

Biomineralizacija u beskralježnjaka

Ćutić, Tamara

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:113658>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2023-12-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

BIOMINERALIZACIJA U BESKRALJEŽNJAKA
BIOMINERALIZATION IN INVERTEBRATES
SEMINARSKI RAD

Tamara Ćutić

Preddiplomski studij biologije

Undergraduate study of biology

Mentor: izv. prof. dr. sc. Renata Matonićkin Kepčija

Zagreb, 2019.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. BIOMINERALI | 2 |
| 3. BIOMINERALIZACIJA | 4 |
| 3.1. BIOLOŠKI INDUCIRANA MINERALIZACIJA | 4 |
| 3.2. BIOLOŠKI KONTROLIRANA MINERALIZACIJA..... | 5 |
| 3.2.1. PROSTORNO RAZDVAJANJE | 9 |
| 3.2.2. OKVIR ORGANSKOG MATRIKSA | 10 |
| 3.2.3. ZASIĆENA OTOPINA | 11 |
| 3.2.4. KONTROLA NUKLEACIJE..... | 11 |
| 3.2.5. RAST KRISTALA | 12 |
| 4. ŠKOLJKAŠI | 14 |
| 4.1. LJUŠTURA | 15 |
| 4.2. PLAŠT..... | 15 |
| 4.3. PERIOSTRAKUM..... | 16 |
| 4.4. OOSTRAKUM I HIPOSTRAKUM | 17 |
| 4.5. BISERI | 18 |
| 5. BODLJIKAŠI..... | 19 |
| 5.1. MINERALIZACIJA U LIČINKE JEŽINCA | 19 |
| 5.2. MINERALIZACIJA U ODRASLOG JEŽINCA | 21 |
| 6. LITERATURA..... | 22 |
| 7. SAŽETAK..... | 24 |
| 8. SUMMARY..... | 24 |

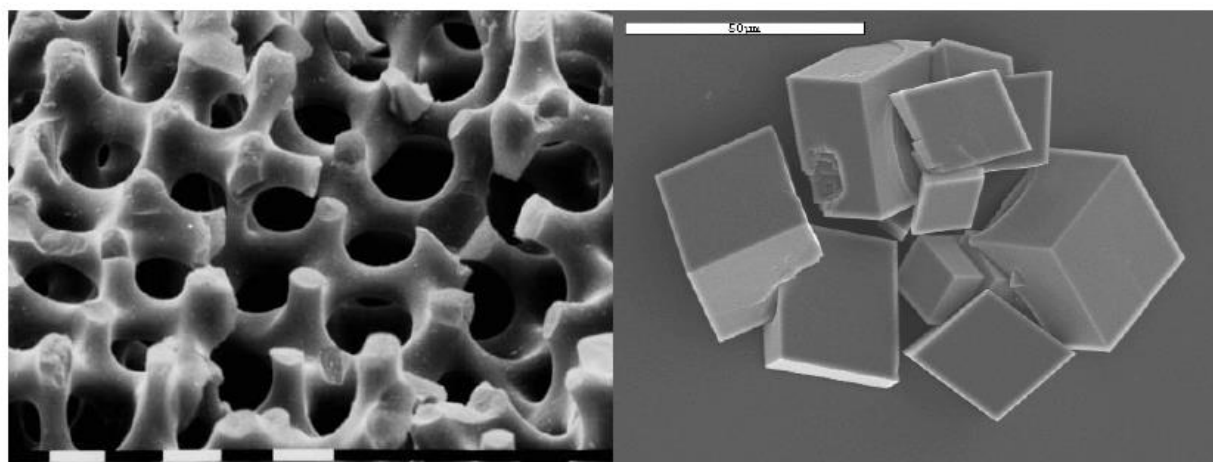
1. UVOD

Pojam biomineralizacija odnosi se na skup procesa kojima organizmi stvaraju minerale. Činjenica da svi klasteri eukariota sadrže organizme koji mineraliziraju i stvaraju preko 60 različitih tipova minerala, govori o tome koliko je to rasprostranjen i raznolik fenomen. Stoga ne treba čuditi da produkti biomineralizacije imaju snažan utjecaj na biosferu. Primjerice kalcijev karbonat kojeg stvaraju oceanski organizmi kao što su nektonski puževi, kokolitoforidi i foraminifere, ima velik utjecaj na redistribuciju kalcijevih i bikarbonatnih iona, ali i brojnih povezanih elemenata u tragovima. Ovi organizmi značajno pridonose sedimentaciji kalcijeva karbonata u oceanima, stvarajući karakteristične sedimente. Shodno tome, čitav geokemijski ciklus ugljika ovisi o stopi mineralizacije oceanskih organizama (Lowenstam i Weiner 1989). Pored snažnih učinaka biomineralizacije, važno je spomenuti i one manje vidljive kao što su stvaranje minerala koji ne bi nastali bez prisutnosti organizama u određenom okolišu.

Pojavom procesa biomineralizacije organizmi koji su posjedovali tu sposobnost imali su selekcijsku prednost zbog čvrstoće i trajnosti svojih skeleta. Pregledom molekula koje sudjeluju u kontroli biomineralizacije dokazano je da različiti organizmi koriste slične, specifične makromolekule. Stoga se postavlja pitanje je li to rezultat divergencije od zajedničkog pretka ili konvergentne evolucije te su organizmi neovisno razvili slične mehanizme regulacije. Potrebno je naglasiti kako su istraživanja u području biomineralizacije dosad bila fokusirana na razumijevanje procesa kojima se ona odvija i dokazivanje iona i makromolekula koje u tome sudjeluju. Nedostatak informacija koje bi povezale sve procese i mehanizme u cjelinu, onemogućava potpuno razjašnjenje procesa biomineralizacije. Cilj ovoga rada je objasniti procese biomineralizacije i njihovu kontrolu u beskralježnjaka, s naglaskom na školjkaše i bodljikaše.

2. BIOMINERALI

Termin biomineral odnosi se na mineral stvoren od strane organizma, ali obuhvaća i činjenicu da većina takvih produkata sadrži mineralnu i organsku komponentu. Biominerali, stvoreni u kontroliranim uvjetima, imaju svojstva morfologije, veličine, kristaliničnosti i sastava elemenata u tragovima znatno različite od njihovog anorganski stvorenog analoga (**Slika 1.**).



Slika 1. Usporedba kristala kalcita: (lijevo) stereom bodljikaša i (desno) sintetski kristal kalcita. Preuzeto i prilagođeno iz: Dove i sur. (2003).

Kod većine organizama koji vrše mineralizaciju kation izbora je kalcij. Oko 50% danas poznatih biominerala sadrži kalcij (Lowenstam i Weiner 1989). To nije iznenađujuća informacija s obzirom da kalcij kao element sudjeluje u brojnim procesima staničnog metabolizma. Naime, taj opseg korištenja kalcija doveo je do nastanka pojma kalcifikacija, koji je otkrićem novih elemenata koji sudjeluju u procesima mineralizacije preinačen u pojam biomineralizacija. Danas se pojam kalcifikacije odnosi na stvaranje minerala kalcija koji sadržavaju fosfate, karbonate, oksalate i sl. Minerali kalcijeva karbonata su najrasprostranjeniji biogeni minerali prema količini, ali i distribuciji u različitim svojstama (Lowenstam i Weiner 1989). Od osam danas poznatih polimorfa kalcijeva karbonata, sedam ih je kristaliničnih, a samo jedan amorfan. Amorfnost odražava strukturu minerala u kojem su molekule nepravilno raspoređene te ona ne reflektira X-zrake. Takvih biogenih minerala je oko 25% ukupnog broja minerala.

Unutar svake skupine minerala postoji najmanje jedna faza koja sadržava vodu ili hidroksilnu skupinu. Hidratizirani oblici minerala čine oko 60% svih biogenih minerala. Svi dosad otkriveni biominerali silikata sadrže vodu. Ovakva rasprostranjenost i učestalost hidratiziranih minerala ima svoje objašnjenje. Takve forme u odnosu na svoje dehidrirane analoge imaju znatno niže energetske barijere potrebne za procese nukleacije i rasta kristala. Stoga organizmi, u svrhu uštede energije, koriste Ostwald-Lussac-ov zakon u svoju korist preferirajući precipitaciju nižih energetske faza (Nancollas 1983).

