

Lipozomi kao modelni sustav u izučavanju biomineralizacije

Drago Škrtić i Edward D. Eanes

Institut »Ruder Bošković« Zagreb i National Institute of Dental Research, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA

Izvorni znanstveni rad

UDK 547.915:616-092

Prispjelo: 11. rujna 1990.

Sintetičke lipidne vezikule, lipozomi, su korišteni kao modelne membrane za izučavanje mineralizacije kalcij-fosfata. Kinetika nastajanja mineralne faze praćena je u vodenim suspenzijama anionskih lipozoma, koji su sadržavali visoku koncentraciju kolesterola i različite fosfolipide, te u modelnim lipozomima, čiji je sastav odgovarao lipidnom sastavu membrane vezikula matriksa.

Rezultati istraživanja pokazuju da lipidni sastojci membrana utječu na taloženje kalcij-fosfata u lipozomnim suspenzijama na najmanje 3 načina: (1) kontroliranjem transporta kalcijevih iona kroz membra-

ne, (2) usporavanjem prodiranja intralipozomalno nastalih kristala u medij izvan lipozoma i (3) inhibicijom ekstralipozomalne mineralizacije.

Uz 50 mM enkapsuliranog topljivog anorganskog fosfata i u prisutnosti ionofore, kolesterol značajno utječe na kinetiku taložnog procesa. Inhibicija intralipozomalnog taloženja je u sustavima višeg sadržaja kolesterola rezultat djelovanja njegovih nefleksibilnih molekula, koje čine membranu znatno rigidnijom. Utjecaj kolesterola na transmembranske procese ne mijenja se ugradnjom različitih fosfolipida u lipozomalne membrane.

Ključne riječi: biomineralizacija, lipozomi, kalcij fosfat, kolesterol, vezikule matriksa

Pod pojmom biomineralizacija podrazumijevamo sve procese kojima je posljedica depozicija minerala u organizmima (počevši od onih najjednostavnijih pa sve do organizma čovjeka). Brojna i raznorodna područja znanosti (npr. arheologija, paleontologija, oceanografija, sedimentologija, nauka o razvoju, zubarstvo i medicina), te discipline koje se tim fenomenom bave (biokemija, endokrinologija, molekularna biologija, stereokemija, geokemija) predstavljaju glavni izvor informacija za razumijevanje biomineralizacije i najbolje pokazuju koliko je spomenuti proces od širokog interesa.¹⁰

Do danas je identificirano šezdesetak biogenih minerala, od čega približno jednu trećinu nalazimo u ljudskom organizmu, gdje se pojavljuju u normalnoj mineralizaciji (rast kostiju i zuba), ili u njenom patološkom obliku (nastajanje mokraćnih kamenaca, žučnih kamenaca, zubni karijes itd.). U svim je slučajevima mineralizirano tkivo u neposrednom dodiru s tjelesnim tekućinama (krv, slina ili mokraća), pa se prema tome proces mineralizacije odvija u kompleksnom mediju visoke ionske jakosti, u prisustvu niza biomakromolekula, malih organskih molekula i anorganskih iona. Udio anorganskog materijala u mineraliziranom je tkivu vrlo visok, a čine ga uglavnom kalcij-fosfati, kalcij-okсалati, magnezij-fosfati i uratne soli. Organski matriks, ovisno o vrsti tkiva sačinjava između 1 i 20 tež % mineraliziranog tkiva.

Cilj eksperimenata opisanih u ovom radu bio je:

I. Ustanoviti utjecaj kolesterola na transmembranski transport kalcija i kinetiku taložnog procesa u membranama u kojima omjer kolesterol/fosfolipid približno odgovara onome u vezikulama matriksa (0.8 – 1.0).

II. Definirati djelovanje različitih anionskih i neutralnih fosfolipida (prvenstveno onih koji se nalaze u membranama vezikula matriksa) na kinetiku membranskog taložnog procesa.

III. Pratiti mineralizaciju u kompleksnim multipidnim sintetičkim membranama.

LIPOZOMI

U ranim ispitivanjima (najranija potječu negdje oko 1920. godine) pokušavalo se jedinstvenim fizičko-kemijskim mehanizmom objasniti mineralizaciju različitih vrsta vezivnog tkiva. Danas je jasno da se ni jednom općom teorijom ne mogu u potpunosti objasniti npr. mineralizacija hrskavičnog tkiva s jedne strane i kostiju s druge, jer su ta tkiva morfološki i biokemijski suviše različita da bi se mineralizacija mogla inicirati istim mehanizmom. Nastajanje anorganske čvrste faze odvija se u svakom slučaju kroz nekoliko stupnjeva, koji obuhvaćaju nukleaciju, rast i stvaranje (transformacija, agregacija, rekristalizacija i sl.) kristala. Zbog toga su fizičko-kemijska izučavanja modelnih sustava usredotočena prvenstveno na te procese i potencijalno su značajna za razjašnjenje hipoteze i/ili teorija proizašlih iz fizioloških i biokemijskih ispitivanja.

Značajnu ulogu u tim istraživanjima imaju lipozomi, sintetičke lipidne vezikule, koje se sredinom šezdesetih godina² počelo upotrebljavati kao modelne membrane u ispitivanju funkcije i strukture bioloških membrana. Danas se koriste u istraživanjima fizije celularnih membrana,¹⁴ njihove propusnosti⁴ i transporta,¹² te kao sredstva za doziranje lijekova.^{9,11}

Primjenu lipozoma u studiranju biomineralizacije neposredno su potakli zaključci niza autora da vezikule matriksa imaju značajnu ulogu u procesu mineralizacije.^{1,3,15} Pretpostavka je tih teorija da se unutar vezikula tijekom sazrijevanja nakupljaju kalcijevi i fosfatni ioni u dovoljnoj koncentraciji da vremenom intravezikularno dolazi do nastajanja čvrste faze, a zatim se mineralizacija proširuje i na ekstracelularni medij.

