

UNIVERZITET U BEOGRADU

Mr Goran Janjić, dip. biolog

**ODREĐIVANJE BIOLOŠKE VREDNOSTI VODE
NA OSNOVU PARAMETARA DOBIJENIH
KLASIČNIM I NANOTEHNOLOŠKIM
METODAMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2012

Mentori:

Prof. dr Đuro Koruga, dipl. maš. inž., Biomedicinsko inženjerstvo, nanotehnologije, Mašinski fakultet Beograd.

Prof. dr Ljubiša Topisirović, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd.

Članovi Komisije:

Prof. dr Đuro Koruga, Biomedicinsko inženjerstvo, nanotehnologije, Mašinski fakultet Beograd.

dr Jovana Simić-Krstić, naučni savetnik, Mašinski fakultet Univerziteta u Beogradu, diplomirani molekularni biolog, (biofizika molekula i tkiva).

Prof. dr Dragutin Debeljković, Mašinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Teorije sistema i automatsko upravljanje (matematički modeli, stohastički procesi).

Doc. dr Danijela Dobrosavljević Vukojević, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu (dermatologija).

dr Jovana Simić-Krstić, dipl. molekularni biolog, biofizika molekula i tkiva, Mašinski fakultet Beograd.

„Molekularna struktura vode je suština života.”

Albert Szent Gyorgy(1961)

ZAHVALNOST

Postoje mnogi ljudi bez kojih ne bih mogao uraditi ovu disertaciju. Moja zahvalnost za sve što su učinili za mene je nemerljiva. Najdublje se zahvaljujem mojoj porodici, kao i mojoj majci i sestri koji su mi ne samo materijalna podrška, nego su mi izvor velike unutrašnje snage i njihovi pozitivni stavovi su mi pomogli da se suočim sa ovim velikim izazovom. U prvom redu reči zahvalnosti dugujem mom mentoru Prof. dr. Đuri Korugi, čija posvećenost, saveti, iskustva i prijateljski odnos su mi pomogli da ostvarim svoje istraživačke ciljeve. Privilegovan sam što sam bio pod njegovom mentorstvom. Ova disertacija je urađena zahvaljujući nesebičnoj pomoći profesora Dr. Dragutina Debeljkovića kome sam posebno zahvalan za svu pruženu pomoć u izradi ovog rada. Posebnu zahvalnost želim da izrazim Dr. Katici Jovanov Nešić koja me je vodila kroz eksperimente u Institutu Torlak i Dr. Lidiji Matija iz Nanolaba Mašinskog fakulteta u Beogradu na korisnim sugestijama. Moja ogromna zahvalnost partnerima u istraživanju iz nanolaba: Dušanu Kojiću, Jeleni Munćan koji su mi pomogli u rešavanju problema i davali mi podršku tokom ovog istraživanja, kao i doktorantima: Zoranu Mitroviću, Čedomiru Laloviću i Zoranu Vosiki sa kojima sam zajedno rešavao razne probleme u istraživanju. Zahvaljujem se prim. dr. Jadranu Bandiću i ORS Specijalnoj bolnici za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju na biopsiji kože ispitanika i pomoći u istraživanju. Moja zahvalnost Dr. Dejanu Opriću sa Medicinskog fakulteta Beograd za analizu tkiva, kao i veterinarskoj laboratoriji Spina za analiziranje uzoraka krvi.

Posebno se zahvaljujem ispitanicima, dobrovoljcima iz Zrenjanina i Beograda koji su učestvovali u ispitivanjima i svojim učešćem mi omogućili istraživanje za potrebe izrade disertacije.

SKRAĆENICE

OMF – Optomagnetni fingerptint

LDW – Low Density Water - Voda Niske Gustine

HDW – Higher Densiti Water – Voda Veće Gustine

NIR – Near Infrared – Bliska Infracrvenoj

WAMACS – Koordinate Matrice Vode

IR – Infracrveno

C – Apsorpciona traka

Da – Linija soja aguti

MSH – Melanocitni stimulirajući hormon

D – Deuterijum – izotop vodonika

MA – Maculae adherens

SC – Stratum corneum

LT – Lamelarna tela

ECM – Ekstra celularan matriks

TEWL – Perspiratio insensibilis – neprimetno isparavanje tečnosti iz kože

R – Crvena

B – Plava

W – Bela

P – Polarizovana

AFM – Mikroskop atomskih sila

HDW – Zona vode velike gustine

LDW – Zona vode male gustine

AQP – Akvaporin-vodeni kanal

NMR – Prirodni faktor ovlažavanja

BPK – Biohemijska potrošnja kiseonika

HPK – Hemijska potrošnja kiseonika

BVV – Biološka vrednost vode

MB – Mikrobiološka ispravnost

HS – Hemijska ispravnost

AST – Asparagin transaminaza

ALT – Alanin transaminaza

LDH – Holesterol manje gustine

IU/lit – Internacionalnih jedinica po litri

AFM – Mikroskopija atomskih sila

MFM – Mikroskopija magnetskih sila

DNK – Dezoksiribo nukleinska kiselina

RNK – Ribo nukleinska kiselina

A – Baza adenin

C – Baza citozin

G – Baza guanin

T – Baza timin

ATP – Adenozin trifosfat

GTP – Guanin trifosfat

ADH – Anti diuretikički hormon

NMF – Prirodni faktori ovlažavanja

K – Gen za keratin

KIF – Keratinski filament

DHEA – Dehidroepiandrosteron

UVB – Ultraljubičasto zračenje

OZNAKE

nm – nanometar

mm – milimetar

p – pritisak

h – relativna vlažnost

t – temperatura

ps – pikosekunda

sec – sekunda

ns-nano sekunda

Ph – Kiselost

mg/l – miligram po litru

mmol/l – milimol po litru

° dH – mera tvrdoće u Nemačkim stepenima

µg/l – mikrogram po litri

MΩ – Mega Om

Kj - Kilo džul

eV – elektron volt

MDK – Maksimalno dozvoljena koncentracija

JM – Jedinica mere

mS/cm² – mili Simensa po kvadratnom santimetru

°Pt-Co – mera za boju vode

NTU – Mere za mutnoću vode

°d – mera za tvrdoću vode

GB – Giga bajt

FNU – Jedinica kvantiteta mutnoće

V – Volt

I – Jačina struje

D – Debye-električni dipolni moment

fs – femto sekunda-10⁻¹⁵ s

pm – pikometar-10⁻¹²m

Pka – Konstanta disocijacije kiseline

Z – Impedanca

Ω – Om-otpor

Y – Admitanca – inverzna impedanca

S – Simens-električna provodljivost

Hz – herc- oscilacija u sekundi

ω – frekfencija

h – ($6,626 \times 10^{-34}$ Js)- Plankova konstanta

E – Energija

F – Sila

v – oscilacija

d – razdaljina

t – vreme

FM – Magnetna sila

FE – Električna sila

T – Tesla-magnetna indukcija

t – temperatura

ODREĐIVANJE BIOLOŠKE VREDNOSTI VODE U KOŽI NA OSNOVU PARAMETRA DOBIJENIH KLASIČNIM I NANOTEHNOLOŠKIM METODAMA

Rezime

U ovoj studiji je analizirana strukturu kože kao kompleksan sistem. Posebno je analiziran epidermis, što je zasnovano na pristupu slojevima i njihovim organizacijama vode u lipidima koji su uređeni u sub slojevima. Korišćenjem metode optomagnetskog fingerprinta (OMF) koji je veoma osetljiv na paramagnetska/dijamagnetska svojstva tkiva, nađeno je da uređene nano-voda strukture u lipidima epidermalnih slojeva igraju veoma važnu ulogu u svojstvima kože. Korišćena je bioimpedanca kao komplementarni i uporedivi metod sa (OMF) u karakterizaciji kože.

Dinamika vode, stvaranje i razgradnja klastera, praćena je dinamikom paramagnetizma/dijamagnetizma, ovaj fenomen se javlja u svim ćelijama i tkivima i to kao posledica dinamike vode i njene interakcije sa komponentama koje su u njoj rastvorene. Eksperimenti su izvođeni na pacovima sa različitim tipovima voda od kojih jedna nije bila za piće. Razni tipovi voda utiču na odnos vezane i slobodne vode u tkivima i ćelijama, pre svega povećavajući količinu vezane vode u zavisnosti od stepena njihove klasterizacije i mineralnog sastava. Klasičnim metodama su karakterisani biohemijski parametri krvi, kao i koža, pacova soja aguti. Od standardnih teorijskih metoda iz fiziologije elektrolita i bazno-kiselinskog metabolizma koristili su se postupci hemijske kinetike, hemijskog ravnotežnog stanja, oksido-redukcionih reakcija.

Različiti oblici samoorganizovane vode poseduju drugačiji uticaj na funkcionisanje bioloških struktura, menjajući njihova konformaciona stanja preko hidratacije, utiču na odnos vezane i slobodne vode u tkivima i ćelijama, pre svega povećavajući količinu vezane vode u zavisnosti od stepena njihove klasterizacije i mineralnog sastava

U istraživanjima je nađena značajna razlika u svojstvima kože u zavisnosti od toga koju su vodu pili ispitanici. Utvrđen je stepen uticaja različitih

tipova voda na dinamiku interakcije sa graničnom vodom. Definisani su parametri i njihova međuzavisnost koja određuje biološku vrednost vode za biološke tečnosti (krv) i viskozno-elastično tkivo (koža). Istraživanja ukazuju na moguću primenu u nanodijagnostici sa ciljem indentifikovanja bolesti u što ranijoj fazi.