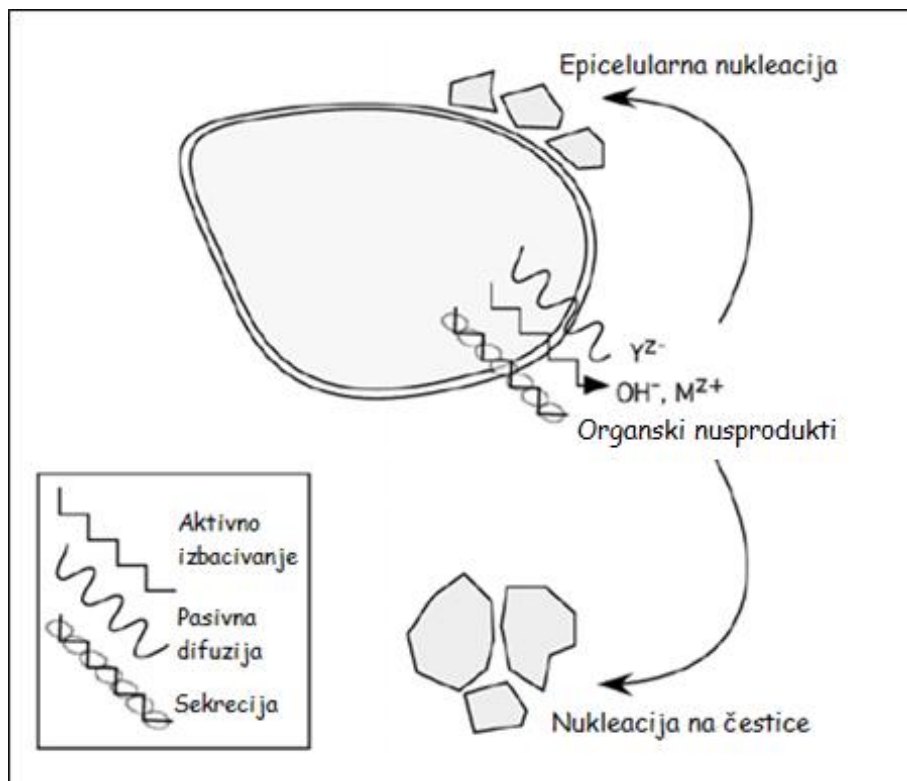
3. BIOMINERALIZACIJA

U teoriji, procesi biomineralizacije se mogu podijeliti na one kod kojih postoji određeni oblik kontrole organizma nad oblikom i procesom mineralizacije te na one kod kojih nema kontrole. U stvarnosti podjela nije toliko jasna zbog toga što kontrolu možemo definirati na različite načine. Kako bismo mogli razlikovati procese koji nisu evoluirali u svrhu mineralizacije, ali ipak rezultiraju nastankom minerala od onih koji su usmjereni stvaranju minerala, Lowenstam (1981) stvara dva pojma. „Biološki inducirana“ mineralizacija za prvi tip procesa i „organskim matriksom posredovana“ mineralizacija za drugi tip procesa, čiji naziv Mann (1983) preinačava u „biološki kontrolirana“ mineralizacija. Proces biomineralizacije mogu biti slabo do vrlo detaljno regulirani, a ta regulacija postiže se različitim osnovnim procesima koji se koriste u raznim kombinacijama i na razne načine kako bi se stvorio konačan produkt.

3.1. BIOLOŠKI INDUCIRANA MINERALIZACIJA

Taloženje minerala koje se događa kao rezultat međudjelovanja biološke aktivnosti i okoliša naziva se biološki induciranom mineralizacijom. Učestala je kod protista i česti je proces u bakterija i gljiva. Ono što razlikuje ovaj tip mineralizacije od kontrolirane je to da se ova mineralizacija odvija u otvorenom okolišu, a ne u prostoru specifično namijenjenom u tu svrhu. Također, nema specijaliziranih struktura koje potiču mineralizaciju. U vodenim okolišima takvo taloženje nije teško postići, dovoljne su male disturbancije kao što su oslobađanje kationa ili postojanje nabijene površine kako bi se potaknulo stvaranje minerala. Primjerice stijenka ima važnu ulogu u fazi indukcije zbog toga što se nukleacija često odvija na njezinoj površini i mineral može ostati pričvršćen na stijenu. Kod ovakvih mineralizacija biološki sustav ima vrlo malu kontrolu nad stvaranjem minerala, iako indirektno utječe na tip minerala koji nastaje, djelovanjem na pH i kemizam vode (**Slika 2.**). Karakteristika minerala koji nastaju biološki induciranom mineralizacijom je heterogenost. Ona uključuje varijabilnu vanjsku morfologiju, sastav elemenata u tragovima, strukturu i veličinu čestica. Ako su kristalinični, minerali imaju slične uzorke kao njihovi anorganski analozi. Frankel i Bazyliński (2003) pokazali su da sastav minerala varira koliko varira i okoliš unutar kojeg se formiraju. To znači da će isti organizam u različitim okolišima, uzrokovati nastanak različitih minerala.

Važno je napomenuti kako to ne definira biološki induciranu mineralizaciju, ali doprinosi njezinom raspoznavanju.

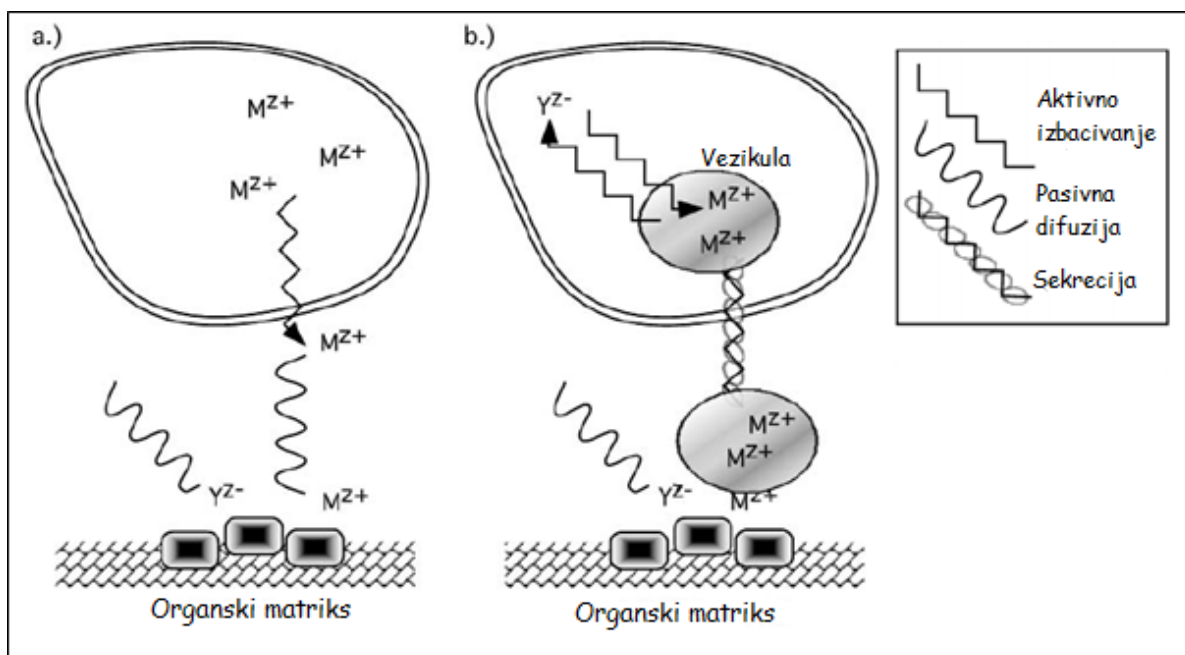


Slika 2. Prikaz biološki inducirane mineralizacije. Mineral se taloži kao rezultat metaboličke aktivnosti koja utječe na pH i kemizam vode. Stanica je uzročni agens i nema kontrolu nad tipom minerala. Preuzeto i prilagođeno iz: Dove i sur. (2003).

3.2. BIOLOŠKI KONTROLIRANA MINERALIZACIJA

Kod biološki kontrolirane mineralizacije, organizmi koriste staničnu aktivnost kako bi upravljali procesima nukleacije i rasta, morfologijom i lokacijom minerala koji nastaje. Bez obzira na stupanj kontrole koji može varirati, ono što karakterizira ovakvu mineralizaciju jest to da se gotovo bez iznimke odvija u izoliranom okolišu. S obzirom na lokaciju mjesta mineralizacije u odnosu na stanice koje su za nju odgovorne, razlikujemo ekstracelularnu, intercelularnu i intracelularnu mineralizaciju. Važno je napomenuti kako ne možemo u potpunosti definirati mineralizaciju na taj način, zbog toga što se početak stvaranja minerala može odvijati na jednom mjestu, a nastavak ili završetak na drugom mjestu.