Dva su temeljna eksperimentalna pristupa u upotrebi lipozoma kao sintetičkog modela za izučavanje biomineralizacije. Prema prvom, vanjska površina lipozomalne membrane koristi se neposredno kao supstrat za nukleaciju (podešavanjem sastava lipidne ovojnice tako da u njoj prevladavaju komponente koje stvaraju komplekse s ionima Ca i PO₄). Prema drugom konceptu, unutrašnjost lipozoma pripremljenih od nekalcificirajućih lipida koristi se za mikrokapsulaciju početne taložne reakcije. Intralipozomalno taloženje se inicira tako da se unutrašnjost lipozoma prethodno ispuni koncentriranom otopinom topljivog anorganskog fosfata, a potom se lipidna membrana načini propusnom za kalcijeve ione iz vanjskog medija dodatkom ionofore (hidrofilni nosač iona). Prednost ove, tzv. endogene metode je da slijed taložnih procesa odgovara pretpostavljenom slijedu događaja u kalcifikaciji vezikula matriksa, a da se mineralizacija pri tome ne modificira zbog paralelnog odvijanja složenih biokemijskih procesa, kao što je slučaj s vezikulama matriksa. Tako je pod dobro definiranim i kontroliranim uvjetima moguće izučavati utjecaj pojedinih konstituenata membrana na nukleaciju i rast minerala, transmembranski transport kalcijevih i fosfatnih iona nužnih za iniciranje rasta kristala i njegovo održavanje kad jednom započne.

Glavni sastojak većine jednostavnih lipozomalnih membrana su fosfolipidi (FL). Zbog toga što molekule FL-a posjeduju izrazito hidrofilni i hidrofobni dio, one u vodenim otopinama spontano tvore zatvorene biomolekulske strukture (membrane) stabilizirane kooperativnim nekovalentnim međudjelovanjem. Specifična smjesa lipida, posebno pogodna kao modelni sustav za izučavanje mineralizacije regulirane membranskim procesima, su lipozomi pripređeni iz fosfatidilkolina (PC), dicetilfosfata (DCP) i kolesterola (Chol) u molarnom omjeru 7:2:1.^{5,6,7,8,13} Takvi su lipozomi stabilni, tj. ne podliježu fuziji induciranoj ionima Ca. Dodatkom DCP-a postiže se da je unutrašnji prostor lipozoma po volumenu usporediv s unutrašnjim volumenom vezikula matriksa i dovoljan za enkapsuliranje potrebnih količina topljivog anorganskog fosfata. Chol daje membranama potrebnu čvrstoću i služi za reguliranje, odnosno modificiranje njihove intrinzične permeabilnosti i naboja na površini. 7:2:1 PC-DPC-Chol lipozomi *per se* ne iniciraju taložnu reakciju u otopinama koje su prezasićene obzirom na kalcij-fosfate kod fiziološkog pH.

EKSPERIMENTALNI DIO

Temeljne karakteristike lipozoma, njihova veličina i raspodjela, te prosječni broj lamela po lipozomalnoj jedinici izrazito ovise o tehnici pripreme.

U endogenim taložnim eksperimentima primijenjena je slijedeća procedura: primarna smjesa lipida otopi se u kloroformu, ispari do suhog u vakuumu, te

potom redispergira u vodenoj otopini koju želimo enkapsulirati. Tako nastali lipozomi su multilamelirani, heterogene raspodjele veličina čestica i dodatno ih podvrgavamo naizmjeničnom hladenju (–80°C) i zagrijavanju (37°C), te filtriranju pod pritiskom u struji argona, čime se postiže znatno uniformnija raspodjela veličina (promjer 0.1–0.4 μm) i manji broj lamela po lipozomu. Tako pripremljeni lipozomi enkapsuliraju približno 5 μmola/μmol lipida.

Neenkapsulirana se otopina uklanja filtracijom u gelu, a samo frakcije najbogatije lipozomima koriste se za taložnu reakciju. Lipozomalnoj suspenziji se zatim dodaje odgovarajući volumen puferiranih otopina Ca i PO₄ (ionske jakosti približno 0,15 M), da bi se na kraju dodatkom hidrofilnog nosača iona, membrana načinila propusnom za dotok Ca iz vanjskog medija i tako započeo taložni proces.

Kinetiku taloženja moguće je slijediti: a) praćenjem promjena koncentracije Ca ili PO₄ u vanjskoj otopini, b) određivanjem količine Ca vezanog u liposomalnoj membrani, c) praćenjem promjena strukture čvrste faze (rendgenska analiza) ili d) promatranjem interakcija mineral-lipozom (elektronski mikroskop). Zbog jednostavnosti i najvećeg broja kvantitativnih podataka, najčešće se koristi upravo promjena koncentracije u vanjskom mediju. Na taj se način, uz pogodan odabir taložnih sustava, mogu dobiti kvantitativni podaci o stabilnosti membrana u metastabilnim otopinama Ca i PO₄, vezanju Ca s pojedinačnim sastojcima membrana, te kinetici taloženja unutar lipozoma i u ekstralipozomalnom mediju.