Ključne reči: slojevi kože, voda, optomagnetni fingerprint, dinamika klastera bioimpedanca, dijamagnetizam, paramagnetizam, slobodna voda, vezana voda.

DETERMINING THE BIOLOGICAL VALUE OF WATER PARAMETERS IN THE SKIN OF THE PARAMETERS OBTAINED FROM THE CLASSICAL AND NANO METHODS

Abstract

In this dissertation analyzes the structure of the skin as a complex sistem. In particular, it analized the epidermis, which is based on the access layer of water and their organizations in lipids, which are arranged in sat layers. Using methods optomagneting fingerprint (OMF), which is very sensitive to the paramagnetic/dijamagnetic properties of tissue, it was found that nano-ordered water strukture in the epidermal lipid layers play an important role in the properties of the skin. Bioimpedance was used as a complementary method and a comparable with (OMF) in the characterization of the skin.

The dynamics of water cluster formation and decomposition, followed by the dynamics paramagnetism/diamagnetism, this phenomenon occurs in all cells and tissues and as a consequence of the dynamics of water and its interaction with components that are dissolved in it.

Experiments were performed on rats with different types of water, one of wich was not drinking. Various types of water affect the ratio of bound and free water in the tissues and cells, primarily by increasing the amount of bound water depending on the degree of clusterization and their mineral composition.

Classical methods are characterized by biochemical parameters of blood and skin, rat strain agut. From standard theoretical methods in physiology and elektrolyte acid base metabolism of the procedures used chemical kinetics, chemical equilibrium state, oxidation-reduction reactions.

A second series of experiments was conducted on people of different age and sex, Zrenjanin who consumed water througouth their lives, then one group of people have switched to other types of drinking water. The subjekts were recorded using the OMF skin removing layers of skin patch to the stratum germinativum, before and after the transition to other types of water, while another group continued to drink still water Zrenjanin. Along with OMF method was used bioimpedance method.

Various forms of self-organized water have a different impact on the functioning of biological struktures changing their conformational state by hidration, affect the ratio of bound and free water in the tissues and cells, primarily by increasing the amount of bound water depending on the level of clusterization and mineral composition.

The study found significant differences in the properties of the skin, depending of what subjects drank water. Determined by the degree of influence of different types of water on the dynamics of border interactions with water. Defines the parameters and their interdependance that determines the biological value of water in biological fluids (blood) and viscous-elastic tissue (skin). Research suggest the possible aplications in order to nanodiagnostic indentifying the disease as early as possible.

Key words: layers of skin, water, optomagnetic fingerprint, the dynamics of clusters, bioimpedanca, diamagnetizm, paramagnetizm, free water, bound water.

SADRŽAJ

1. UVOD	- 1 -
1.1. Teorije nastanka biovode.....	- 1 -
1.2. Značaj vode za biološki svet.....	- 5 -
1.3. Osnovi metabolizma vode u ljudskom organizmu	- 8 -
1.4. Značaj istraživanja metabolizma vode za funkcionisanje ljudskog organizma	- 14 -
2. PREDMET ISTRAŽIVANJA	- 16 -
2.1. Sastav biološke vode po tkivima i organima.....	- 21 -
2.2. Voda u ljudskom organizmu: ekstarcelularna, ćelijska, slobodna, vezana voda	- 24 -
2.3. Biološka vrednost vode sa aspekta kompatibilnosti vode u interakciji sa biomolekulima i ulozi vode u starenju.....	- 28 -
2.4. Tokovi vode do kože, ulazak u dermis, ulazak u epidermis, formiranje nanosloveva vode kao lipid-voda kompleks, transepidermal water loss	- 31 -
2.5. Prolaz ekstracelularne vode u ćeliju: bubrezi, koža, ostala tkiva – aquaporini, ostali mehanizmi.....	- 41 -
3. UOČAVANJE PROBLEMA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	- 47 -
3.1. Uočavanje problema u razumevanju dosadašnje kompatibilnosti vode u interakciji sa biomolekulima	- 47 -
3.2. Uočavanje problema u razumevanju transporta vode u dermis-bazalna membrana-epidermis.....	- 49 -
3.3. Uočavanje problema nedovoljnog poznavanje stanja vode u epidermisu i kako različite vode utiču na stanje kože- Zrenjaninska i normalna voda.....	- 51 -
3.4. Uočavanje značaja definisanja, razumevanja i izučavanja vode sa aspekta njene biološke vrednosti.	- 53 -
3.5. Predlog pravca istraživanja i priroda vodonične veze	- 54 -
3.6. Očekivani rezultati u istraživanju	- 55 -
4. MATERIJAL	- 57 -
4.1. Demi voda (18.2 MΩ voda), česmovača i Zrenjaninska voda	- 57 -
4.2. Pacovi i njihovo potomstvo	- 63 -
4.3. Humana koža.....	- 72 -
5. SADRŽAJ, METODE I TEHNIKE ISTRAŽIVANJA	- 118 -
5.1. Sadržaj istraživanja	- 118 -
5.2. Uzgoj pacova i njihova biohemijska analiza posle žrtvovanja	- 144 -
5.3. Biopendanca kao klasična metoda karakterizacije kože in vivo.....	- 149 -
5.4. Nanotehnološke metode: Opto-magnetni fingerprint (OMF) i Spektroskopija atomskih sila (AFM)	- 163 -
5.4.1. AFM - Spektroskopija atomskih sila.....	- 170 -
5.5. Aquaphotomics metoda.....	- 175 -
6. TEORIJSKA ISTRAŽIVANJA	- 186 -
6.1. Voda: Slobodna, vezana, međućelijska i ćelijska (aquaporini).....	- 205 -
6.2. Prelaz vode iz derma u epiderm (bazalna membrana)	- 217 -
6.3. Zadržavanje vode u epidermu, TEWL i dr.	- 227 -
7. EKSPERIMENTALNA ISTRAŽIVANJA	- 241 -

7.1. Eksperimentalne životinje: pacovi	- 241 -
7.2. Dobrovoljni ispitanici: ljudi	- 242 -
8. REZULTATI I DISKUSIJA.....	- 244 -
8.1. Rezultati teorijskih istraživanja.....	- 244 -
8.2. Rezultati eksperimentalnih istraživanja	- 248 -
8.2.1. Eksperimentalne životinje.....	- 248 -
8.2.2. Ispitanici dobrovoljci	- 250 -
8.2.2.1. Optomagnetna spektroskopija	- 250 -
8.2.2.2. OMF vode	- 250 -
8.2.2.3. In vivo impedansna spektroskopija	- 250 -
8.2.2.4. AFM.....	- 250 -
8.3. Diskusija.....	- 280 -
8.3.1. Diskusija rezultata iz eksperimenta sa pacovima sa rezultatima iz literature ...	- 280 -
8.3.2. Diskusija dobijenih rezultata sa ljudima sa rezultatima iz literature	- 283 -
9. ZAKLJUČAK.....	- 293 -
9.1. Uočen je mnogo veći značaj vode u odvijanju bioloških procesa nego što se do sada smatralo. Zbog toga je potrebno pored genomike i proteomike uvesti u nauku pojam aquomiku.....	- 293 -
9.2. Došlo se do novih saznanja o transpornim putevima vode u koži, pri čemu je uloga bazalne membrane objašnjena	- 294 -
9.2.1. Ostalo	- 295 -
9.3. Definirana je biološka vrednost vode kao rezultat multi faktorske systemske analize uloge vode u funkcionisanju organizma.....	- 295 -
9.4. Data je nova systemska analiza uloge vode kod starenja i došlo se do novih saznanja o ulozi vode kod starenja.....	- 296 -
9.4.1. Ostalo	- 297 -
9.5. Primena opto-magnetnog fingerprinta kod karakterizacije slojeva kože i vode u slojevima	- 298 -
9.6. Primena AFM u karakterizaciji skinutih slojeva kože	- 299 -
9.7. Identifikacija različitog ponašanja slojeva kože sa aspekta paramagnetizma dijamagnetizma u prisustva različitog tipa vode u datom sloju.....	- 299 -
9.8. Ispitivanja uticaja voda različitog sastava na potomstvo (pacova)	- 300 -
9.8.1. Ostalo	- 300 -
10. LITERATURA	- 304 -
11. PRILOZI	- 317 -
11.1. Podaci o vodi.....	- 317 -
11.2. Podaci o pacovima	- 322 -
11.3. Podaci o ljudskoj koži.....	- 326 -
11.3.1. Komponente epidermisa	- 326 -
11.3.2. Diferencijacija i ravnoteža epidermalnih ćelija	- 326 -
11.4. Metode.....	- 331 -
11.4.1. Optomagnetni fingerprint	- 331 -
11.4.2. AFM	- 331 -
11.4.3. Bioimpedanca	- 331 -
BIOGRAFIJA.....	- 360 -

1. UVOD

1.1. Teorije nastanka biovode

Tečna voda se sastoji od ključale mase lanaca raznih veličina, sličnih grupa i podrhtava u i izvan vremena trajanja od pikosekunde. Nema sumnje da postoji ATP pokretana katjonska pumpa i ona je odgovorna za asimetričnu distribuciju katjona kroz biološku membranu. Ova činjenica ne isključuje postojanje mogućnosti da je intracelularna voda drukčija od normalne vode. Jaki argumenti protiv postojanja vode sa neobičnim svojstvima unutar ćelije dolaze od fizičkih hemičara koji tvrde da biološka voda ne može biti drugačija od normalne vode, tako da svaka promena u svojstvima i strukturi koji su predloženi za intracelularnu vodu smatraju da se menjaju i u vodi izvan ćelije. Ovo je nepobitan argument, ali zahteva da se razume naročito ograničenje za strukturu vode unutar ćelije sa normalnim metabolizmom. Jedan od očiglednih razloga za razliku između ćelije i bilo kog ne biološkog vodenog sistema je samo postojanje ATP katjonskih pumpi i drugog, transportnih sistema, koji stvaraju osmotski ekvilibrijum u ćeliji različit od osmotskog pritiska u bilo kom realnom sistemu i nastaje zbog toga što se većina materija održava u neravnotežnom stanju a voda se mora dovesti u ravnotežno stanje.