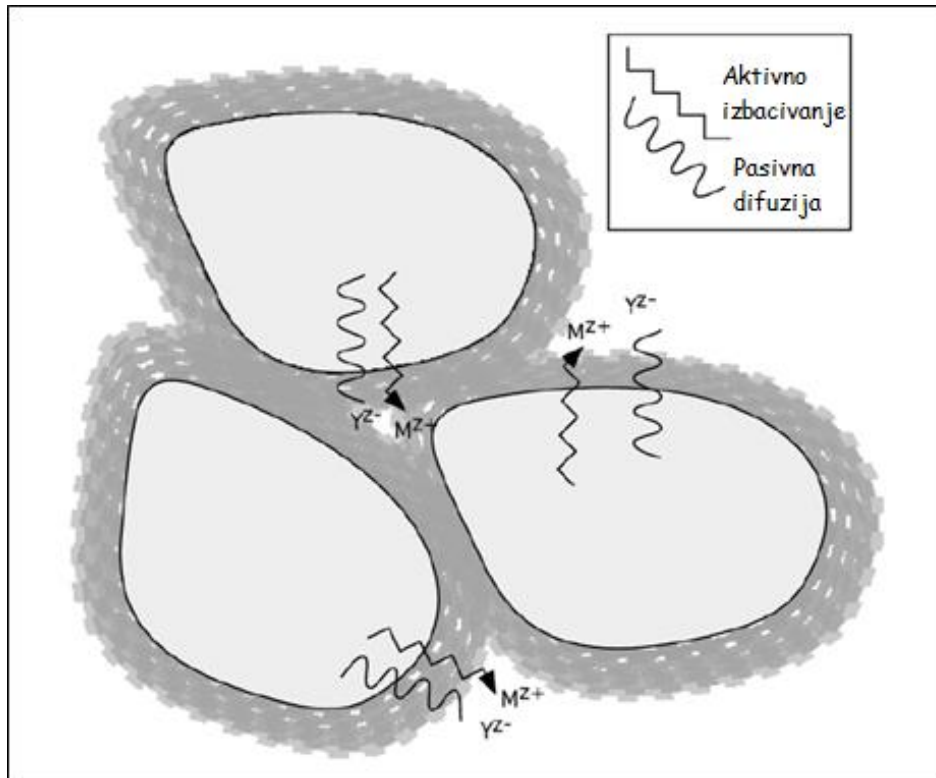
Ekstracelularna mineralizacija započinje stvaranjem matriksa makromolekula izvan stanice na mjestu na kojem će se odvijati stvaranje minerala. Pojam matriksa podrazumijeva grupu makromolekula koju čine proteini, polisaharidi i glikoproteini sastavljeni u trodimenzionalan okvir. Postoje dva tipa ekstracelularne mineralizacije s obzirom na način na koji stanica doprema konstituente organskog okvira (**Slika 3.**). Prvi način je da stanica aktivno izbacuje katione kroz membranu u međustaničnu tekućinu (Simkiss 1986) i kada se postigne određena razina zasićenosti tekućine, kationi se dalje kreću difuzijom do organskog matriksa. Drugi način je da stanica koncentrira katione u obliku vodenih iona unutar vezikula, vezikule se potom izlučuju i na mjestu mineralizacije dolazi do oslobađanja kationa djelovanjem organskog okvira. Kretanje aniona difuzijom je većinom posljedica održavanja elektroneutralnosti i pH gradijenta nastalog zbog transporta kationa (Dove i sur. 2003). Činjenica da stanica u oba slučaja aktivno doprema katione na mjesto mineralizacije, razlikuje ekstracelularno kontroliranu mineralizaciju od biološki inducirane mineralizacije.



Slika 3. Ilustracija biološki kontrolirane ekstracelularne mineralizacije koja pokazuje da je proces karakteriziran nukleacijom izvan stanice. Pod a.) aktivno izbacivanje kationa iz stanice i difuzija do mjesta mineralizacije, pod b.) koncentriranje kationa unutar vezikule, izlučivanje i oslobađanje na mjestu mineralizacije. Preuzeto i prilagođeno iz: Dove i sur. (2003).

Intercelularna mineralizacija nije široko rasprostranjena. Karakteristična je za jednostanične organizme koji formiraju kolonije. Ovdje površina organizama ima ulogu izolacije mjesta mineralizacije (Dove i sur. 2003). Vanjske površine stanica čine organski matriks koji usmjerava nukleaciju i rast minerala preko staničnih površina (**Slika 4.**). Ovakva

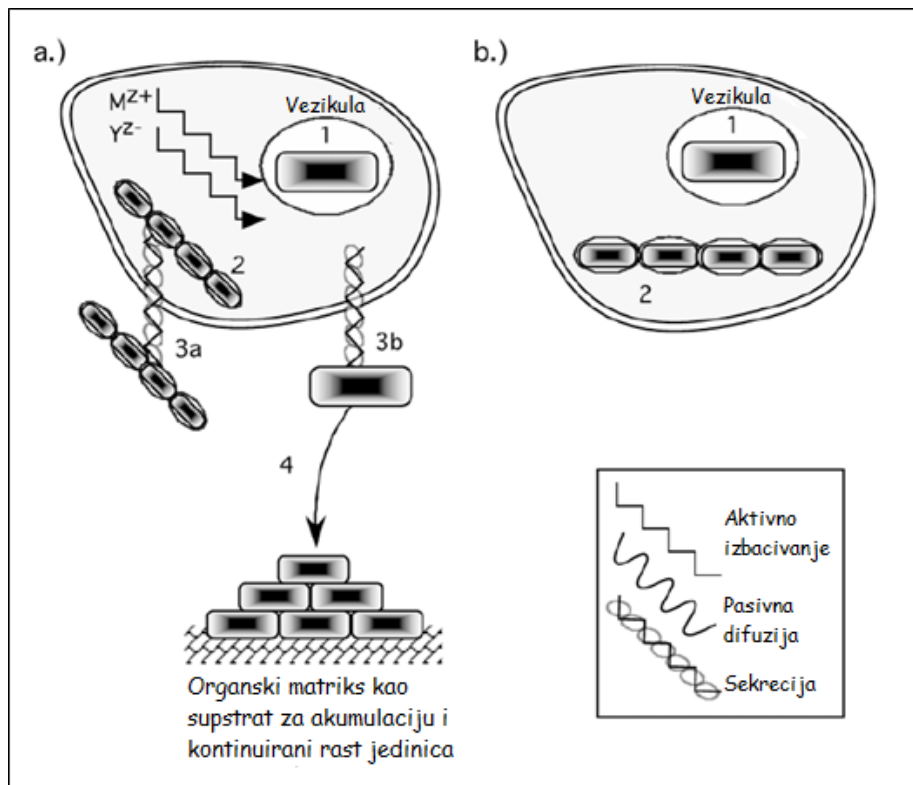
mineralizacija može biti takvog opsega da minerali u potpunosti ispune međustanične prostore i tvore svojevrsan egzoskelet. Iako zbog položaja ovakva mineralizacija može podsjećati na induciranu, istraživanja su pokazala kako površina organizama ima utjecaj na oblik i tip minerala koji nastaje.



Slika 4. Intercelularna mineralizacija prilikom koje površine stanica imaju ulogu organskog supstrata za nukleaciju i rast minerala. Kationi se izbacuju iz stanice i regulira se sastav tekućine kako bi se održala kontrola nad tipom i rastom minerala. Preuzeto i prilagođeno iz: Dove i sur. (2003).

Intracelularna mineralizacija je tip kontrolirane mineralizacije koji se odvija unutar specijaliziranih vezikula ili vakuola koje upravljaju nukleacijom unutar stanice. Ova strategija je vrlo raširena. U ovom slučaju, stanica ima visok stupanj kontrole nad koncentracijama sastavnih iona minerala u okolišu gdje također može postojati organski matriks kao predložak za nukleaciju. Membrana vezikule ili vakuole određuje pH vrijednost i u određenoj mjeri sastav elemenata u tragovima. Minerali se formiraju intracelularno prije nego što eventualno postanu ekstracelularni te iz stanice mogu izaći kao pojedinačni elementi ili kao sastavljene jedinice. Ako iz stanice izađu pojedinačni elementi, slijedi organizacija u uređene strukture posredovanjem organskog matriksa (**Slike 5. i 3b.**). Nastali biominerali mogu napustiti stanicu na dva načina. Jedan način je da vakuola ili vezikula unutar koje se formirao mineral, migrira do membrane stanice i izlučuje mineral egzocitozom. Drugi način izlaska je fuzija membrane odjeljka i plazmatske membrane te nastanak prolaza za izlaz minerala (Dove i sur. 2003).

Biomneral nastao intracelularnom mineralizacijom ne mora napustiti stanicu, već vezikula koja sadržava mineral ostaje u stanici (Slika 5.). To je rijedak fenomen, ali vrlo važan kod nekih organizama kao što su bakterije.