Pripređeni su lipozomalni sustavi slijedećeg sastava (molarni omjer komponenata):

I. 7:2:X PC:DCP:Chol (X = 0, 1, 5 ili 9)

II. 7:2:X PC:FL:Chol (X = 0, 1, 5 ili 9)

a) FL = DCP, dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatna kiselina (DOPA), fosfatidilserin (PS) ili fosfatidilinositol (PI)

b) FL = fosfatidiletanolamin (PE) ili sfingomijelin (Sph)

III. 4:3:3 nepolarni lipidi (NPL):FL:glikolipidi (GL)

NPL = Chol, triacigliceroli (TAG) i masne kiseline (FA)

FL = PC, PS, PI, PE i Sph

GL = cerebrozid (Cer)

Endogeni taložni eksperimenti su izvođeni na temperaturi 22°C, pH = 7.40 ± 0.05 i kod ionske jakosti približno 0.15 M. Početna koncentracija Ca u vanjskom mediju iznosila je 2.25 mM, a PO₄ 1.5 mM (u slučajevima kada je praćeno samo intralipozomalno taloženje vanjska je koncentracija PO₄ bila jednaka nuli).

Lipozomi su obično sadržavali 50 mM enkapsuliranog topljivog anorganskog fosfata. Kao hidrofilni nosač iona korištena je ionofora X-537A. Promjene koncentracije Ca u sustavu praćene su atomskom apsorpcijskom spektrometrijom.

REZULTATI I RASPRAVA

Povećavanjem sadržaja Chol u 7:2:X PC:DCP:Chol membranama ne dolazi do značajnije promjene sposobnosti lipozoma da enkapsuliraju topljivi anorganski fosfat (**tablica 1**), niti se bitnije mijenja raspodjela veličina i prosječni broj lamela po lipozomalnoj jedinici. Ti su lipozomi stabilni i ukoliko nisu sadržavali

TABLICA 1.

PROSJEČNA VELIČINA (PROMJER) LIPOZOMA, PROSJEČNI BROJ LAMELA PO LIPOZOMU I SPOSOBNOST ENKAPSULIRANJA TOPLJIVOG ANORGANSKOG FOSFATA (IZRAŽENA KAO OMJER ANORGANSKOG I LIPIDNOG FOSFATA) U 7:2:1 I 7:2:9 PC — DCP Chol LIPOZOMALNIM SUSTAVIMA

TABLE 1.

AVERAGE SIZE (DIAMETER) OF THE LIPOSOME, AVERAGE NUMBER OF LAMELLAE PER LIPOSOME AND THE ABILITY TO ENCAPSULATE SOLUBLE INORGANIC PHOSPHATE (EXPRESSED AS THE RATIO P_{inorg}/P_{lipid}) FOR 7:2:1 AND 7:2:9 PC — DCP — Chol LIPOSOMES

	7:2:1	7:2:9
promjer (nm)	195	220
diameter		
prosječni broj lamela	4	4
average number of lamellae		
enkapsulirani fosfat	0.17	0.14
encapsulated phosphate		

TABLICA 2.

SPOSOBNOST ENKAPSULIRANJA ANORGANSKOG TOPLJIVOG FOSFATA (P_{enc}) U SUSPENZIJAMA LIPOZOMA SASTAVLJENIH OD PC, RAZLIČITIH FL-a I Chol U MOLARNIM OMJERIMA 7:2:0, 7:2:1, 7:2:5 I 7:2:9

TABLE 2.

THE ABILITY OF PHOSPHATE ENCAPSULATION IN SUSPENSIONS OF LIPOSOMES COMPOSED OF PC, DIFFERENT PHOSPHOLIPIDS AND Chol IN MOLAR RATIOS 7:2:0, 7:2:1, 7:2:5 AND 7:2:9

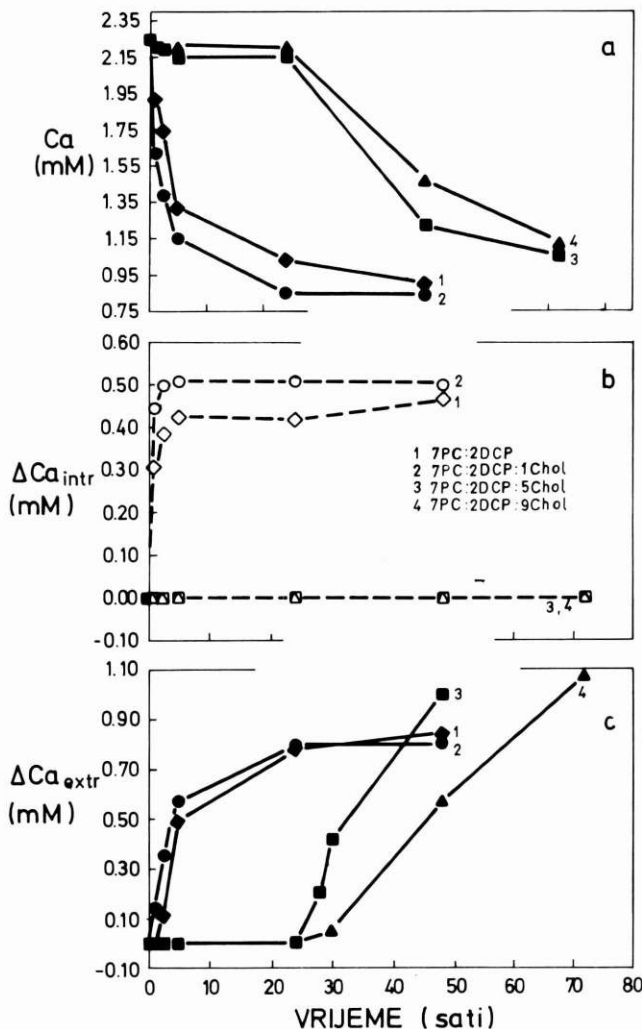
	P_{enc}			
	7:2:0	7:2:1	7:2:5	7:2:9
DOPA	0.19	0.17	0.15	0.17
PS	0.19	0.16	0.17	0.12
PI	0.14	0.13	0.12	0.09
PE	0.12	0.13	0.12	0.12
Sph	0.13	0.09	0.09	0.07

Standardna devijacija navedenih rezultata iznosi ≤ 0.04 (DOPA), ≤ 0.04 (PS), ≤ 0.05 (PI), ≤ 0.03 (PE) odnosno ≤ 0.03 (Sph — lipozomi).