Otkriće krajem 1960-tih super ili polivode je pomoglo da se baci svetlo na neke aspekte strukture vode. Ova supstanca je bila džinovski polimer molekula vode 40 puta gušći i 15 puta viskozniji od obične vode. Studije su pokazale da su ova neočekivana svojstva vode posledica kontaminacije. Čak i takve interakcije molekula vode sa drugim supstancama mogu biti korisne u shvatanju načina na koji molekuli vode interreaguju jedna sa drugom.

Centralna ideja koju je izneo ruski naučnik (Trošin 1966) u svojoj monografiji, *Problems of Cell Permeability*, je da voda u protoplazmatičnom gelu je različita od vode u jednostavnom vodenom rastvoru. Osnovna pretpostavka je bila da je podela rastvarača između ćelije i ekstracelularnog

rastvora određena ne samo propustljivošću membrane nego i samom protoplazmom koja preferencijalno akumulira neke rastvorke a izuzima druge.

Kad je (Ling 1962) objavio svoju monografiju, *A Physical Theory of the Living State*, koja je slična sa Trošinovom idejom, pretpostavlja da je većina vode u ćeliji polarizovana u multi slojevima na površini proteina i ekstremno je slab rastvarač za jone kalijuma koji se akumuliraju u ćeliji sa normalnim metabolizmom, jer pod ovim uslovima karboksilna grupa proteina preferencijalno asocira sa K^+ jonom u odnosu na Na^+ jon. Ova teorija asocijacije-indukcije ukazuje da je raspored rastvoraka određen kombinacijom selektivne asocijacije sa proteinom i modifikovanim svojstvima intraćelijske vode.

Kolektivno ponašanje molekula vode je termodinamički ne izbežni mehanizam za stvaranje zone sa izmenjenim svojstvima vode. Na naelektrisanjoj površini se molekuli vode kreću zajedno stvarajući zonu oko 6 nm debljine, koja je sa slabim vodoničnim vezama, tečnost reaktivna je i selektivno akumulira male katjone, multivalentne anjone i male hidrofobne rastvorke. Na hidrofobnoj površini se molekuli razmiču i lokalna voda postaje jače vezana, inertna, viskozna i akumulira veće katjone, monovalentne anjone i kompatibilne rastvorke. Proteini i mnogi drugi biopolimeri poseduju nejednake površine koje stoga potstiču obadva opisana mehanizma, nejednake površinske strukture vode, koje su proširene na osetnoj razdaljini od površine. (Ling 1962. Wiggins 1990.)

Voda unutar ćelije bi mogla biti značajno drugačija od one u bulk vodi, na mestu interakcije između površine i rastvoraka sa jedne strane i molekula vode sa druge. Ova voda koja je relativno imobilisana na površini jona se zove vezana voda, dok je voda dovoljno daleko od površine za koju se ne očekuje da bude pod njenim uticajem bulk voda. Ovaj pristup nije u mogućnosti da objasni mnoga naizgled anomalna svojstva rastvora, hemiju malih jona i molekula u rastvoru makromolekula, u gelu i unutar ćelije. Čitav niz istraživača su utvrdili činjenice da su svojstva vode u ćeliji različita od onih u bulk vodi. Na primer; (Horowitz i

saradnici 1981) kao (Frank and Horowitz 1975) i (Howard and Wondergem 1987) su pokazali da su svojstva vode kao rastvarača u citoplazmi žabljeg jajeta drugačiji od onih koju poseduje voda u jedru i onih koju poseduje normalna voda. Ovaj i slični nalazi se ne mogu objasniti nazivima slobodnih i vezanih molekula vode, zato što zahtevaju zone vode u istom rastvoru unutar ćelije ili mitohondrije, imaju različita svojstva rastvorljivosti, različite gustine i različite mobilnosti. Ove zone se protežu na znatnoj udaljenosti od površine, promene u njenim svojstvima ne mogu biti eksperimentalno potvrđene. Za razliku od ovih efekata na daljinu, interakcija između molekula vode i jonskih grupa su kratkog dometa, tako da, ako su mali joni u rastvoru, nekoliko molekula vode su relativno imobilizovani fiksiranim naelektrisanim grupama čineći omotač 1 nm debljine i vodu normalne strukture koja se nastavlja nakon pojedinačnog sloja haotičnih molekula vode. Zapremine vode koje su pod takvim uticajem su suviše male da bi se merili efekti na particionisanje čak i malih rastvoraka.

Na direktnim interakcijama voda površina, zaista interakcije kratkog dometa su verovatne i suptilne za indirektno efekte površine na strukturu vode. (Pashley i saradnici 1981, 1984 i Parsegian i saradnici 1976) su izmerili odbojne sile dugog dometa koji sprečavaju dve naelektrisane površine da se spoje. Oni predlažu da su ove hidracione sile rezultat dehidracije suprotnog jona kako naelektrisana površina istiskuje vodu napolje.

Pogodna molekularna osnova može biti uzrokovana molekulima vode u obliku "niti" ova "zmija" je način prolaska kroz otvoren prostor velikog molekula. Voda ima visoko organizovanu lokalnu strukturu koja interaguje sa molekulima koji su sposobni da stvaraju ovakve strukture vode.

Wils Robinson i njegova grupa su predložili teoriju da je voda organizovana u dva stanja. (Robinson 1996). Na običnoj temperaturi tečna voda se sastoji od brzo izmenjujućih LDW klastera gde je međumolekularna O-O distanca drugog suseda 0.45 nm i kompaktna je, HDW klastera gde je odgovarajuća O-O distanca 0.35 nm. U pothlađenoj vodi, LDW klasteri su dominantni, i stoga se njena zapremina skuplja zagrevanjem do 4°C, kad su

pratično svi klasteri HDW i voda poseduje maksimalnu gustinu. Ova teorija ostavlja otvorena neka pitanja kao pritisak, viskoznost anomalija.

(Chaplin 2004.) je predložio da fluktuirajuća mreža molekula u tečnoj vodi je organizovana lokalno u ikosaedrima koji se sastoji od 280 potpuno vodoničnim vezama povezanih molekula vode. Ikosaedarna struktura objašnjava mnoge anomalije vode računajući i pritisak viskoznost ponašanje i gustinu zavisnu od temperature. Ovaj model dopušta određenu verovatnoću nalaženja kako pentamera tako i heksamera molekula vode.

(Norio Ise i saradnici 1999.) su otkrili da bulk voda može postojati kao mešavina domena koji se razlikuju u njihovim interakcijama sa česticama koje su suspendovane ili rastvorene. Uređeni domeni teže da rastu na račun neuređenih domena, što rezultira u obrazovanju koloidnih kristala, koji su odvojeni domenima praznine. Za objašnjenje ovog modela Ise uključuje daleko dometno privlačenje između čestica koje imaju isto naelektrisanje.

Naučnici su decenijama sumnjali da bi vezana voda na prostranim površinama proteina i membrana unutar ćelije mogla provoditi protone. Ako su molekuli vode poravnati njihovim pozitivnim i negativnim nabojima naizmenično u lancu, kao što je slučaj u susednoj vodi, molekuli koji su povezani zajedno vodoničnim vezama, onda skaču provodeći pozitivno naelektrisanje je teorijski moguć. Model vode koja provodi protone ili "protonska žica" je potvrđen eksperimentalnim posmatranjem. Migracija protona na velikim razdaljinama duž membrane se odvija velikom brzinom, difuzija protona sa tendencijom da protoni ostaju na površini membrane ili suprotno odlaze u bulk ćelijskog kompartmenta. U nano cevčicama vodonične veze između molekula vode su zaštićene od fluktucija u okruženju i mnogo su stabilnije, samo 0.02% molekula su nesporeni za razliku od bulk vode gde je prisutno 15% nesporeni molekula. Vodonične veze su visoko uređene, prosečno vreme trajanja vodonične veze unutar nano cevčice je 5-6 ps u poređenju sa bulk vodom gde je 1 ps. Ovi kanali provode protone 40 puta brže nego što ih provodi bulk voda. (Ling 1962.)

Značaj vode za biološki svet

Sa biološke tačke gledišta, voda ima mnogo posebnih svojstava od suštinskog značaja za život, ovaj skup je nezavistan od drugih supstanci. Ona je nosilac uloge, dopušta organskim jedinjenjima da reaguju na način da stvaraju svoje replike. Svi poznati oblici života zavise od vode. Voda je vitalna kao rastvarač koji mnogo ćelijskih rastvoraka rastvara i kao bitni deo metaboličkih procesa unutar ćelije.

