane models studied by differential scanning calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3720-3728.
- SENGUPTA B., SENGUPTA P.K., 2002. The interaction of quercetin with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299: 400-403.
- SENGUPTA B., SENGUPTA P.K., 2003. Binding of quercetin with human serum albumin: a critical spectroscopic study. *Biopolymers (Biospectroscopy)* 72: 427-434.
- VERSTRAETEN S.V., KEEN C.L., SCHMITZ H.H., FRAGA C.S., OTEIZA P.I., 2003. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1: 84-92.

THE EFFECT OF GENISTEIN AND DAIDZEIN ON THE SOLUBILIZATION OF LIPID MEMBRANE BY DETERGENT

Summary. The study was carried out to estimate the effect of soybean isoflavones (genistein and daidzein) on the process of solubilization of lipid dipalmitoylphosphatidylcholine membrane (DPPC) in the presence of anionic detergent sodium dodecyl sulfate (SDS). Genistein and daidzein prevent DPPC membrane solubilization in the presence of SDS. Protection by daidzein is more effective than genistein and arises from the interaction between isoflavone and hydrophilic part of the membrane. Changing of the hydrophobic-hydrophilic balance in the membrane in the presence of SDS leads to complete bilayer solubilization (at genistein concentration 50 μM) or new detergent-resistance structures are observed (at genistein concentration 200 μM and daidzein 50-200 μM). Complete solubilization of those new structures requires much higher concentration of SDS, than those required to solubilize the membrane without isoflavones.

Key words: daidzein, genistein, isoflavones, lipid membrane, liposomes, detergents

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Krzysztof Dwiecki, Katedra Biochemii i Analizy Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań, Poland, e-mail: dwiecki@up.poznan.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

9.02.2010

Do cytowania – For citation:

*Dwiecki K., Polewski K., 2010. Wpływ genisteiny i daidzeiny na proces rozpuszczania membrany lipidowej w obecności detergentu. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 2, #15.*