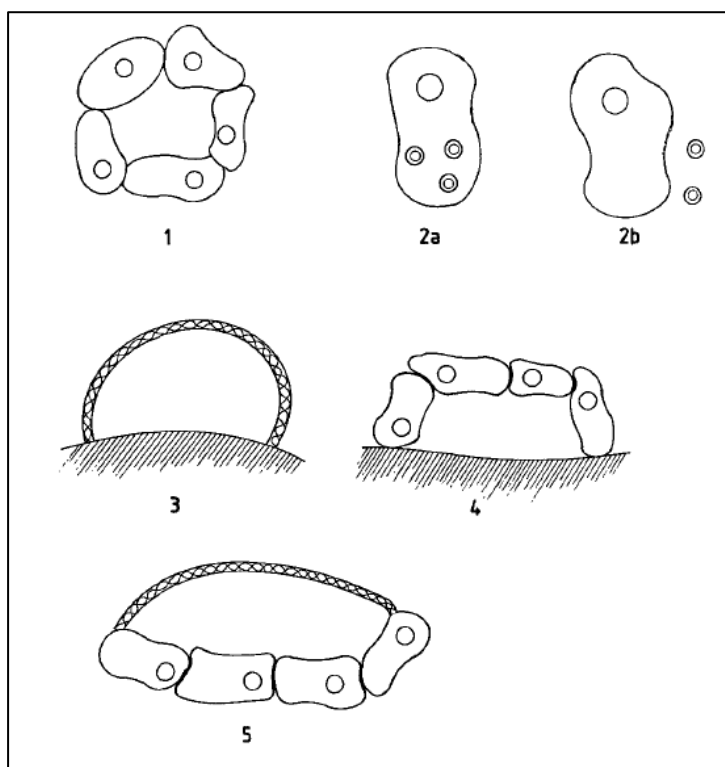
Slika 5. Biološki kontrolirana intracelularna mineralizacija prikazuje da se nukleacija odvija unutar stanice u specijaliziranom odjeljku. Pod a.) biomneral nastaje unutar vezikule i nastale jedinice mogu biti sastavljene intracelularno za daljnju sekreciju (3a) ili izlučene kao pojedinačni elementi (3b) za daljnju organizaciju u uređene strukture. Pod b.) biomneral ostaje unutar stanice kao pojedinačni element (1) ili se intracelularno organizira u uređenu strukturu (2). Preuzeto i prilagođeno iz: Dove i sur. (2003).

Karakteristika biološki kontrolirane mineralizacije i ono što je razlikuje od mineralizacije u anorganskom svijetu, kao što joj i samo ime govori, je kontrola. Kontrolni procesi u organizama su vrlo raznoliki, ali njihova kombinacija je ono što dovodi do nastanka specifičnih minerala. Kao što je već navedeno, za odvijanje nukleacije i rasta kod kontrolirane mineralizacije potrebna je lokalizirana zona unutar koje se održava potrebna zasićenost. Veličina odnosno volumen tog odjeljka nije nužno ono što ga definira, važno je da on ograničava difuziju unutar i van sustava. Takva izolacija može biti minimalna, kao što je samo grupiranje stanica i stvaranje zone koja ograničava difuziju, ali i visoko regulirana kao što je sastav odjeljka koji stvara vezikula. Odjeljak kao takav mora imati sposobnost modifikacije transporta najmanje jednog konstituenta biomnerala (najčešće kation) kao i protona i drugih iona koji sudjeluju u mineralizaciji. U samu kontrolu nastanka tog odjeljka ulaze prostorno

razdvajanje te stvaranje okvira organskog matriksa, dok se stvaranje kristala regulira prilikom stvaranja zasićene otopine, kontrolom nad nukleacijom i rastom kristala i u konačnici prestankom rasta kristala (Lowenstam i Weiner 1989).

3.2.1. PROSTORNO RAZDVAJANJE

Činjenica da je mjesto odvajanja biološki kontrolirane mineralizacije odvojeno od okoliša barijerom koja ograničava slobodan prolazak iona, nije bez razloga naglašavana. Ona je središnji dio kontrole koju organizmi vrše prilikom stvaranja minerala (Lowenstam i Weiner 1989). Stoga iznenađuje da, prema dosadašnjim saznanjima, raznoliki organizmi koriste vrlo slične metode za odvajanje potrebnog prostora. Najčešći oblik odvajanja je pomoću lipidnog dvosloja u staničnoj membrani ili kao dio vezikula koje se mogu nalaziti unutar ili izvan stanice (poglavlje 3.2.). Ostali materijali koji se koriste u svrhu odvajanja sastoje se od hidrofobnih makromolekula (proteina i polisaharida) koje polimerizacijom stvaraju nepropusne barijere. Najbolje opisani primjer tih materijala je periostracin (Waite i sur. 1979), protein koji je glavni konstituent vanjskog organskog sloja ljušture školjkaša. Postoje organizmi koji koriste i membrane i polimerizirane makromolekule u svrhu prostornog razdvajanja (**Slika 6.**). Svrha izolacije prostora u kojem se odvija stvaranje minerala je mogućnost kontrole nad tekućinom iz koje nastaju minerali. Osim što barijere formiraju mjesto nastanka biominerala, mogu aktivno sudjelovati u stvaranju istog. Primjerice, membrane vezikula sadrže lipide i proteine koji mogu direktno sudjelovati u kontroli aspekata mineralizacije (Lowenstam i Weiner 1989). Kod većine procesa mineralizacije ono što slijedi nakon odvajanja potrebnog prostora je daljnja podjela tog prostora.



Slika 6. Oblici prostornog odvajanja u biomineralizaciji. Prostor formiran grupiranjem stanica (1), vezikule lipidnog dvosloja unutar (2a) ili izvan stanice (2b), prostor formiran polimeriziranim makromolekulama vezanim na supstrat (3), prostor formiran stanicama vezanim na supstrat (4) i prostor formiran stanicama i polimeriziranim makromolekulama (5). Preuzeto i prilagođeno iz: Lowenstam i Weiner (1989).

3.2.2. OKVIR ORGANSKOG MATRIKSA

U velikom broju procesa mineralizacije, pogotovo u onima koji se odvijaju u tvrdim skeletnim dijelovima, novonastali odvojeni prostor dijeli se dalje pomoću molekula organskog matriksa. Pojam organskog matriksa uveo je Le Gros Clark (1945) i on upućuje na to da je to medij unutar kojeg se razvija nešto novo. Organski matriks nastaje tako da stanice koje sudjeluju u prostornoj odvojenosti, stvaraju mnoštvo makromolekula koje se izlučuju u izvanstanični prostor i tamo sastavljaju u trodimenzionalni okvir. Ovaj događaj je detaljno proučen kod stvaranja dentina zuba glodnjaka štakora (Lowenstam i Weiner 1989). Proteini koji čine organski matriks izlučuju se netom prije mineralizacije dentina. Iako se kod većeg dijela procesa mineralizacije stvara organski matriks, postoje iznimke. To je uglavnom slučaj kod vezikularne mineralizacije. Makromolekule organskog matriksa ne moraju nužno postojati kao jedna kontinuirana struktura, već to mogu biti pojedinačni monomeri ili diskontinuirane nakupine molekula.

3.2.3. ZASIĆENA OTOPINA

Nakon odjeljivanja potrebnog prostora, sljedeći korak je stvaranje zasićene otopine koja je preduvjet za taloženje minerala. Stvaranje takve otopine pod kontrolom je stanice ili stanica koje upravljaju ostatkom procesa mineralizacije. Te stanice mogu biti dio barijera koje stvaraju odjeljke ili su to stanice koje sadrže ili izlučuju vezikule u kojima se odvija stvaranje minerala. Takve stanice moraju biti bogato opremljene kanalima, nosačima ili transporterima u svrhu aktivnog unosa različitih iona u odjeljke za mineralizaciju i moraju prema potrebi omogućavati pasivnu difuziju određenih iona. Postoji nekoliko strategija kojima stanice mogu kontrolirati nastanak minerala. Najdominantija od njih je vjerojatno sposobnost unošenja iona u otopinu u kontroliranom slijedu. Još jedna strategija, za koju je poznato da se odvija kod bentičkih foraminifera (Lowenstam i Weiner 1989) je držanje kationa i aniona razdvojenima do početka mineralizacije. Taj fenomen nije u potpunosti istražen, ali postoji razlog zbog kojeg se smatra da je široko rasprostranjen. Naime, svi do danas istraženi kiseli glikoproteini matriksa, uključeni u regulaciju mineralizacije, prvo moraju vezati kalcijeve ione kako bi zauzeli pravilnu konformaciju (Lowenstam i Weiner 1989). Dakle to je preduvjet za sastavljanje okvira organskog matriksa, što znači da kada postoji okvir, postoji i određena količina kalcijevih iona u ranoj fazi mineralizacije. Unošenjem aniona započinje mineralna nukleacija. Vrsta iona koji će ući u proces mineralizacije ovisi o načinu na koji se oni uzimaju iz okoliša, transportiraju kroz tkiva i uvode na konačno mjesto nastanka minerala.