Mnoga anomalna svojstva su od fundamentalnog značaja za nastanak i funkcionisanje živih bića. Naročito su važni: velika specifična toplota, velika toplotna provodljivost koji uz visok sadržaj vode u organizmima doprinosi toplotnoj regulaciji i sprečavanju lokalne toplotne fluktuacije, stoga je omogućena lakša kontrola telesne temperature. Velika latentna toplota isparavanja daje otpornost prema dehidraciji i doprinosi značajnom hlađenju isparavanjem. Voda je izvanredan rastvarač, usled svoje polarnosti, visoke dielektrične konstante i male veličine, naročito za polarna i jonska jedinjenja. Ona poseduje jedinstvena hidrataciona svojstva prema makromolekulima (proteini i nukleinske kiseline), voda određuje njihove trodimenzionalne strukture i iz toga funkcije u rastvoru. Ova hidratacija formira gelove koji mogu reverzibilno da podnose gel-sol faze prelaza koji podležu mnogim celularnim mehanizmima. Voda jonizuje i omogućuje laku izmenu protona između molekula, i tako doprinosi bogatstvu jonskih interakcija u živom svetu. Od temperature 4°C voda se širi zagrevanjem ili hlađenjem. Ovaj maksimum gustine zajedno sa malom gustinom leda uzrokuje nužnost da celokupna sveža voda (nije baš na površini) je bliska 4°C i obrazuje se pre zamrzavanja (zamrzavanje reka, jezera i okeana je odozgo nadole) tako je omogućen opstanak živih bića u vodi, led izoluje od daljeg zamrzavanja, vraćajući nazad sunčevu energiju u svemir i omogućujući brzo topljenje a gustinom uzrokovana termalna strujanja vode uzrokuju sezonska mešanja koja omogućuju da umerenije vode nose kiseonik u dublje vode.

Veliki toplotni kapacitet mora i okeana im omogućuje da služe kao rezervoar toplote tako da temperatura može da varira samo za trećinu u odnosu na kopnenu temperaturu i tako čini našu klimu umerenijom.

Stišljivost vode smanjuje nivo mora za oko 40 m dajući nam 5% više kopna. Veliki površinski pritisak kao i širenje zamrzavanjem podstiče eroziju i omogućuje formiranje zemljišta.

Usred značajnih anomalija voda poseduje suprotne osobine u zavisnosti od temperature, anomalna ponašanja dolaze do izražaja sniženjem temperature gde se osobine pothlađene vode često razilaze od onih u heksagonalnom ledu. Ako se hladna voda zagreva ona se skuplja i postaje teža za kompresiju, njen refraktivni indeks raste, brzina zvuka unutar nje raste, gasovi se manje rastvaraju i ona je lakša za zagrevanje i bolje provodi toplotu. Za razliku, kad se topla voda zagreva širi se i postaje lakša za kompresiju, njen refrakcioni indeks se smanjuje, brzina zvuka unutar nje se smanjuje, gasovi postaju rastvorljiviji i teže se zagreva i lošije provodi toplotu. Sa povećanjem pritiska, molekuli hladne vode se brže kreću ali molekuli toplije vode se kreću sporije. Topla voda se smrzava brže od hladne vode u ledu kada se kompresuje osim na visokom pritisku kad se tečna voda smrzava komprimovanjem. Ne postoji nijedna druga materija koja istovremeno postoji u čvrstom, tečnom i gasovitom stanju.

Metabolizam je ukupan iznos anabolizma i katabolizma. U anabolizmu, voda se uklanja iz dela molekula (enzimske hemijske reakcije za koje je potrebna energija) da bi nastali veliki molekuli (skrob, trigliceridi i proteini za skladištenje energije) i informacija. U katabolizmu, se voda koristi za raskidanje veza po redosledu za stvaranje manjih molekula (glukoza, masne kiseline i amino kiseline da bi bile korištene za izvor energije kao i za druge svrhe). Voda je stoga esencijalna i centralna za ove metaboličke procese. Dakle, bez vode, ovi metabolički procesi bi prestali da postoje. Biološka aktivnost proteina je presudno zavisna ne samo od njihovog sastava nego i od načina na koji su ovi ogromni molekuli savijeni, ovo nabiranje, umotavanje uzrokuju interakcije sa vodoničnim vezama vode, i takođe između različitih delova istog molekula. Bilo

šta što narušava ove intramolekularne vodonične veze će denaturisati protein i narušiti njegovu biološku aktivnost. Vodonične veze se ne formiraju samo između molekula vode nego i između molekula vode i amino ili karboksilnih grupa proteina i molekula vode. Struktura molekula na kojima je život baziran osim proteina, nukleinske kiseline, lipidi i kompleksni ugljenihidrati je direktno rezultat interakcije sa njihovim vodenim okruženjem. Kombinacija svojstava rastvarača je odgovorna za intermolekularne i intramolekularne asocijacije ovih supstanci što je jedinstvenost molekula vode. Voda je takođe ključna za fotosintezu i ćelijsko disanje. Fotosintetske ćelije koriste sunčevu energiju za razdvajanje vodonika od kiseonika u vodi. Vodonik se kombinuje sa CO₂ (apsorbovanog iz vazduha ili vode) da formira glukozu i oslobodi kiseonik. Sve žive ćelije koriste izvor energije i oksiduju vodonik i ugljenik da oslobode sunčevu energiju i reformišu vodu i CO₂ u procesu ćelijskog disanja.

Voda je od fundamentalnog značaja za acido-baznu ravnotežu i funkciju enzima. Kiselina, vodonikov jon (H⁺ proton) donor može biti neutralizovan bazom, akceptor protona kao što je hidroksidni jon (OH⁻) iz vode. Voda se smatra za neutralnu, sa pH (negativni logaritam koncentracije vodonikovih jona). (Pashley 1981.)

Dugo vremena se zna da je intracelularna voda veoma bliska bilo kojoj membrani ili organeli, vicinalna voda je organizovana vema različito od bulk (glavne mase) vode, ova strukturna voda igra značajnu ulogu u određivanju oblika (samim tim i biološku aktivnost) velikog broja globularnih biopolimera. Ponekad je struktura vode u ovom regionu nametnuta jedino geometrijom okružujućih vodoničnih veza. Voda je sposobna za kretanje kroz ćelijsku membranu i neophodna je za transport hranljivih materija, uklanjanje otpadnih materija i omogućuje komunikaciju između ćelija, nije samo medijum nego i metabolički reaktant, produkt, katalizator, pratnja, mesendžer i kontroler. Voda je sastavni deo organizma, nije samo prost rastvarač nego i aktivno učestvuje u metaboličkim procesima za molekularne interakcije, poseduje transportnu ulogu, medijum je za particionisanje, prenosi hranljive materije, metabolite, hormone po telu i unutar ćelija, uklanja štetne produkte, održava oblik ćelije,

podmazuje strukture tela, zaštitni je omotač, sastavni je deo sokova za varenje, učestvuje u regulaciji telesne temperature, čini mukozu i važna je za pokretanje organa. (Harvey Lodish 2004, Voeth 2004.)

1.2. Osnovi metabolizma vode u ljudskom organizmu

Voda je kovalentno jedinjenje i polarni rastvarač. Molekuli vode poseduje tetraedralnu građu i privlače se vodoničnim vezama. U vodi se rastvaraju molekuli koji disociraju i hidrofilni molekuli koji ne disociraju. Proces interakcije molekula vode sa polarnim molekulima i jonima je hidratacija. Brzina hidratacije je suštinski važna za biohemijske procese koji se odvijaju u ćelijama, posledica je dehidratacije koja je nužna da bi molekuli proteina menjali svoju konformaciju. Ova brzina je zavisna od strukturne organizacije molekula vode u rastvoru.

Voda se u organizam unosi pićem i hranom a voda nastaje u procesu metabolizma oksidacijom jona vodonika u mitohondrijama, kojom se smanjuje energetska stanje elektrona atoma vodonika i oslobođena energija koristi za životne procese. Resorpcija se odvija uglavnom u tankom i debelom crevu. U organizmu se voda nalazi u dva oblika kao ćelijska (intracelularna) i vanćelijska (ekstracelularna) a prisutna je i transcelularna voda sekreta te sistema za varenje i disanje. Vanćelijska voda se nalazi u krvnim sudovima, limfi i tkivima. Depoi vode se nalaze u skeletnim mišićima, potkožnom tkivu i jetri a izlučuje se preko bubrega, preko kože, fecesom i plućno. Bilans vode je u neravnotežnom stanju (uglavnom dehidratacija ređe hiperhidratacija) i može biti u kratkom periodu vremena u stanju ravnoteže. U organizmu se količina vode reguliše izlučivanjem preko bubrega, nervnom i hormonalnom regulacijom. Nervni put čine intracelularni i ekstracelularni osmoreceptori, baroreceptori u karotidnom sinusu aortinog luka, receptori istezanja u renalnoj aferentnoj arterioli kao i vaskularni receptori istezanja i prednji hipotalamus. Najvažniji su hormoni: antidiuretični hormon kog proizvodi hipotalamus a deluje na distalne tubule bubrega zadržavajući vodu i hormon nadbubrežne žlezde aldosteron koji

zadržava jone Na i Cl u distalnim tubulama bubrega, a pošto NaCl na sebe navlači vodu ovaj hormon posredno zadržava vodu u organizmu.