Standard deviation of indicated results was ≤ 0.04 (DOPA), ≤ 0.04 (PS), ≤ 0.05 (PI), ≤ 0.03 (PE) and ≤ 0.03 (Sph-liposomes).

enkapsulirani PO_4 i ionoforu, u njima kroz najmanje 72 sata ne dolazi do spontanog taloženja. U sustavu s enkapsuliranim PO_4 i u prisutnosti ionofore kinetika taložnog procesa unutar i izvan lipozoma ovisi o nivou Chol u membranama (slika 1). Prilikom koncentracije Chol manje ili jednake 10 mol%, intralipozomalno taloženje započinje trenutno i praćeno je brzim širenjem mineralizacije u medij oko lipozom (krivulje 1 i 2).

U ovom slučaju intralipozomalno nastali kristali imaju ulogu cjepiva, vrlo brzo prodiru kroz membranu u vanjski medij gdje djeluju kao centri ekstralipozomalnog taloženja. Pri koncentraciji Chol 35 mol% ili više (krivulje 3 i 4) intralipozomalno taloženje je praktički nemjerljivo, dok ekstralipozomalni proces mineralizacije započinje nakon indukcionog perioda od najmanje 24 sata. U slučaju povećanog sadržaja Chol, lipozomalna membrana je znatno rigidnija i ionofora manje efikasna zbog ugradnje nefleksibilnih molekula Chol. U takvim je sustavima manji intenzitet spontanog istjecanja enkapsuliranog PO_4 u usporedbi s onima nižeg sadržaja Chol.



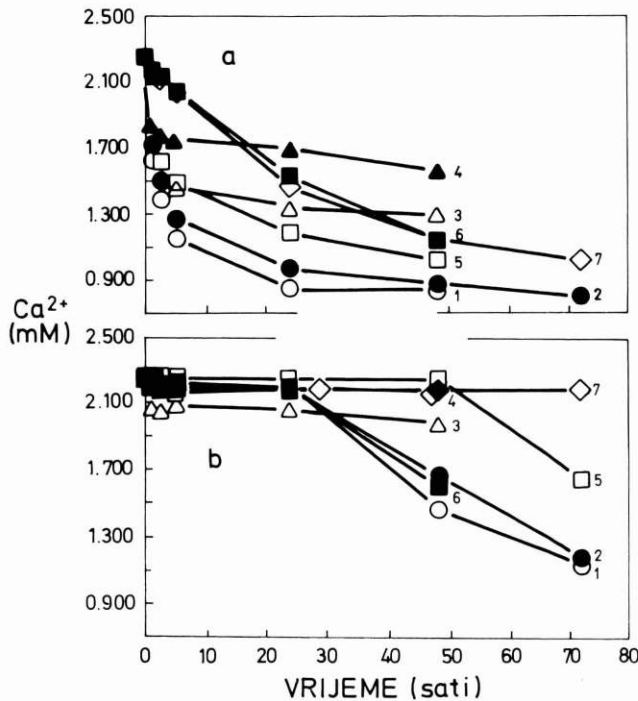
SLIKA 1.

Kinetičke promjene koncentracije kalcija u vanjskom mediju (dijagram a), intralipozomalnog taloženja (dijagram b) i ekstralipozomalnog taloženja (dijagram c) u PC — DCP — Chol lipozomima varijabilnog sadržaja Chol (kao što je na slici naznačeno). Svi lipozomi sadržavali su 50 mM enkapsuliranog fosfata i suspendirani su u otopini koja je inicijalno sadržavala 2.25 mM Ca i 1.5 mM PO_4

FIGURE 1.

Kinetic changes in the external solution calcium concentration (diagram a), intraliposomal precipitation (diagram b) and extraliposomal precipitation (diagram c) as observed in PC — Chol liposomal suspensions with different levels of Chol (as indicated). All liposomes contained 50 mM encapsulated phosphate, and were suspended in solutions containing 2.25 mM Ca and 1.5 mM PO_4 .

Zamijeni li se DCP u 7:2:X lipozomima drugim anionskim (DOPG, DOPA, PS ili PI) ili neutralnim FL (PE ili Sph), ne dolazi do promjene njihove stabilnosti, ali je u DOPA lipozomima uočen značajan porast vezanja Ca. Dok u ostalim sustavima ono iznosi 3–5% početne koncentracije, u DOPA-lipozomima je proporcionalno porastu koncentracije DOPA u lipidnoj ovojnici i kreće se od 10% ($2/18 \approx 10\%$) u 7:2:9 membranama do skoro 20% ($2/9 \approx 20\%$) u 7:2:0 sustavu. DOPG, DOPA i PS ne utječu na enkapsulaciju anorganskog PO_4 , koja je smanjena u PI-membranama, a izrazito niža u PE i Sph-lipozomima (tablica 2).



SLIKA 2.

Promjene koncentracije kalcija s vremenom u vodenim suspenzijama 7PC:2FL:1Chol (dijagram a) i 7PC:2FL:9Chol (dijagram b) lipozoma. Krivulje 1-7 odgovaraju sustavima s različitim FL-ima: 1 - DCP, 2 - DOPG, 3 - DOPA, 4 - PS, 5 - PI, 6 - PE i 7 - Sph.