3.2.4. KONTROLA NUKLEACIJE

Nukleacija je stvaranje prve kristalne jezgre nove faze čiji je daljnji rast termodinamički potaknut. Brojni organizmi kontroliraju samu nukleaciju kako bi kontrolirali čitavo formiranje minerala, ali postoje i organizmi koji ne kontroliraju samu nukleaciju, ali zato kontroliraju ostale aspekte mineralizacije. Kao i u ostalim fazama, kontrola može biti iznimno precizna ili pak vrlo niskog stupnja. Regulacija same nukleacije može biti indirektna u smislu da određene molekule u otopini mogu specifično inhibirati stvaranje početne jezgre jedne faze i tako potaknuti nastanak druge faze. Primjer takve regulacije je molekula adenzin trifosfata (ATP) koja uzrokuje stvaranje amorfnog kalcijevog fosfata inhibicijom nukleacije kristalinične faze (Lowenstam i Weiner 1989). Direktna kontrola nad nukleacijom vrši se pomoću specifično

stvorenih čvrstih površina. Takva nukleacija je učinkovitija od one u samoj otopini, zbog toga što se ograničavaju kretanje iona koji se moraju grupirati kako bi došlo do nastanka minerala. Tipovi supstrata koji najčešće sudjeluju u nukleaciji su lipidni dvosloj membrana i kiseli glikoproteini i proteoglikani koji se nalaze na površini okvira organskog matriksa. Već spomenuta mineralizacija unutar lipidnog dvosloja vezikula je vrlo učestala. Iako postoji vrlo malo konkretnih dokaza o aktivnoj uključenosti membrana vezikula u nukleaciju, najuvjerljiviji dokaz o sudjelovanju pružaju ekstracelularne vezikule unutar kojih se stvara hidroksiapatit (Ali 1983). Kod raznolikih organizama, promatranjem faza nastanka minerala pokazano je kako se mnogi od njih stvaraju nakupljanjem materijala u središtu vezikule što znači da membrane nisu mjesta nukleacije. Također unutar vezikula postoje organske makromolekule koje služe kao supstrati za nukleaciju, ali isto nisu u sastavu membrana vezikula. Potvrda sudjelovanja membrana u nukleaciji je sadržaj makromolekula (proteolipida i fosfolipida) koje snažno vežu kalcijeve ione (poglavlje 3.2.3.). Osim promatranjem samog procesa nukleacije, neke spoznaje može donijeti i promatranje ultrastrukture mineraliziranog tkiva. Ona može pokazati potiče li nukleacijsko mjesto nastanak jednog ili većeg broja kristala. Nukleacije prilikom kojih nastaje jedan kristal odvijaju se primjerice u sedefu ili prizmatičnom sloju školjkaša, a kuglaste čestice kod koralja ili mekušaca produkt su nukleacija prilikom kojih se stvara veći broj kristala na jednom mjestu.

3.2.5. RAST KRISTALA

Prema dosadašnjim istraživanjima smatra se kako organizmi imaju vrlo malen ili nikakav utjecaj na sam rast kristala. Postoje otkrića stereokemijskih zakona koji upravljaju procesom rasta i potvrde kako kiseli glikoproteini mogu djelovati na sličan način *in vitro* (Lowenstam i Weiner 1989). Prve indicije da se modifikacija rasta kristala odvija u živom organizmu dolaze iz istraživanja ježinca *Paracentrotus lividus*. Ekstrahirani glikoproteini u testovima *in vitro* ulaze u interakciju s kristalima kalcita i ostaju zatvoreni unutar njih. Takvi kristali imaju drukčiju fragmentaciju od normalnih kristala, što sugerira da se ovakav tip modifikacije odvija u mineralizaciji bodljikaša (Berman i sur. 1988).

Što se tiče konačnog produkta mineralizacije, kontrola nad mjestima gdje on nastaje često definira njegov oblik. Ako je mineralna faza koja nastaje amorfnu, konačan oblik je esencijalno isti kao i prostor u kojem se taloži. Neobična i unikatna morfologija silikatnih

organizama kao što su dijatomeje i silikoflagelati proizlazi iz vezikula odgovornih za konačan oblik njihovih struktura. Kristali koji se formiraju u odjeljcima stvorenim makromolekulama matriksa također prestaju rasti nakon kontakta s površinom matriksa. Takvi kristali su uglavnom pravilnije morfologije za razliku od onih koji nastaju u vezikulama i imaju zakrivljene površine. Još jedan učestao oblik prestanka rasta kristala uzrokovan je kontaktom dva kristala koji se stvaraju na različitim nukleacijskim mjestima. Nedostatak iona na mjestu mineralizacije također uzrokuje prestanak rasta kristala i pretpostavka je da je to glavni razlog prestanka rasta kristala koji nastaju biološki induciranom mineralizacijom.

4. ŠKOLJKAŠI

Razred školjkaša jedan je od sedam razreda koljena mekušaca. Školjkaši obuhvaćaju oko 25 000 vrsta i kolonizirali su većinu vodenih staništa, od dubokih oceana do slatkih voda. Osim školjkaša još 4 razreda stvaraju ljuštore, a to su: jednoljušturaši, puževi, glavonošci i koponošci. Razred bezljušturaša ne sadržava ljuštore, dok razred mnogoljušturaša stvara niz pločica nalik ljušturama, a ostatak tijela je prekriven spikulama. Osim stvaranja ljuštura, mekušci vrše brojne procese u koje su uključeni biogeni minerali. Izuzev uobičajenih uloga, kao što su zaštita od isušivanja i predacije, mekušci koriste minerale kao ljubavne strelice, ljuske jaja, zamke i skladišta kalcijevih iona. Dosad je poznat 21 različiti mineral od kojih je većina kristalinična, ali postoje i amorfni minerali.

Posljednjih godina područje istraživanja biomineralizacije školjkaša doživjelo je značajne promjene (Marin i sur. 2012). Istraživanja su usmjerena proučavanju ultrastrukture minerala i identifikaciji proteina matriksa ljuštore. Donedavno se smatralo kako se regulacija procesa biomineralizacije vrši samo pomoću procesa nukleacije kristala i inhibicije rasta kristala. Danas znamo da, iako su zastupljeni u maloj količini, proteini igraju važnu ulogu u kontroli sinteze biominerala. Vrlo su raznoliki i mnogi od njih imaju još nepoznate uloge. Ono što je poznato je da se primarna struktura velikog broja tih proteina sastoji od različitih funkcionalnih domena od kojih neke pokazuju enzimsku aktivnost, a neke su uključene u staničnu signalizaciju.

Školjkaši su životinje mekog tijela i stoga je potreba za zaštitom uzrokovala razvoj vanjske kalcificirane, čvrste strukture – ljuštore. Procesima kojima se izlučuje ljuštura ulaze u kategoriju biološki kontroliranih mineralizacija. Dakle potrebna je specijalizirana stanična mašinerija, što znači da je stvaranje ljuštore pod kontrolom gena. Proces je moduliran pomoću organskog matriksa koji se dijelom ugrađuje u ljušturu prilikom kalcifikacije. Iako se ljuštura smatra tipičnom mineralizacijom u školjkaša odnosno mekušaca, nalazimo je i u drugih koljena kao što su kolutićavci i člankonošci. Školjkaši i njihove ljuštore su među istraživanjima zbog toga što se koriste u komercijalne svrhe, za ishranu pa i proizvodnju bisera u industriji nakita.

4.1. LJUŠTURA

Ljuštura školjkaša sastoji se od dva dijela međusobno povezanih ligamentom. Morfologija ligamenta i brave, koja se sastoji od sustava zubića i smještena je ispod ligamenta, važan je kriterij za određivanje vrsta. Sama ljuštura sastoji se od nekoliko kalcificiranih slojeva te organskog sloja smještenih jedan iznad drugog. Izvana prema unutrašnjosti školjkaša nalaze se: tanki organski sloj periostrakum, potom središnji vapnenački sloj oostrakum (prizmatički sloj) te unutarnji vapnenački sloj hipostrakum sastavljen od sitnih kristalića. Kalcijev karbonat unutar ljuštire može biti u obliku kalcita, aragonita ili postojati kao mješavina uz određeni udio organskog materijala (Lowenstam i Weiner 1989).