Ukupna količina tečnosti koja se apsorbuje jednaka je zbiru unete tečnosti i tečnosti izlučene u različitim probavnim sokovima, što je ukupno oko 9 l. Od toga se oko 8-8,5 l apsorbuje u tankom crevu a samo preostalih 0,5 do 1 l prolazi svaki dan kroz debelo crevo. Kombinacijom kružnih nabora, crevnih resica i sićušnih mikroresica se povećava apsorpcijsko područje sluzokože oko 600 puta gradeći ogromnu ukupnu površinu od oko 250 m² u čitavom tankom crevu. Voda se prenosi kroz crevnu sluzokožu isključivo procesom difuzije. Paralelno sa hranljivim materijama i jonima, apsorbuje se i izoosmotski ekvivalent vode. (Guyton 2010.) Osmoza vode iz epitelnih ćelija u međućelijske prostore nastaje zbog osmotskog gradijenta, koji se ostvario zbog smanjivanja koncentracije jona unutar ćelije a povećao u međućelijskom prostoru. Osmotsko kretanje vode uzrokuje da tečnost odlazi u međućelijski prostor, zatim kroz bazalnu membranu crevnog epitela, te u krvne sudove crevnih resica. Transportni epitel pruža dva puta za protok vode i rastvoraka: 1) paracelularni put, kojeg čini kompleks spojnice i lateralnog međućelijskog prostora; 2) transcelularan put, kojeg čini apikalna i bazolateralna ćelijska membrana sa akvaporinima. Ovi putevi nisu potpuno nezavisni od lateralnog međućelijskog prostora i mogu da obezbede kompartment tako da putevi transporta mogu da komuniciraju. Transcelularni transport vode omogućuju akvaporini koji obezbeđuju suštinski dvostrano pokretanje tečnosti. Osam različitih akvaporina je indentifikovano u gastrointestinalnom traktu. (Laforenza, Gastaldi, Polimeni, Tritto, Tosco, Ventura, Scaffino, Yasui 2009.)

Bubrezi upravljaju kretanjem celokupne tečnosti u organizmu, pa se tako u 24 h filtrira ukupno oko 180 litara tečnosti. Devedeset devet posto tečnosti vraća se natrag u krvotok, dok se oko 1,5 litre vode i rastvorenih otpadnih materija u mokraći izbacuju u toku svakog dana. Nefron je osnovna jedinica za filtriranje. U svakom bubregu ima preko milion nefrona. Cevasti sistem koji se nalazi u svakom pojedinačnom nefronu, u proseku je dugačak oko 3 cm i širok samo 0,05 mm. Bowmanova čaura je zapravo uvučen kraj savijenog tubulusa

nefrona koji je obavijen mrežom vrlo malih krvnih sudova, zvanih kapilari. Kroz endotelni sloj kapilara, bazalnu membranu i epitelne ćelije, što oblažu spoljnu površinu glomerularnih kapilara filtrira se tečnost i rastvorene materije, osim proteina i bitnih ćelija krvi.

Kapilarne endotelne ćelije, što oblažu glomerul su perforirane hiljadama malih rupica (fenestre). Drugi sloj je propustljiva bazalna membrana. Treći sloj ove membrane ne čini kontinuirani sloj, već se sastoji od ćelija sa nastavcima u obliku prstiju. Voda ulazi u ćeliju kroz apikalnu membranu, zbog male hiperosmolarnosti citoplazme i napušta je kroz bazolateralnu membranu pokretanu malom razlikom osmotskog pritiska. Bazalna membrana i okolno vezivno tkivo sa nepokretnim slojevima ćelija i konstituentima kroz koje rastvorci i voda difunduju, raspršuju uvećanu koncentraciju rastvorka lateralnog intracelularnog prostora i bazalnih među preklopa, zatim ulaze u subepitelne kapilare. (Spring 1998.)

Tečnost koja teče kroz tubulus, nakon izlaska iz Bowmanove čaure je vodena mešavina, koja se sastoji od rastvorenih korisnih molekula zajedno sa otpatcima i neželjenim supstancama. Specijalizovane ćelije duž unutrašnjeg zida tubulusa prepoznaju korisne molekule kao što su: voda, soli, šećeri, minerali, vitamini, hormoni i amino-kiseline. Oni se efikasno izvlače u zid tubulusa i vraćaju nazad u kapilare, da bi ponovo ušle u krvotok. Proticanjem tečnosti kroz sabirnu cev tubulusa, voda se osmozom izvlači iz lumena u visoko koncentrisanu sredinu. Osmoza se uvek odvija kada voda protiče kroz membranu u sredinu sa većom koncentracijom čestica. Osnovni mehanizam za transport vode kroz zid tubularne cevčice je difuzija. Svaka epitelna ćelija poseduje četkastu površinu na luminalnoj strani. Ta četkasta površina se sastoji od hiljada veoma malih mikroresica usled čega se luminalna površina ćelije povećava oko 20 puta. Osnova ćelije leži na bazalnoj membrani, a izbrazdana je sistemom brojnih bazalnih kanalića koji povećavaju bazalnu površinu ćelije takođe mnogo puta. Epitelne ćelije povezane su jedna sa drugom samo u području blizu četkaste površine gde se dodiruju i ta spojnica se zove zona okludens. (Murata Mitsuoka Hirai Walz Agre Heymann Engel Fujiyoshi 2000.)

Voda difundira kroz tubularnu membranu u svim delovima tubularnog sistema ali u nekim delovima difundira mnogo brže nego u drugim. Delovi tubularnog sistema koji su veoma permeabilni za vodu, kao proksimalni kanalići, brza osmoza vode se događa uvek kad se osmotska koncentracija rastvorenih materija s jedne strane zida postane različita od koncentracije sa druge strane. Kad se natrijum transportuje iz tubula u intercelularne prostore i u bazalne kanaliće, povećava se osmotski pritisak u peritubularnoj tečnosti, a smanjuje se osmotski pritisak u tubulama. Membrana proksimalnog tubula je veoma propustljiva za vodu, te voda procesom osmoze gotovo u istom trenutku kreće u intercelularne prostore i u bazalne kanaliće, te ponovo uspostavlja ravnotežu u osmotskoj koncentraciji s jedne i druge strane zida tubularnog kanalića. Kad god se natrijum transportuje kroz membrane pojedinih ćelija tubularnog epitela, transportuje se voda osmozom.

Čisti lipidni bislojevi su suštinski nepropustljivi za vodu, ali mnoge ćelijske membrane sadrže proteine vodenih kanala koji ubrzavaju kretanje vode, i nekih malih nepolarnih molekula u i iz ćelija. Takvo kretanje vode se odvija u ćelijama epitelnog sloja tubularnih kanala bubrega i creva i tako omogućuju koncentrovanje urina i unošenje vode u krvni i limfni sistem organizma. Isto bi moglo biti u osnovi funkcionisanja epidermisa kože. Transport vode kroz akvaporinske kanale, male hidrofobne molekula proteina, moguć je zahvaljujući tetramernoj arhitekturi ovih kanala koji obezbeđuju prolaz selektivno samo za molekule vode pošto elektrostatički potencijal unutrašnjosti ovih kanala omogućava selektivno zadržavanje svih molekula koji nose naelektrisanje kao što su joni i protoni. Ispitivanje mehanizma transporta vode u različitim tkivima ukazuje na postojanje uskih pora u akvaporinima koje sprečavaju prolaz velikih molekula, jona, čak i protona (H_3O^+) i hidroksilnih grupa (OH^-) uz istovremeno održavanje visokog nivoa permeabilnosti za molekule vode: $\sim 10^9$ molekula H_2O u sekundi po kanalu (Harvey Lodish 2004, Stojiljković, Stoiljković, Bojanić, Stojiljković i Radenković 2007.)

Nekoliko molekula vode simultano prolaze kroz kanal od kojih svaki sekvencijalno formira specifične vodonične veze i zamenjuju ih drugi molekuli

vode niz gradijent. Formiranje vodoničnih veza između atoma kiseonika i amino grupa bočnih lanaca obezbeđuje prolaz samo molekula vode kroz kanal, čak i protoni ne mogu da prođu. (Harvey Lodish 2004).

Ekstracelularni matriks je mreža proteina i ugljenih hidrata koji drže ćelije zajedno, okružuju i potpora su ćelijama, regulišu ćelijsku aktivnost i rešetka je za kretanje ćelija. Prolaz vode i u njoj rastvorenih supstanci se odvija difuzijom. Sadržaj ekstracelularnog matriksa čini samo 5 klasa molekula: nerastvornih (ne mogu biti hidratizani) kolageni, elastična vlakna i rastvorljivi, lako se hidratišu proteoglikani, hijaluron i adhezivni glikoproteidi. Osnovne supstance koje su hidratizane su slične gelu i suprotstavljaju se silama kompresije. Fibrili obezbeđuju istezanje. Voda hidratacije sprečava brzu razmenu hranljivih materija i otpadnih materija. Glukozaminoglikani su negativno naelektrisani, izduženi nalik na štapiće, sastavljeni od disaharida koji se ponavljaju, obično vezuju velike količine vode. Visoka koncentracija Na⁺ privlači ekstraćelijsku tečnost hidrirajući ekstraćelijski matriks. Glukozaminoglikani i proteoglikani zadržavaju vodu u koži, slično mukusu proteina.