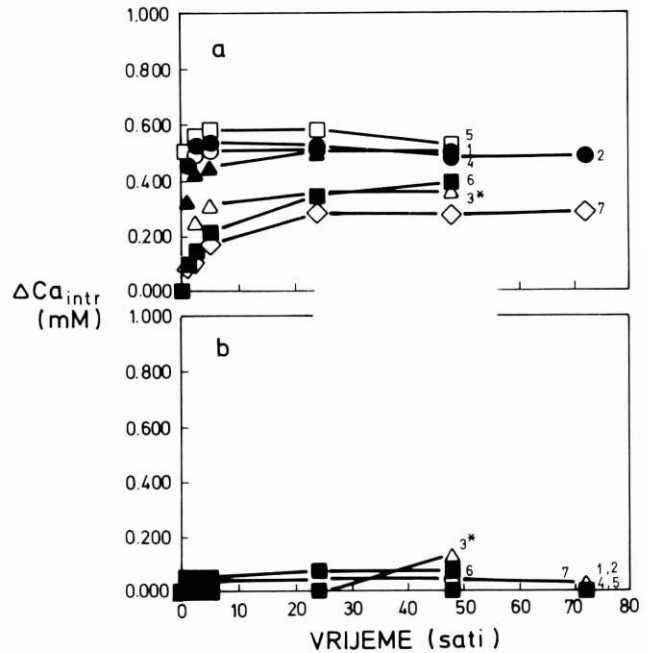
FIGURE 2.

Changes in calcium concentration as observed in aqueous suspensions of 7PC:2PL:1Chol (diagram a) and 7PC:2PL:9Chol (diagram b) liposomes. Curves 1 - 7 correspond to the systems with different phospholipids (PL's): 1 - DCP, 2 - DOPG, 3 - DOPA, 4 - PS, 5 - PI, 6 - PE and 7 - Sph.

Brzina mineralizacije, iskazana kao smanjenje koncentracije Ca u vanjskom mediju s vremenom, niža je u sustavima s DOPA i PS (krivulje 3 i 4 na slici 2) nego u DCP i PI membranama (krivulje 1, 2 i 5) ako je sadržaj Chol nizak (0 ili 10 mol%). Pri povećanom nivou Chol (u lipozomima s 35 ili 50 mol% Chol) kinetika taložnog procesa ovisi i o vrsti anionskog FL-a. Kod niske koncentracije Chol u sustavima s neutralnim FL-ima (krivulje 6 i 7) mineralizacija je sporija u usporedbi s membranama koje sadrže anionske FL-e (krivulje 1, 2 i 5). Ukoliko je sadržaj Chol povećan, razlike u kinetici taloženja između spomenute dvije grupe FL-a znatno su manje izražene.

Intenzitet intralipozomalnog taloženja opada s povećanjem koncentracije Chol u membranama bez obzira na vrstu FL-a (slika 3). Niže vrijednosti u DOPA-lipozomima (krivulja 3) mogu se objasniti porastom vezanja Ca, odnosno pojačanim spontanom istjecanjem enkapsuliranog PO_4 . U slučaju PE i Sph (krivulje 6 i 7) razlog smanjenja intralipozomalnih prinosa je niža enkapsulacijska sposobnost lipozoma s neutralnim FL-ima. Praktički potpuni izostanak taloženja unutar lipozoma, koji su sadržavali 50 mol% Chol u lipidnoj ovojnici, ukazuje na izraziti porast rigidnosti membrana neovisno o strukturi anionskog i/ili neutralnog FL-a.

Taloženje u vanjskom mediju inhibirano je u DOPA- i PS-lipozomima neovisno o sadržaju Chol (slika 4, krivulja 3 i 4). U membranama s ostalim FL-ima,

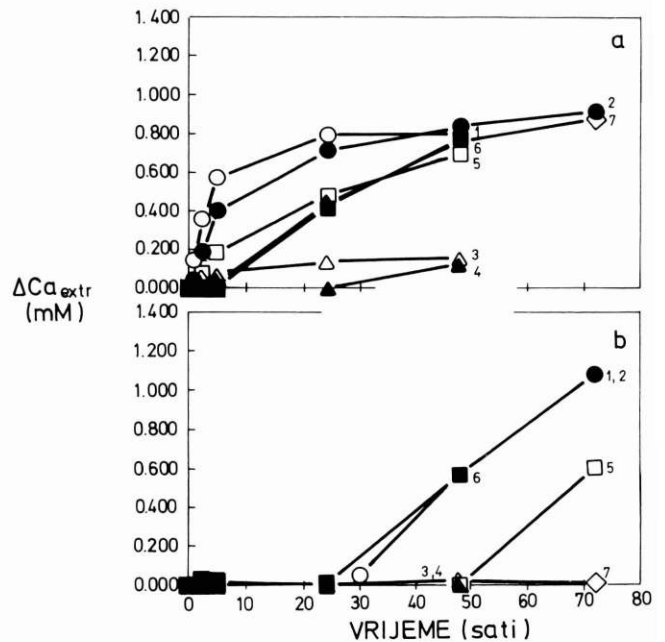


SLIKA 3.

Intralipozomalno taloženje (ΔCa_{intr}) u 7PC:2FL:1Chol (a) i 7PC:2FL:9Chol (b) lipozomalnim sustavima s različitim FL-ima (sastav lipozoma kao na slici 2).

FIGURE 3.

Intraliposomal precipitation (ΔCa_{intr}) in 7PC:2PL:1Chol (a) and 7PC:2PL:9Chol (b) liposomal systems composed of different PL's (liposome composition as given in Figure 2).