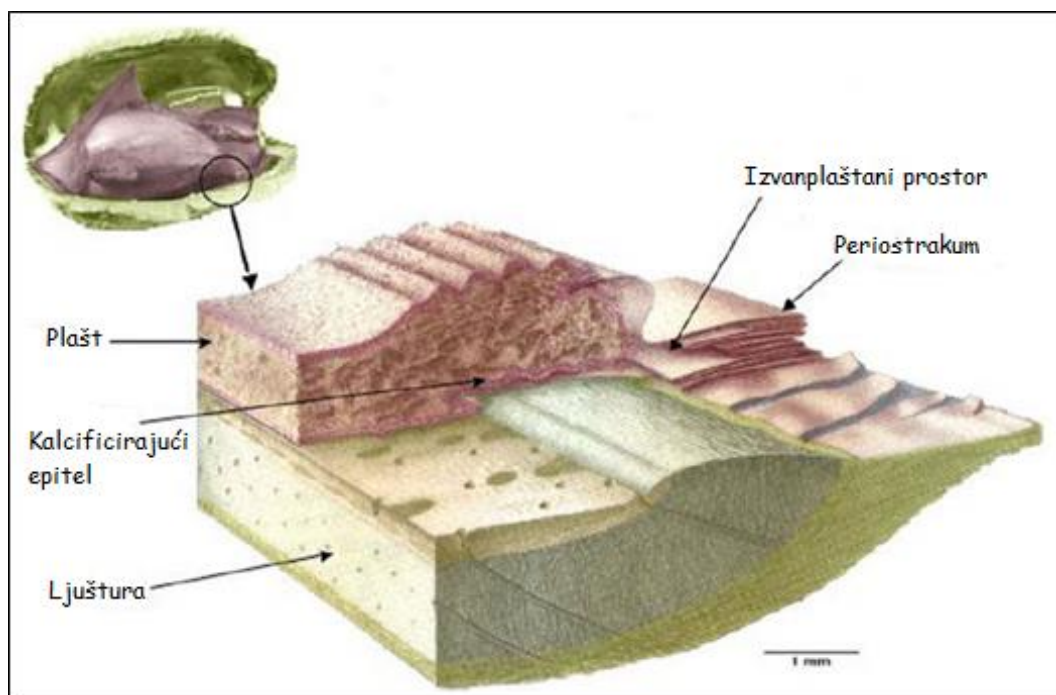
Postojanje različitih slojeva unutar ljuštire ima svoj značaj. Naime, prizmatički sloj nije pretjerano otporan na lomljenje, ali pokazuje određenu fleksibilnost koja je poboljšana zbog interakcije s organskim slojem. S druge strane, hipostrakum ima veliku otpornost na lom, ali je krutiji i zbog toga ima tendenciju pucanja prilikom savijanja. Dakle, asocijacija različitih slojeva stvara materijal koji ima svojstva dobre čvrstoće i fleksibilnosti. Također, odlaganje slojeva različitih tekstura i stvaranje jedinstvene površine sprječava širenje nastale pukotine čitavom debljinom ljuštire.

4.2. PLAŠT

Plast je organ odgovoran za stvaranje ljuštire te je od svih mekušaca najopsežnije razvijen u školjkaša. To je tanak sloj tkiva koji oblaže unutarnju površinu ljuštire i zatvara plaštanu šupljinu. Sastoji se od unutarnjeg epitela, tkiva, mišića, živčanih vlakana i vanjskog kalcificirajućeg epitela. Vanjski epitel čini jedan sloj stanica i on stvara i izlučuje sve makromolekule i ione potrebne za sintezu ljuštire. Stanice ruba vanjskog epitela plašta se razlikuju ultrastrukturom od stanica u središtu plašta. Produžene su, sadrže brojne mitohondrije i dobro razvijen endoplazmatski retikulum i Golgijev aparat. Rub plašta u školjkaša sastoji se od 3 nabora i on je najaktivnija zona rasta ljuštire. Na tom mjestu, osim što ljuštura raste u debljinu kao i kroz cijelu površinu, dolazi i do rasta koji prati rast same životinje.

4.3. PERIOSTRAKUM

Periostrakum je primarno proteinski sloj sastavljen od konhiolina koji kod zrelih ljuštura prekriva vanjsku površinu. Stvaraju ga specijalizirane stanice smještene u periostrakumskom žlijebu koji se nalazi između vanjskog i srednjeg nabora ruba plašta. Stanice izlučuju tekući film topivih prekursora koji postaju netopivi i čvrsti djelovanjem kvinona. Jedan od tih topivih prekursora je i periostracin (Waite i sur. 1979). Prekursori se sintetiziraju u Golgijevom aparatu gdje postaju strukturno uređene jedinice, a potom se pomoću vezikula izlučuju izvan stanica. Periostrakum u odraslih školjkaša varira s obzirom na debljinu, boju i ultrastrukturu. Primarne uloge ovog sloja su da pruža zaštitu od okoliša i izolira tkivo ruba plašta od okoliša. Štiti ljušturu od otapanja (Isaji 1993), čini predložak za ekstracelularnu mineralizaciju te zatvara prostor između tkiva plašta i ljušture – izvanplaštani prostor (**Slika 7.**). Taj prostor predstavlja medij u kojem se sastavljaju konstituenti potrebni za kalcifikaciju. Ispunjen je izvanplaštanom tekućinom koja sadrži kalcijev karbonat, anorganske ione i proteine (Marin i sur. 2012) te se sastavom razlikuje od okolišne vode i hemolimfe. Periostrakum je često obojen stoga stvara svojevrsnu kamuflažu protiv predatora, pogotovo kod potpuno sesilnih školjkaša, iako obojenost može biti uzrokovana i pigmentima u mineraliziranim slojevima.

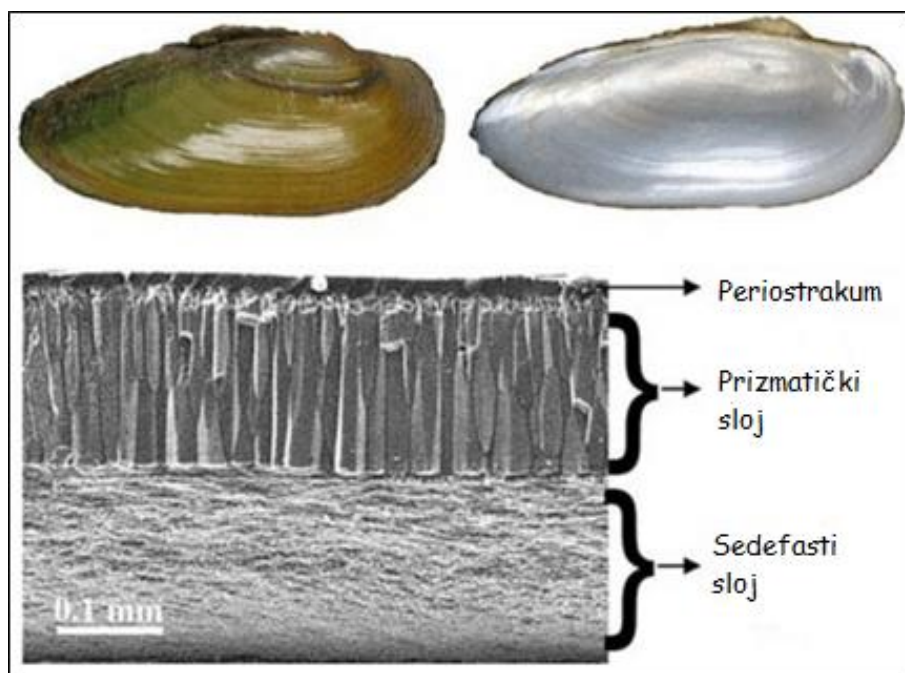


Slika 7. Struktura ljušture školjkaša *Arca sp.* Preuzeto i prilagođeno iz: Marin i sur. (2012).

4.4. OOSTRAKUM I HIPOSTRAKUM

Oostrakum je središnji vapnenački sloj smješten između periostrakuma i hipostrakuma (Slika 8.). Sastoji se od kristala aragonita u obliku prizmi koji se razvijaju okomito na površinu ljušture, stoga je drugi naziv prizmatički sloj.

Unutrašnji vapnenački sloj naziva se hipostrakum. Vjerojatno je najfascinantniji od dosad opisanih struktura. To je najčvršća struktura koju stvaraju školjkaši i istraživanja su pokazala da je preko 1000 puta otpornija na lom nego kemijski sintetizirani aragonit (Marin i sur. 2012). Drugi naziv za ovaj sloj je sedef ili sedefasti sloj koji čini oko 50% debljine ljušture. Termin sedef označava tip pločaste mikrostrukture koja se sastoji od mnogokutnih do oblih pločica organiziranih u paralelne pločaste slojeve (Marin i sur. 2012). Pločice su sastavljene od aragonita i optički djeluju poput jednog kristala iako su napravljene od većeg broja elemenata. Oko pločica nalazi se organski sloj koji se naziva interkristalinični matriks te on omogućuje gusto pakiranje istih u veće strukture. Izvor interesa za ovaj sloj proizlazi iz unikatne kombinacije optičkih svojstava što je poželjno u izradi nakita. Isto tako mehanička svojstva sedefa čine ga pogodnim modelom za razvoj sintetskih materijala pa čak i izvorom bioaktivnih organskih molekula.