Bazalna membrana je tanka ploča fibrila koja je u osnovi epitela koji oblaže šupljine unutar tela kao i kože ili endotelijum koji leži ispod površine krvnog suda. Komponente bazalne membrane sintetišu preostale ćelije ekstracelularnog matriksa. Bazalna lamina je važna ne samo za organizaciju ćelija u tkivo nego i za regeneraciju tkiva i kao vodič za migraciju ćelija za vreme formiranja tkiva kao i za metabolizam i za komunikaciju ćelija. Mreža komponenti ekstracelularnog matriksa je obično ne deblja od 60-120 nm debljine. (Harvey Lodish 2004.)

Koža ima ulogu rezervoara vode i učestvuje u regulaciji tečnosti čitavog tela. Tkiva kože sadrže oko 10% ukupne tečnosti, približno, dve trećine tečnosti se nalazi izvan ćelija, druga trećina tečnosti koja se može izmenjivati nalazi se uglavnom u dermisu. (Eisenbeiss Welzel Eichler Klotz 2001.) Sadržaj vode u koži varira, a u epidermisu, stratum germinativum je približno 80% kao i u ostalim ćelijama. Na površini kože u stratu corneumu gde se nalaze mrtve ćelije,

ovaj sloj je mnogo suvlji i gde sadržaj vode varira od 10% do 30%. U celoj koži je distribucija vode nešto drugačija. Kod čoveka relativni sadržaj vode u koži iznosi od 24.3% do 67.3%. (Suh Woo Kim 2004.)

Krv dospeva u kožu putem malih mišićnih arterija iz hipodermisa. Ove arterije u dubljim delovima retikularnog sloja u blizini hipodermisa formiraju duboki vaskularni pleksus, rete cutaneum. Iz ovog pleksusa deo arteriola se spušta prema hipodermisu, dok drugi deo arteriola sprovodi krv ka površnim slojevima epidermisa. Najveći deo arteriola iz ovog pleksusa stvara drugi pleksus, na granici između papilarnog i retikularnog sloja, poznat pod imenom papilarni pleksus ili rete subpapillaris. Kapilari nastali iz anastemoza ovog pleksusa formiraju kapilarne petlje u dermalnim papilama i prolaze uz samu bazalnu membranu. Kapilari se nastavljaju venama do venskog pleksusa postavljenog direktno ispod arterijskog papilarnog pleksusa. Krv dalje otiče do dubokog venskog pleksusa. U dubljim delovima dermisa sreću se arteriovenske anastemoze. Putem autonomnog nervnog sistema, menja se tonus vaskularnog korita, te se na taj način smanjuje ili povećava gubitak toplote. (Suh Woo Kim 2004.)

Limfni sudovi kože dobro su razvijeni u papilarnom sloju dermisa i stvaraju superficijalni pleksus. Kapilari iz ovog dela dreniraju limfu u veće sudove koji se nalaze u retikularnom sloju dermisa (duboki pleksus), koji je dalje odvede do regionalnih limfnih čvorova. (Suh Woo Kim 2004.) Sekretacija vode je paracelularna kroz tight junctions, pokretana osmotskim gradientom i gradijentom koncentracije u slučaju kože.

Hidratacija stratum corneuma je glavna determinanta izgleda i fizičkih svojstava kože i zavisi od brojnih faktora uključujući spoljašnju vlažnost i strukturu, lipidno proteinski sastav, svojstva barijere i koncentracije osmolita koji zadržavaju vodu. AQPO 3 se nalazi isključivo u bazalnom sloju keratinocita i transport vode preko njega nije ograničen stopom transepidermalnog gubitka vode. Ovaj akvaporin je odgovoran i za snabdevanje SC glicerolom. U slučaju nedostatka funkcije AQPO 3 nije otkrivena promena u stopi zamene ćelija,

profilu lipida, sadržaju proteina i koncentraciji amino kiselina jona i drugih malih rastvoraka. Smanjen sadržaj glicerola dovodi do abnormalnog fenotipa kože kod ljudi sa poremećajem rada AQPO 3 kao i usporeno zarastanje rana. Razvoj skvamoznog tumora kože je povezan sa AQPO 3 u bazalnim ćelijama ljudske kože. U drugim delovima tela defektan AQPO 3 izaziva rane u kornei, u crevu kolitis. Uglavnom je odgovoran za hidrataciju kože i proliferaciju ćelija kože. (Beitz Agre 2009.)

1.3. Značaj istraživanja metabolizma vode za funkcionisanje ljudskog organizma

Ljudi se izlažu raznim elektromagnetnim poljima, piju vodu koja je kontaminirana raznim supstancama koje utiču na njenu strukturisanost, izlagani su stresu. Postoji potreba da se razumeju svi procesi u kojima je uključena voda, kao matrica života, da bi se na molekularnom nivou razumeli nastanci i razvoj patoloških procesa i omogućila njihova rana detekcija. Potrebno je izučiti da li razni tipovi organizacije voda utiču na nastanak i razvoj neinfektivnih bolesti i u kolikoj meri, dali može da se kontroliše njihov razvoj i da se leče.

Ljudi se uglavnom nalaze u permanentnom stanju dehidracije koja smanjuje sve njihove životne sposobnosti, postavlja se pitanje koliko i kako mehanizmi nervne regulacije, pre svega centar u prednjem hipotalamusu koji reguliše žeđ, prepoznaju i reaguju na razne tipove struktura vode.

Voda u ćelije ulazi veoma polako pasivnom difuzijom kroz ćelijsku membranu i veoma brzo kroz akvaporine, specijalne vodene ili akvaglicerinske kanale, kako ćelija ostaje dehidrirana i pored obilja vode u telu jer se propustljivost akvaporina smanjuje kao i njihova ekspresija i različita je kod raznih tipova vode. Potrebno je proučiti ne samo prolazak vode raznih struktura kroz akvaporine i vodene kanale tesnih spojnica nego i mehanizme difuzije kroz: ćelijske membrane, intercelularni kompartment kao i njegov deo bazalnu

membranu. Postavlja se pitanje kako različiti tipovi struktura voda utiču na funkcije akvaporina, njihovo formiranje i starenje.

Struktura metaboličke vode koja nastaje oksidacijom vodonika u organizmu je slabo izučena i kako ona interreaguje sa ostalim strukturama tela pa i samom vodom organizma. Poznato je da se sa godinama smanjuje količina strukturisane vode koja lako prolazi kroz vodene kanale i brzo hidratiše strukture ćelije a povećava količina vezane vode u telu, koji mehanizmi u telu i kako omogućuju stvaranje strukturisane vode. Odnos voda raznih struktura u telu bi mogao biti parametar za detekciju patoloških stanja organizma.

Proces prolaska, voda raznih tipova, kroz nefrone bubrega ili slojeve kože, znojne žlezde je malo poznat a svakako utiče na efikasnost transporta štetnih materija iz organizma, proces termoregulacije kao i svojstva kože.

Količina vode kao i odnos intracelularne i ekstracelularne vode se menja tokom razvića, rasta, zrelosti i starenja. Postavlja se pitanje koji su mehanizmi strukturisanja vode kod embriona i kasnije kod odraslog organizma, zašto kasnije dolazi do promene odnosa voda u organizmu, zašto dolazi do progresivnog smanjenja strukturisanje vode tokom života. Dali je voda jedan od faktora narušavanja embrionalnog razvića ili kasnije mutacija i kancerogeneze. Kakva je uloga vode u procesu starenja i da li se može preko nje uticati na mehanizme starenja.

2. PREDMET ISTRAŽIVANJA

Dugo vremena se zna da je intracelularna voda veoma bliska po svojoj organizaciji bilo kojoj membrani ili organeli, (ponekad se zove vicinalna voda) i organizovana je veoma različito od bulk (glavne mase) vode, ova strukturna voda igra značajnu ulogu u određivanju oblika (samim tim i biološku aktivnost) velikog broja globularnih biopolimera. Molekuli vode se povezuju vodoničnim vezama ne samo sa susednim molekulima vode, nego i sa drugim molekulima koji poseduju -OH, -NH₂ ili COO⁻ grupe za koje se vezuju. Ovo uključuje jednostavne molekule kao što su alkoholi i površine kao makromolekuli, što je vezana voda u biološkim sistemima. Intracelularna voda unutar citoplazme se odlikuje kompleksnošću i specifičnom organizacijom. Uvećanje veličine ćelije je praćeno depolarizacijom ćelijske membrane i smanjenjem difuzije vode, što ukazuje na veoma različite karakteristike intracelularne vode koja se prinudno javlja u poređenju sa ekstracelularnom vodom. (Wiggins 2008.)

Blizina čvrste površine molekula ili jona, koji poseduju neuravnoteženo električno naelektrisanje, uzrokuje da molekuli vode mogu postati orjentisani i ponekad mogu da se vežu u relativno stabilnu strukturu. Postoje dve teorije o intracelularnoj vodi koje imaju vrlo veliki uticaj na sadašnje razmišljanje u pogledu kompleksa uloga intracelularne vode. To su "teorija polarizovanih multislojeva" Gilbert Ling i "gel sol prelaz" Gerald Pollack. (Ling 1962. Pollack 2006.)