SLIKA 4.

Ekstralipozomalno taloženje (ΔCa_{extr}) u 7PC:2FL:1Chol (a) i 7PC:2FL:9Chol (b) sustavima identičnog sastava FL-a kao na slikama 2 i 3.

FIGURE 4.

Extraliposomal precipitation (ΔCa_{extr}) in 7PC:2PL:1Chol (a) and 7PC:2PL:9Chol (b) systems with identical PL composition as in Figures 2 and 3.

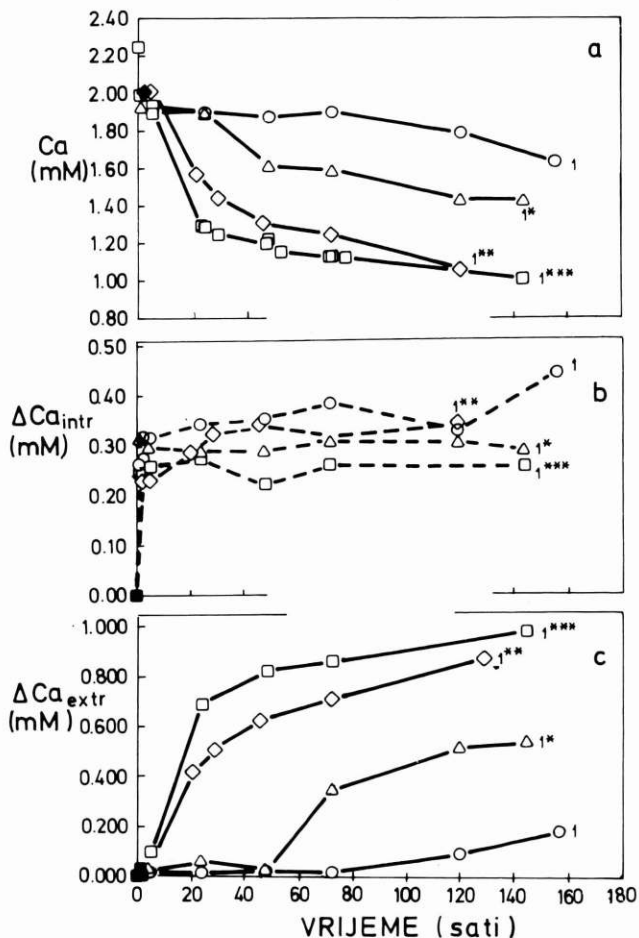
jednom kada dođe do usporavanja ili potpunog blokiranja intralipozomalnog taloženja (u pravilu se to događa kod višeg sadržaja Chol), mineralizacija u vanjskom mediju je usporena (započinje tek nakon induksijskog perioda od najmanje 24 sata (krivulje 1, 2, 5 i 6) ili se uopće ne registrira (krivulje 3, 4 i 7).

Očigledno je da ključnu ulogu u ekstralipozomalnom taložnom procesu ima cijepanje metastabilnih vanjskih otopina intralipozomalno nastalim kristalima apatita koji prodiru kroz lipidnu membranu u medij oko lipozoma i tu djeluju kao centri kristalizacije. Taloženje u vanjskom mediju koje započinje nakon izvjesnog vremena indukcije, odloženo je zbog smanjene količine cjepiva. Dva su temeljna razloga koja dovode do takvog utjecaja na membranski taložni proces:

- Pri povećanom sadržaju Chol, dotok Ca u unutrašnjost lipozoma smanjen je zbog manje efikasnosti hidrofilnog nosača iona što ima za posljedicu usporeno intralipozomalno nastajanje apatita.
- U slučaju ako se intralipozomalno taloženje i odvija neinhibirano, tranzit kristala nastalih unutar lipozoma u vanjski medij je otežan zbog povećane čvrstoće membrana s višim sadržajem Chol.

Slično jednostavnim modelnim membranama i u kompleksnom modelnom sustavu, tj. lipozomima gdje je simuliran lipidni sastav membrana vezikula matriksa, ne dolazi do taloženja u odsustvu ionofore i enkapsuliranog anorganskog fosfata. U njima se sveukupni taložni proces odvija znatno sporije nego u jednostavnim lipozomalnim suspenzijama (krivulja 1; slika 5a). Proces je sporiji i ukoliko se iz lipidne ovojnice uklone fosfolipidne komponente za koje je prethodno ustanovljeno da inhibiraju bilo intra, bilo ekstralipozomalno taloženje (PS, PE i Sph) i zamijene odgovarajućom količinom PC-a (krivulje 1*, 1** i 1***; slika 5a).

Preračunavanjem podataka na intra (slika 5b), odnosno ekstralipozomalno (slika 5c) taloženje, može se pokazati da u kompleksnim membranama PS, PE i Sph djeluju poglavito na taloženje u vanjskom mediju, dok je njihov utjecaj na taloženje unutar lipozoma zanemarljiv. Kako je i u odsustvu spomenuta tri FL-a intenzitet intralipozomalnog taloženja manji nego u jednostavnim modelnim membranama, nameće se zaključak da preostale lipidne komponente prisutne u modificiranim kompleksnim lipozomima utječu na kinetiku mineralizacije. Djelovanje preostalih lipida ispitano je, stoga, u jednostavnim 7:2:1 lipozomima, gdje je DCP bio zamijenjen odgovarajućom količinom FA, TAG ili Cer. Rezultati tih eksperimenata sažeti su na slici 6. Intralipozomalno taloženje (slika 6b) započinje praktički momentalno u FA-lipozomima, ali su dostignute plato vrijednosti niže od onih u 7:2:1 kontrolnim sustavima s kiselim FL-ima u membranama. U slučaju TAG i Cer, vrijednosti ΔCa_{intra} su znatno niže, a proces je kinetički usporen, što upućuje na zaključak da upravo ove dvije komponente kontroliraju intralipozomalnu mineralizaciju. Tom zaključku ide u prilog i činjenica da je njihov sadržaj u membranama vrlo visok (TAG i Cer čine zajedno 40 mol% membranskih lipida). Ekstralipozomalno je taloženje (slika 6c) modificirano prvenstveno djelovanjem PS, u manjoj mjeri Sph i PE, a tek neznatno TAG i Cer. U koncentraciji u kojoj je zastupljen u kompleksnim membranama (22 mol%) Chol ne modificira značajnije bilo intra bilo ekstrali-