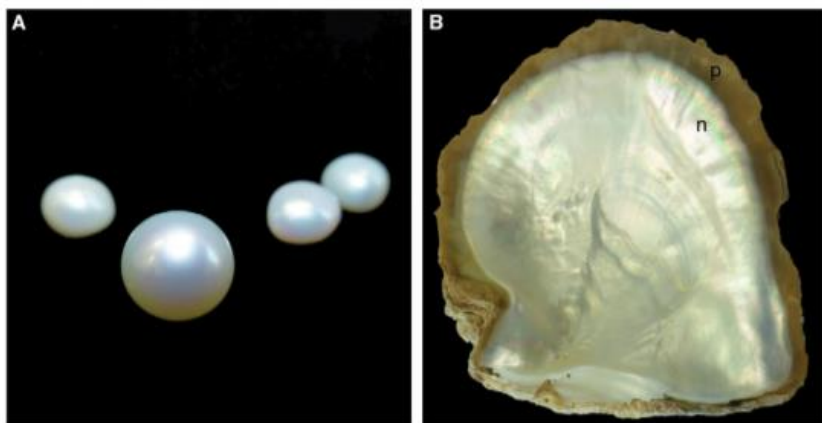


Slika 8. Prikaz strukture slatkovodnog školjkaša *Unio pictorum*. Preuzeto i prilagođeno iz: Marin i sur. (2012).

4.5 BISERI

Biseri su čvrste, sjajne tvorbe koje nastaju u području plašta školjkaša. Uobičajena je zabluda da je nastanak bisera potaknut zrnem pijeska koje ostane zatvoreno unutar organizma. Iako mnogi biseri u središtu sadrže strano tijelo kao što je primjerice parazit, ključan uvjet za nastanak bisera je transport epitelnih stanica plašta na drugo mjesto unutar organizma (McDougall i sur. 2013). To se najčešće događa zbog oštećenja kao što je perforacija ljuštura uzrokovana parazitom. Nakon transporta stanica plašta, one proliferiraju i stvaraju bisernu vrećicu unutar koje potom nastaje biser. Biseri se, kao i ljuštura školjkaša, sastoje od kalcijevog karbonata u obliku aragonita ili od aragonita i kalcita. Sitni kristalici odloženi u koncentričnim slojevima uzrokuju lom svjetlosti koji je odgovoran za poseban sjaj bisera.

Biseri nastali spontano u prirodi nazivaju se prirodnim biserima. Takvi su iznimno rijetki i vrlo vrijedni. Najveći dosad zabilježeni prirodni biser težak je oko 6,5 kilograma. Kultivirani biseri su umjetno proizvedeni i čine većinu bisera dostupnih u prodaji. U tu svrhu uglavnom se koriste slatkovodni školjkaši porodice Unionidae i morski školjkaši porodice Pteriidae. Postoje dva načina umjetne proizvodnje bisera. Jedan je da se ljuštura školjkaša usitnjava i unosi u prostor između plašta i ljuštura školjkaša. Nakon godinu dana izlučivanja sedefa, biser se zajedno s komadićem plašta presađuje u drugog školjkaša te tamo raste još nekoliko godina. Drugi, kraći proces proizvodnje bisera, je umetanje većih, ispoliranih komadića ljuštura u komadić plaštanog tkiva jednog školjkaša i presađivanje u drugog školjkaša (Habdija i sur. 2011). Biseri su najčešće bijele ili crne boje, ali mogu biti i drugih boja, primjerice rozi, plavi ili zeleni (**Slika 9.**). U industriji nakita, vrijednost bisera određuje se prema boji, veličini, sjaju i simetriji bisera.



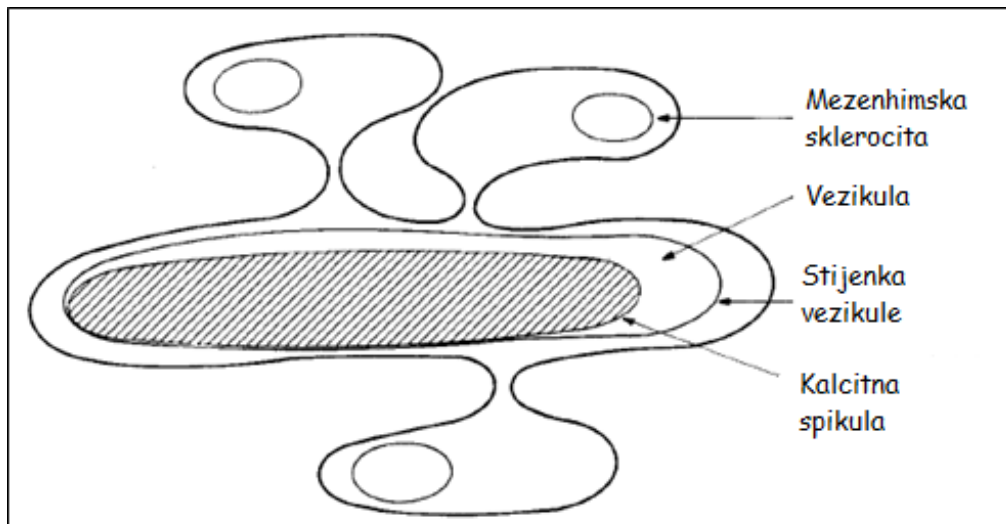
Slika 9. Biseri i ljuštura školjkaša *Pinctada maxima* (p – prizmatički sloj, n – sedefasti sloj). Preuzeto i prilagođeno iz: McDougall i sur. (2013).

5. BODLJIKAŠI

S biomineralizacijske točke gledišta bodljikaši su jedno od zanimljivijih koljena. Isključivo su morski organizmi i poznato je oko 6000 recentnih vrsta. Koljeno sadržava 5 razreda, a to su: zvjezdače, zmijače, ježinci, trpovi i stapčari. Zajednička karakteristika im je pentaradijalna simetrija. Svaka skupina tvori mineralizirane dijelove. Kod ježinaca ti elementi sraštaju u čahuru, dok su kod zvjezdača, zmijača i stapčara skeletni elementi zvani osikule međusobno uzglobljeni. Kod razreda trpova, skelet je reduciran na osikule ili mineralizirane granule. Osim tvrdih dijelova skeleta, mineralizacijom nastaju strukture poput bodlja i zuba. Najčešći mineral kod bodljikaša je kalцит s različitim udjelom magnezija, dok su trpovi specifični po stvaranju nekalcitnih minerala (Lowenstam i Weiner 1989). Karakteristična struktura skeletnih elemenata je stereom. Stereom je porozna mrežasta struktura koja sadrži labirintne šupljine ili prostor stereoma koji sadržava različita vlakna i stanice. Što se tiče istraživanja biomineralizacije u bodljikaša, najbolje su istraženi ježinci i to ličinke. Stvaranje skeleta u ličinki je učestao predmet istraživanja jer je njihova razvojna biologija vrlo dobro proučena i ličinke mogu rasti u kulturi. Osim ličinki, odrasli ježinci također pružaju zanimljive mogućnosti istraživanja. Naime zubići ježinaca u Aristotelovoj lanterni su relativno veliki i kontinuirano rastu, što znači da su u bilo kojem trenutku svi stadiji mineralizacije prisutni u jednom zubiću.

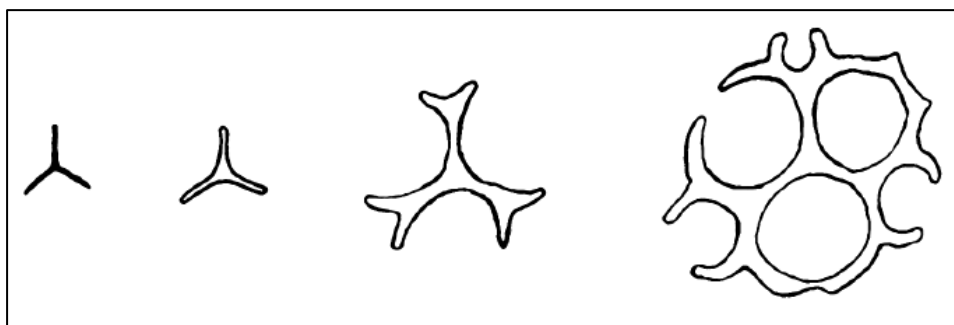
5.1. MINERALIZACIJA U LIČINKE JEŽINCA

Ličinka ježinca naziva se *ehinopluteus* i njen stadij može potrajati nekoliko mjeseci. Podrijetlo stanica koje će vršiti proces mineralizacije može se pratiti skroz do mikromera koje nastaju diobom nakon stadija od 8 stanica. Mikromere su smještene na jednom kraju blastocela i izvor su primarnih mezenhimskih stanica. Nakon niza diobi te stanice migriraju u blastocel i zauzimaju definirane položaje (Lowenstam i Weiner 1989). Ameboidne stanice koje će stvarati spikule počinju stvarati pseudopodije i povezuju se s ostalim stanicama istog tipa tvoreći sincicij. Važno je napomenuti kako tijela stanica ne fuzioniraju, odnosno samo pseudopodiji sudjeluju u stvaranju sincicija (Gliznutsa i Dautov 2011). Potom slijedi nastanak intrasincicijalne vakuole (**Slika 10.**).