Voda poseduje visoko organizovanu lokalnu strukturu kad interreaguje sa molekulima sposobnim da uspostave ove strukture u vodi. Usmereni dipolni momenti molekula vode uzrokuju delimičan jonski karakter (usled neravnomerne raspodele naelektrisanja unutar molekula) stvarajući afinitet između negativnog dela molekula i pozitivnog dela njegovog suseda. Ove vodonične veze nikako nisu ograničene samo na vodu, nego se razvijaju gde god je mali elektronegativan atom (kao kiseonik i azot) i vodonikov atom vezani kovalentno zajedno i koji su blizu jedan drugome. Na primer: -O-H····O=, =N-H····O=C-, -N⁺H····O.

Kako voda, na neki način, lokalno menja svoju gustinu tako da njene vodonične veze postaju pravije i jače ili iskrivljene i slabije, sva njena fizička i hemijska svojstva se moraju promeniti. Njena tačka ključanja će opadati kako veze postaju slabije, slobodna energija hidratacije Na^+ i K^+ i drugih katjona, reaktanata i proizvoda reakcija hidrolize mora sve promeniti. Povećanje jačine vodoničnih veza mora voditi do suprotnih promena u fizičkim i hemijskim svojstvima. (Berenden 2004.) Različite karakteristike unutarćelijskog i vanćelijskog okruženja posebno su jasne na planu ograničenja difuzije i visoke koncentracije haotropskih (neuređena putanja) jona i kosmotropskih (uređena putanja) drugih rastvoraka u ćeliji. Oba, haotropski neorganski joni i kosmotropski drugi rastvorci, pomažu maloj specifičnoj težini vode. Razlika u koncentraciji jona je naročito očigledna između Na^+ i K^+ ; Na^+ joni formiraju više raskidanih vodoničnih veza i povećavaju gustinu vode pošto K^+ jon daje prednost vodenom okruženju manje gustine. (Cameron Kanal Fullerton 2005.)

Sniženje stepena gustine unutar ćelije je određeno rastvorcima, njihovom koncentracijom i ustrojstvom kao i stanjem kretanja proteina, pokreti proteina stvaraju više nereda među klasterima u poređenju sa više statičkim proteinima. Mnogi intracelularni proteini su globularni, zato poseduje potpunu rotacionu entropiju uprkos gustoj okolini. Voda poseduje protivrečne efekte u mešovitoj okolini oko proteina. Slabe vodonične veze između proteina i molekula vode dozvoljavaju veću fleksibilnost. Jače vodonične veze obdaruju protein sa većom stabilnošću i rastvorljivošću. Postoji uređena struktura u prvom omotaču oko proteina, sa hidrofobnom nalik na klatrat i sa vodoničnom vezom molekula vode od kojih svaki pomaže drugom da optimizuje mrežu vodoničnih veza u vodi. (Halle Davidovic 2003.) Promene u obliku proteina mogu izazvati prodor vode unutar ćelije ili izlaz iz nje isto tako kao i promena gustine. Karboksilne grupe proteina su uglavnom okružene vodoničnim vezama vode dok je voda okružena osnovnim haotropskim grupama (arginin, histidin i lizin) teže ka strukturi klatrata. Obrazovanje klatrata preko hidrofobne površine maksimizira ne vezujuće interakcije bez gubitka vodoničnih veza budući da samo pogodne karboksilne grupe formiraju kolapsirajuće vodene strukture,

reaktivna tečna zona. Difuzno kretanje proteina uzrokuje promene u strukturi vode izvan prvog hidratacionog omotača. Translaciona difuzija obuhvata prekidanje veza voda-voda na daljini od površine jer rotaciona difuzija obuhvata blizak prekid voda-voda i protein-voda veze. Površinska zona za translaciju i rotaciju je ista ali diferencijal brzine je konstantna za sve radijalne razdaljine (r) za translaciju ali varira sa r^2 sa rotacijom. Na površini proteina se prekidaju vodonične veze, pola vodoničnih veza je skršeno, stoga se stvara zona povišene gustine vode. Rotacija proteina stoga stvara relativno blizku i okružujuću zonu vode velike gustine sa mnogo raskinutih vodoničnih veza. Zapremina ovih regiona dodirnih površina uznemirene vode oko proteina je uporediva sa zapreminom proteina. (Gojło Smiechowski Panuszko Stangret 2009.) Sa strane lanca proteina raspoređene su karboksilne grupe (tj. asparaginska i glutaminska kiselina) koje poseduju visoke dipolne momente, one sadrže dva kiseonikova atoma koji su blizu jedan drugome (~ 0.223 nm) a pojavljuje se između molekula vode u tečnoj bulk vodi (~ 0.282 nm). Ovi atomi kiseonika iz karboksilnih grupa obrazuju vodonične veze sa ~ 4 do ~ 6 molekula vode, za oko 40% slobodne energije hidratacije a razlika uglavnom potiče iz spoljašnjeg vodenog omotača. Obrazovanje vodoničnih veza uzrokuje lokalne klastere veće gustine usled čega se molekuli vode približavaju i nakupljaju oko karboksilnih grupa. Takve vodonične veze indukuju negativnija naelektrisanja kiseonikovih atoma karboksilnih grupa, povećavajući dipol grupe i to dovodi do porasta u karboksilnoj grupi pKa. (Kirschner Woods 2001.)

Efekti vode na polisaharide i polisaharide na vodu su složeni i postaju još složeniji u prisustvu drugih materija, kao što su soli. Voda se nadmeće za mesta vodoničnog vezivanja sa unutarmolekularnim i međumolekularnim vodoničnim vezama unutar polisaharida, sigurno će se ustanoviti ugljenohidratna elastičnost i može se odrediti ugljenohidratna preferencijalna konformacija. Postoji velika cena entropije (do oko 20.8 kJ mol⁻¹ na 25°C za potpuno zaleđen molekul) kad se voda veže i ovo bi moralo biti ispravljeno, na primer, stvaranjem jače ili ekstra vodonične veze. Na efekte hidratacije polisaharida

utiču: polarnost, slabo vodonično vezivanje ili jako vodonično vezivanje, hidrofobnost i prisustvo drugih ne jonskih i jonskih rastvoraka. (Zavitsas 2001.)

Ostaci D galakturonske kiseline koje se nalaze u polisaharidu, neke molekule vode čvrsto vezuju. Količina vezane vode jako zavisi od prisutnih katjona više nego od ostataka šećera. Natrijum galaktonurat vezuje četiri molekula, i K^+ , Ca^+ i Mg^+ soli vezuju 2, 12, odnosno 13 molekula vode (voda jon veza je veća od $13.0 \text{ kcal mol}^{-1}$). Kiseli kiseonikov atom karboksilne grupe teži da prihvati dve ili tri vodonične veze, zavisno od steričkih faktora, što je uslovljeno različitim molekulima vode zbog steričkih i antikoperativnih efekata. (Dillon Dougherty 2002.) Vodonična veza (preko donacije) slabi ako je jedna donorska vodonična veza vode vodoničnom vezom povezana sa jačom bazom od vode, karboksilati kako se očekuje će delovati na posebno slabu vodoničnu vezu u sledećem sloju omotača, tako da potstiče lokalni kolaps u mreži vodoničnih veza. U blizini polielektrolita osmolarnost je velika i aktivnost vode i hemijski potencijal su mali. Potencijal vode je delimično povećan zbog kolapsa mreže vodoničnih veza vode. Ako je površina vrlo naelektrisana, zona vode velike gustine (HDW) može da dopre do nekoliko nanometara i lokalna gustina prvog hidratacionog omotača može biti veća od 1.1 g cm^{-3} . Zona jakih vodoničnih veza, tečna i reaktivna, akumulira male katjone, multivalentne anjone i hidrofobne rastvorke. Da bi se održao potencijal vode konstantnim voda koja okružuje ovu zonu niskog potencijala HDW smanjuje svoj potencijal tako da odgovara proizvodnji zone manje gustine LDW, koja može biti dovoljno velika da smanji ukupnu gustinu sredine. Ove dve zone (HDW) i (LDW) verovatno neće biti oštro razlikovane ili savršeno formirane, ali hemijski potencijal vode će biti sasvim sličan. (Caffarena Grigera 2004.)

Rigidnost polisaharidnog lanca će zavisiti od toga dali su suprotni joni dovoljno blizu (što dovodi do mogućeg međumolekularnog privlačenja ali i smanjenja intermolekularnog odbijanja naelektrisanja) ili daleko (na primer u slučaju LDW). Pravila za formiranje jonskih parova su praćene sa karboksilnim grupama za koje se smatra da su slabo hidratizane, tako da jako hidratizani joni (na primer Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) će se absorbovati za površinu jona teže nego loše

hidratisani joni (na primer, Cs^+ , K^+ , Na^+). Neki polijonski polisaharidi mogu formirati zone spajanja putem dvovalentnih jona (Ca^{2+}) dokle god minimum od četrnaest ostataka može sarađivati. To može biti dobro da dve karboksilne grupe moraju da sarađuju u održavanju vezane vode daleko od jona kalcijuma da bi se formirao slani most, koji čini zonu spajanja. Nizak potencijal vode u asocijaciji sa parovima jona će uticati na obližnju vodu da se podstiče ujednačavanje potencijala vode. Ovo uzrokuje da okolna voda postane više proširena (manje gustine). (Makarov Andrews Smith Pettitt 2000.)