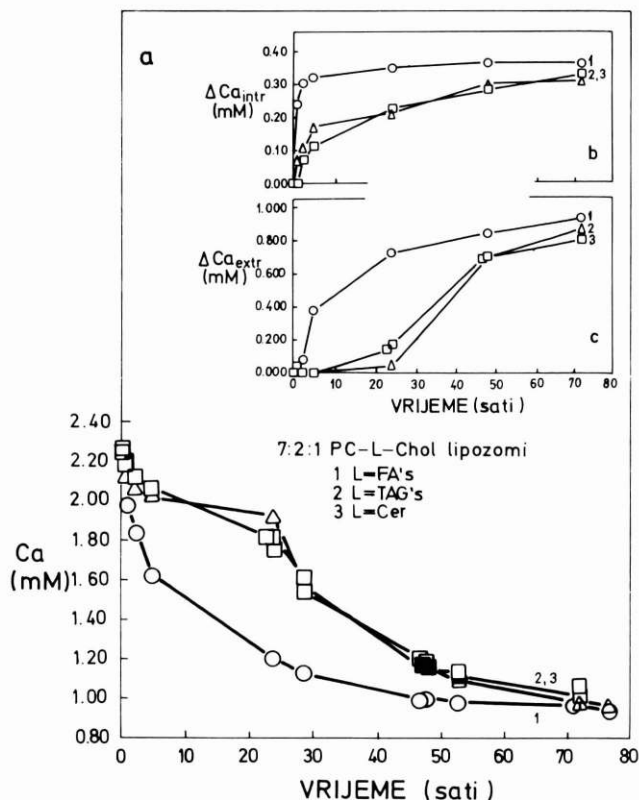
SLIKA 5.

Kinetičke promjene koncentracije kalcija u vanjskoj otopini u suspenzijama lipozoma koji po sastavu lipida odgovaraju membranama vezikula matriksa (krivulja 1, oznaka ○), te u modificiranim sustavima bez PS (krivulja 1*, oznaka △), bez PS i Sph (krivulja 1**, oznaka ◇) i bez PS, Sph i PE (krivulja 1***, oznaka □) (a). Odgovarajuće promjene koncentracije kalcija uzrokovane intralipozomalnim (ΔCa_{intra} ; b) odnosno ekstralipozomalnim taloženjem (ΔCa_{extr} ; c). Svi su lipozomi sadržavali 50 mM enkapsuliranog anorganskog fosfata i suspendirani su u otopinama početne koncentracije 2.25 mM Ca i 1.5 mM PO_4 .

FIGURE 5.

Changes in external solution calcium concentration as observed in matrix vesicle-like liposomes (curve 1, ○), and in modified systems without PS (curve 1*, △), without PS and Sph (curve 1**, ◇) and without PS, Sph, and PE (curve 1***, □) (a). Corresponding changes in calcium concentration due to intra- (ΔCa_{intra} ; b) and extraliposomal precipitation (ΔCa_{extr} ; c). All liposomes contained 50 mM encapsulated phosphate and were suspended in a solution initially containing 2.25 mM Ca and 1.5 mM PO_4 .

pozomalno taloženje. Smanjeno ekstralipozomalno taloženje u modelnim sustavima je rezultat agregacije lipozoma oko kristala koji imaju ulogu cjepiva, čime se blokira difuzija iona reaktanata do mjesta rasta na površini kristala. Međutim, ne postoje indikacije da klasificirajuće vezikule matriksa agregiraju in vivo — naprotiv, do nakupljanja minerala dolazi u ekstracelularnom mediju u neposrednoj okolici izoliranih vezikula nakon što dođe do prodora primarno intravezikularno nastalih kristala u vanjski medij. Vjerojatno je isto tako i da transmembranski tran-



SLIKA 6.

Promjena koncentracije kalcija (a) u 7:2:1 PC-L-Chol (L = FA, TAG ili Cer), te odgovarajuće promjene intralipozomalnog (b) i ekstralipozomalnog taloženja (c).

FIGURE 6.

Changes in calcium concentration (a) in 7:2:1 PC-L-Chol (L = FA, TAG or Cer), and the corresponding Ca losses due to intraliposomal (b) and extraliposomal precipitation (c).

sport kalcijevih iona nije najznačajniji proces koji kontrolira kalcifikaciju vezikula matriksa. Na to navodi činjenica da se u modelnim sintetičkim vezikulama intralipozomalno taloženje odvija brzo u usporedbi s ekstralipozomalnim, što znači da transport kalcija pomoću ionofora nije ograničavajući faktor u procesu mineralizacije. Osim toga u membranama vezikula matriksa postoje i brojni proteinski kanali koji mogu samo dodatno pospješiti transport iona u tim strukturama.