Slika 10. Prikaz sincicija i intrasincicijalne vakuole unutar koje se odvija kalcifikacija. Preuzeto i prilagođeno iz: Lowenstam i Weiner (1989).

Nakon što se formira vakuola, počinje izlučivanje organskog matriksa koji ima ulogu u stvaranju skeletnih elemenata, ali ta uloga nije u potpunosti razjašnjena. Nakon nastanka organskog matriksa, počinje odlaganje kalcita i nastanak spikule. Prije samog nastanka spikule, stanice sadrže veliku količinu nestabilnog amornog kalcijeva karbonata, koji se stabilizira pomoću proteina i magnezija. Ovdje ulogu imaju proteini organskog matriksa koji reguliraju kristalizaciju amornog kalcijeva karbonata. Triradijatna spikula postepeno raste intracelularno (Lowenstam i Weiner 1989) i rast je određen oblikom sincicija. Uglavnom se povećava dodavanjem materijala na vrh, ali malim dijelom raste i obujmom. Proteini koji su zatvoreni unutar kalcita spikule mijenjaju njezina svojstva i čine je čvršćom i fleksibilnijom, iako točna uloga nije potpuno razjašnjena. Povezivanje triradijatih spikula krajevima stvara spomenutu strukturu stereoma (**Slika 11.**), koja se s vremenom ispunjava stanicama derme i vlaknima (stroma).



Slika 11. Prikaz nastanka stereoma. Preuzeto i prilagođeno iz: Kokorin i sur. (2014).

5.2. MINERALIZACIJA U ODRASLOG JEŽINCA

Tijelo odraslog ježinca podupire čvrsti skelet u obliku čahure. Čahura se sastoji od 10 dvoredova pravilnih pločica – osikula i s obzirom da je čitav skelet, barem tokom razvoja, prekriven tankim epitelom (Lowenstam i Weiner 1989), govorimo o endoskeletu. Sastoji se od magnezijevog kalcita sa svojstvima vrlo sličnim onima kao kod ličinačkog stadija. Nastanak skeleta je intracelularni proces pod kontrolom mezodermalnog tkiva kao i kod ličinke. U odraslih oblika prostor stereoma ispunjen je raznolikim stanicama. Epitelne stanice čine vanjski pokrov iako on može izostajati kod bodlji. Karakterističan tip stanica su sklerocite od kojih su neke direktno uključene u mineralizaciju. Nadalje, fagocite su najrašireniji tip stanica u stereomu (Lowenstam i Weiner 1989) i smatra se da imaju ulogu u procesima resorpcije kalcita.

Žvačni aparat ježinaca poznat i pod nazivom Aristotelova svjetiljka je kompleksni sustav koji se sastoji od pet produženih zubića. Distalni krajevi zubića se konstantno troše i to se kompenzira trajnim rastom na drugom kraju (Hyman 1955). Ultrastruktura samog zubića je vrlo kompleksna i za razliku od ostalih skeletnih elemenata ne sadrži specifičnu mrežastu strukturu. Ipak, osnovni procesi mineralizacije su jednaki kod stvaranja zubića kao i kod ostalih skeletnih elemenata.

6. LITERATURA

- Ali, Yousuf S. (1983) "Calcification of cartilage" u "Cartilage, Structure, Function and Biochemistry" (ed. B. K. Hall), *Academic Press*, New York, 343-378.
- Berman, Amir, Lia Addadi, i Stephen Weiner. (1988) "Interactions of sea-urchin skeleton macromolecules with growing calcite crystals—a study of intracrystalline proteins." *Nature* 331, 546-548.
- Dove, Patricia M., James J. De Yoreo, i Stephen Weiner. (2003) eds. "Biomineralization." Vol. 54. Walter de Gruyter GmbH & Co KG
- Frankel, Richard B., i Dennis A. Bazylinski. (2003) "Biologically induced mineralization by bacteria." *Reviews in mineralogy and geochemistry* 54(1): 95-114.
- Gliznutsa, Lyubov A., i Salim S. Dautov. (2011) "Cell differentiation during the larval development of the ophiuroid *Amphipholis kochii* Lütken, (Echinodermata: Ophiuroidea)." *Russian Journal of Marine Biology* 37(5): 384-400.
- Habdija, Ivan, Biserka Primc Habdija, Ines Radanović, Maria Špoljar, Renata Matoničkin Kepčija, Snježana Vujčić Karlo, Marko Miliša, Ana Ostojić, i Mirela Sertić Perić. (2011) "Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata: strukture i funkcije." Zagreb, *Alfa d.d.*
- Hyman, Libbie H. (1955) "The Invertebrates. IV. Echinodermata". *McGraw Hill*, New York
- Isaji, Shinji. (1993) "Formation of organic sheets in the inner shell layer of *Geloina* (Bivalvia: Corbiculidae): an adaptive response to shell dissolution." *The Veliger* 36: 166-173.
- Kokorin, Alexandar I., Georgy V. Mirantsev, i Sergey V. Rozhnov. (2014) "General features of echinoderm skeleton formation." *Paleontological Journal* 48(14): 1532-1539.
- Le Gros Clark, W. E. (1945) "The Tissues of the Body. " *Oxford University Press*, Oxford
- Lowenstam, Heinz A. (1981) "Minerals formed by organisms." *Science* 211(4487): 1126-1131.
- Lowenstam, Heinz A., i Stephen Weiner. (1989) "On biomineralization." *Oxford University Press on Demand*

- Mann, Stephen. (1983) "Mineralization in biological systems." u *Inorganic elements in biochemistry* Springer, Berlin, Heidelberg, 125-174.
- Marin, Frederic, Nathalie Le Roy, i Benjamin Marie. "The formation and mineralization of mollusk shell." *Frontiers in Bioscience* 4.1099 (2012): 125.
- McDougall, Carmel, Felipe Aguilera, Patrick Moase, John S. Lucas, i Bernard M. Degnan. (2013) "Pearls." *Current Biology* 23(16): R671-R673.
- Nancollas, George H. (1983) "The mechanism of precipitation of biological minerals. The phosphates, oxalates and carbonates of calcium." *Croatica Chemica Acta* 56(4): 741-752.
- Simkiss, K. (1986) "The processes of biomineralization in lower plants and animals-an overview." *Biomineralization in lower plants and animals* 30: 19-37.
- Waite, J. Herbert, Abu S. M. Saleuddin, i Svend O. Andersen. (1979) "Periostracin—A soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L." *Journal of comparative physiology* 130(4): 301-307.

7. SAŽETAK

Biom mineralizacija je široko rasprostranjen i raznolik proces što dokazuju 64 dosad poznata minerala koje stvaraju organizmi iz svih klastera eukariota. Stoga je područje od interesa i brojna istraživanja su usmjerena otkrivanju detalja tog procesa. Bez obzira na sve danas poznate informacije i dalje nemamo pravu sliku o tome na koji način organizmi stvaraju minerale. Ipak znamo mnogo o tome kako kontroliraju nastanak minerala i to je ono što čini biološki kontroliranu mineralizaciju. Moramo imati na umu da dosad stvorene podjele služe kako bi nama olakšale razumijevanje procesa biom mineralizacije i da u stvarnosti podjele nisu toliko jasne. Biom mineralizacija se odvija na razinama koje snažno utječu na biosferu, kao što su kemijski sastav oceana ili sastav sedimentnih stijena. U ovom radu detaljnije su obrađeni školjkaši koji su vrlo istraženi zbog korištenja u komercijalne svrhe pa i zbog proizvodnje bisera. Osim školjkaša, bodljikaši su također poznati biom mineralizatori zbog specifičnih struktura koje formiraju i stoga su obrađeni u ovom radu.

8. SUMMARY

Biom mineralization is a widespread and diverse process that is demonstrated by 64 known minerals that are produced by organisms from all eukaryotic clusters. That is why it is an area of interest and numerous researches are aimed at revealing the details of this process. Despite all the information we know today, we still have no real picture of how organisms produce minerals. However, we know a lot about how they control mineral formation and that is what makes biologically controlled mineralization. We have to keep in mind that the divisions created so far are used to make it easier for us to understand the biom mineralization process and that in reality divisions are not so clear. Biom mineralization occurs on such level that it strongly affects biosphere, such as ocean chemistry or composition of sedimentary rocks. In this paper, bivalves are thoroughly discussed because they are used for commercial purposes and also for the production of pearls. Besides bivalves, echinoderms are also well known biom mineralists due to specific structures that they form and are therefore covered in this paper.