ZAKLJUČAK

Na temelju opisanih modelnih istraživanja moguće je zaključiti slijedeće:

* kinetika taloženja kalcij fosfata iz vodenih suspenzija lipozoma, ovisi, pored vanjskih faktora (temperatura, početna prezasićenost) i fizičkih karakteristika lipozoma (veličina, lamelarnost), o sastavu lipidne ovojnice (priroda, jačina, koncentraciji i rasporedu liganada na površini membrana);

* različiti lipidni sastojci membrana djeluju na kinetiku biomineralizacije u modelnim sustavima bilo da a) kontroliraju transmembranski transport Ca iona, b) usporavaju prodiranje intralipozomalno nastalih kristala u medij oko lipozoma, ili c) inhibiraju taloženje na primarno intralipozomalno nastalim

kristalima kad se oni jednom nađu u ekstralipozomalnom mediju. Posljednji od triju spomenutih procesa najvjerojatnije je i najmanje biološki relevantan. Najvjerojatniji dominantni proces u regulaciji biomineralizacije je transport primarno intralipozomalno nastalih kristala u vanjski medij. Ovim je modelnim eksperimentima pokazano da na taj proces značajno utječe lipidni sastav membrana — različita i vrlo specifična djelovanja nekih anionskih FL-a (PS, DOPA), neutralnih FL-a (Sph, PE), nepolarnih triacilglicerola, kao i glikolipida (Cer) mogu u tom procesu imati odlučujuću ulogu.

Zahvala

Autor (DŠ) želi zahvaliti Fogarty International Centru za podršku ovom istraživačkom projektu, te National Institute of Dental Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, gdje su eksperimenti izvođeni. Rad je također podržan od strane Commission of the European Communities, Directorate-General XII for Science, Research and Development te odgovarajućeg znanstvenog fonda Republike Hrvatske.

Acknowledgements

Author (DS) wishes to thank the Fogarty International Foundation for financial support of this research work and the National Institute of Dental Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA for the opportunity to carry out these investigations. The support given by the Commission of the European Communities, Directorate-General XII for Science, Research and Development and by the Council for Scientific Research of Croatia is gratefully acknowledged.

LITERATURA

1. Anderson H. Calcification processes. *Pathol A* 1980; 15:45.
2. Bangham A, Standish M, Watkins J. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Molec Biol* 1965; 13:238.
3. Boskey A. Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clin Orthop Rel Res* 1981; 157:225.
4. Deamer D, Bramhall J. Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. *Chem Phys Lipids* 1986; 40:167.
5. Eanes ED, Hailer A, Costa J. Calcium phosphate formation in aqueous suspensions of multilamellar liposomes. *Calcif Tissue Int* 1984; 36:421.
6. Eanes ED, Haile P A. Liposome-mediated calcium phosphate formation in metastable solutions. *Calcif Tissue Int* 1985; 37:390.
7. Eanes ED, Hailer A. Calcium phosphate precipitation in aqueous suspensions of phosphatidylserine-containing anionic liposomes. *Calcif Tissue Int* 1987; 40:43.
8. Eanes ED, Hailer A, Haywood B. Modulation of calcium phosphate formation by phosphatidate-containing anionic liposomes. *Calcif Tissue Int* 1988; 43:226.
9. Gregoriadis G. Liposome technology, vol II. Incorporation of drugs, proteins and genetic material, vol III. Targeted drug delivery and biological interaction. (CRC Press, Boca Raton 1983).
10. Lowenstam HA, Weiner S. On mineralization. (Oxford University Press, New York, Oxford, 1989).
11. Madden T. Current concepts in membrane protein reconstruction. *Chem Phys Lipids* 1986; 40:207.
12. Smaal E, Mandersloot J, de Kruijff B, de Gier J. Essential adaptation of the calcium influx assay into liposomes with entrapped arsenazo III for studies on the possible calcium translocating properties of acidic phospholipids. *Biochem Biophys Acta* 1985; 816:418.
13. Škrčić D, Eanes ED. Effect of membrane cholesterol on calcium phosphate formation in aqueous suspensions of anionic liposomes. *Calcif Tissue Int* 1990; u tisku.
14. Wilschut J, Hoekstra D. Membrane fusion: lipid vesicles as a model system. *Chem Phys Lipids* 1986; 40:145.
15. Yagi K. Medical applications of liposomes. (Karger, Basel 1984).

Abstract

LIPOZOMES AS A MODEL SYSTEM IN BIOMINERALIZATION RESEARCH

Drago Škrtić and Edward D. Eanes

Institute »Ruder Bošković« Zagreb and National Institute of Dental research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

Artificial lipid vesicles, liposomes, are used as a model for examining membrane-mediated calcium phosphate mineralization. Applying different procedures and techniques, the kinetics of mineral formation are followed in aqueous suspension of anionic liposomes containing high levels of cholesterol, different phospholipid – cholesterol compositions and model liposomes with matrix vesicle-like compositions.

Results of the study show that membrane lipid constituents can affect calcium phosphate precipitati-

on in liposome suspensions at least in 3 ways: (1) by controlling transmembrane transport of calcium ions, (2) by delaying the release of intraliposomally formed seed crystals into the external medium and (3) by inhibiting further growth of seed crystals once they come into contact with the external solution. With 50 mM encapsulated phosphate and in the presence of ionophore, cholesterol significantly affected the mineralization kinetics. Inhibition of ionophore-mediated intraliposomal mineral formation could be related to the inflexible cholesterol molecules making the liposomal membrane more rigid. Interference of cholesterol with the membrane transport processes necessary for endogenous precipitation in liposomes containing different anionic components is not compromised by the specific phospholipid incorporated in the membrane.

Key words: biomineralization, calcium phosphates, cholesterol, liposomes, matrix vesicles

Received: 11th September, 1990