Hidratacija nukleinske kiseline je od suštinske važnosti za konformaciju i korist. Snaga ovih vodenih interakcija je daleko veća zbog većeg jonskog karaktera od onih kod proteina. Dvostruki heliks DNKa može da zauzme više konformacija sa različitom hidratacijom. (Pal Maiti Bagchi 2005.) Molekulu DNA je potrebno 30%, težine vode da održi svoju prirodnu konformaciju. Veća hidratacija se snažnije drži oko fosfatnih grupa koje se protežu duž unutrašnje ivice glavnih kanala. Zbog difuzne distribucije elektrona fosfatne grupe molekuli vode se stalno ne nalaze oko nje. Hidratacija je mnogo prisutnija i mnogo trajnija oko baza sa njihovim više usmerenijim vodoničnim vezama i ograničenom prostoru. Molekuli vode se drže relativno jako sa vremenom zadržavanja za prvi hidratacioni omotač oko 0,5-1 ns. Zbog pravilne strukture DNA hidratna voda se održava na kooperativni način uz dupli heliks u oba velika i mala kanala. Kooperativna priroda hidratacije pomaže rasplitanju i uplitanju dvostrukog heliksa. Kretanje vode u žlebovima je sporije u poređenju sa bulk vodom, sa najvećim ograničenjem u malim brazdama. (Gutmann 1991.)

Lipidi membrane sadrže hidrofilnu kosmotropnu grupu kao što je fosfatidiletanolamin koji potstiče obrazovanje u ćeliji strukture vode manje gustine. Ovo je naročito bitno pošto postoji membrana sa obimnom međusklopnom vodom unutar ćelije. Ćelije jetre sadrže $\sim 100000 \mu\text{m}^2$ specifične površine membrane. Voda manje gustine poseduje mnoge, kao u ledu, jake vodonične veze i inertna je zbog malog broja reaktivnih centara a viskoznost im je veća nego u bulk vodi. Napolarni molekuli u vodenom sistemu teže da se skupe (van der Waalsove sile privlačenja) istiskujući molekule vode. Ovaj

proces predstavlja mehanizam samogradnje lipidnog dvostrukog sloja i način je kako apolarni molekuli postižu stanje sa najmanjom slobodnom energijom. Voda u blizini hidrofobnih površina se kolektivno kreće da bi podesila lokalnu gustinu sa okolnom vodom. (Wiggins 1990). Hidrofobni efekt hidrofobnih rastvoraka u vodi je prvenstveno posledica promene u klasterisanju okolne vode, pre nego voda rastvorak interakcije. Hidrofobna interakcija dovodi do smanjenja gustine i povećanja toplotnog kapaciteta. (Rezus Bakker 2007.) Proširena mreža uzrokuje opadanje gustine pošto uređene veze moraju biti savijene sa povećanjem temperature, tako da utiču na toplotni kapacitet. Dakle hidrofobna hidratacija se ponaša na suprotan način od hidrofilne hidratacije, koja povećava gustinu i smanjuje toplotni kapacitet zbog povezanih neorganizovanih vodoničnih veza koje su već savijene ili prekinute. Voda na hidrofobnoj površini gubi vodoničnu vezu, zbog toga je povećana entalpija. Molekuli vode kompenzuju ovo menjajući pritisak i zapreminu tj. mreža vodoničnih veza se širi da bi formirala vodu niske gustine. Voda pokriva površinu sa klatratima izbegavajući gubitak više vodoničnih veza. Ovo zahteva proširene strukture niske gustine. Ovo formiranje klatratnih struktura maksimizira van der Waalsove interakcije između hidrofobnih rastvoraka i vode ali bez gubljenja vodoničnih veza. Ograničenje rotacije vodonične veze na hidrofobnoj površini može delimično biti odgovorno za povećanje njihove jačine. Takve klatratne strukture se lako raskidaju kinetičkim efektima. Hemijski potencijal vode se povećava zbog visećih vodoničnih veza. Voda smanjuje svoj potencijal šireći mrežu molekula vode. Visoka međupovršinska energija se kompenzuje formiranjem vode niske gustine. Elastičnost mreže vodoničnih veza okružuju ili klize izvan hidrofobnih molekula što zavisi od njihove veličine i koliko oni dobro mogu biti smešteni u okviru svoje mreže. (Sulyok 2006.)

2.1. Sastav biološke vode po tkivima i organima

Voda se u različitim tkivima organima razlikuje po količini kao i po sastavu biološke vode, što zavisi od njihove funkcije. Suštinski sistemi kao

mozak su privilegovani, drugi su sa umanjenim sadržajem vode, koža budući da je najmanje važan organ se najmanje snabdeva vodom i poseduje najmanju količinu vode. Voda se u različitim strukturama mladog organizma nalazi u različitim količinama i drugačijih strukturnih karakteristika kao što se vidi iz tabele 1. Prosečan sadržaj vode čoveka teškog 70 kg je 57%, dok je kod novorođenčadi viši od 75%. Sadržaj vode se smanjuje sa godinama a najveće smanjenje se dešava u prvih 10 godina. Mišićno tkivo čoveka srednjih godina sadrži 75% vode, krv sadrži 73%, masno tkivo sadrži 14% vode, kosti 22% vode, mozak 73%-78%-85%. Muškarci sadrže 60% vode a žene 55% zbog veće količine masnog tkiva. Intraćelijska tečnost čini 2/3 (63%) ukupne tečnosti tela i čini 70% citoplazme ćelije. 85% ćelijske vode poseduje bulk strukturu dok je preostala voda manje pokretna i vezana za makromolekule. Ekstracelularna tečnost čini 1/3 (37%) vode tela od čega na plazmu otpada ¼. Različiti organi u zavisnosti od njihove funkcije poseduju različite količine vode koje su promenljive što zavisi od fiziološkog stanja organizma.

Tabela 1. Sadržaj vode, njene lokacije i stanja kod prosečnog čoveka. (Papić-Obradović 2010.)

Tkivo	Ukupan%	Unutarćelijska	Vanćelijska	Slobodna	Zarobljena
Zubi	10.0%	6.2%	3.8%	2.0%	8.0%
Plazma	90.0%	56.6%	33.4%	60.0%	30.0%
Pluća	80.0%	49.5%	30.5%	25.0%	55.0%
Jetra	71.5%	44.2%	27.3%	31.0%	41.5%
Kosti	13.0%	8.0%	5.0%	3.5%	9.5%
Krv	90.7%	33.5%	57.2%	61.0%	29.7%
Mozak	80.5%	49.7%	30.8%	35.0%	45.5%
Mišići	75.0%	46.3%	28.7%	31.0%	44.0%
Hrskavica	55.0%	34.0%	16.0%	20.0%	35.0%
Limfa	94.0%	36.0%	58.0%	55.0%	39.0%
Žuč	86.0%	32.9%	53.1%	48.0%	38.0%
Slezina	75.5%	35.0%	40.5%	41.0%	34.5%
Eritrociti	68.7%	68.7%	/	28.0%	40.7%
Pljuvačka	95.7%	45.5%	50.0%	42.0%	53.5%
Bubrezi	82.7%	52.0%	30.7%	27.0%	55.7%

Mozak je 80-85% voda, tkiva pluća čine 75-80% vode, jetru kao glavni metabolički organ čini 70-75% vode, žive slojeve ćelija kože: hipodermis, dermis, i slojevi epidermisa stratum bazale, spinozum i granulozum sadrže 70-75% vode, dok mrtve orožnale slojeve stratum corneuma čini 10-15% vode u zavisnosti od relativne vlažnosti vazduha. Sadržaj vode od stratum granulozum do površinskog sloja keratinocita se eksponencijalno smanjuje čineći gradijent koncentracije vode. Krv, kao tečno tkivo čini 80% vode i značajna je za snabdevanje drugih tkiva vodom, za održavanje acidobazne ravnoteže u telu, za elektrolitski balans, snabdevanje kiseonikom i hranljivim materijama, uklanjanje štetnih produkata metabolizma i ostalo. Srce, deo cirkulatornog sistema gradi 75-80% voda, bubreg kao vrlo prokrvljen organ bitan za izlučivanje vode, elektrolita i štetnih produkata organizma gradi 80-85% vode dok nešto manje vode sadrže mišići 70-75% vode. Tkiva koja su sa potpornom ulogom i koja su izlagana mehaničkim silama sadrže manju količinu vode: zube gradi 8-10% vode dok kosti čini 20-25% vode. (Watson Bait 1980.) U normalnim ljudskim sočivima ukupan sadržaj vode se ne menja sa godinama ali se stanje vode menja. Sa 20g. čovek ima u centru sočiva približno vezan jedan molekul vode na svaki slobodan molekul vode dok je kod 70g-80g dva slobodna molekula vode na svaki vezan molekul vode. Ukupan sadržaj vode kod sočiva sa kataraktom je manji u odnosu na normalna sočiva dok odnos slobodne i vezane vode nije značajano različit. Prosečno 7% vezane vode je manje u sočivima sa kataraktom u odnosu na normalna sočiva. Odgovarajuća vrednost smanjenja za jezgro sočiva je 9%. Sadržaj vezane vode sa starenjem se smanjuje u očnoj sočivu od 45% na rođenju na 40% sa 20g, na 35% sa 40g, na 27% sa 60g, na 25% sa 80g. (Forbes Cooper Mitchell 2010.) Tabela 1. Sadržaj vode je bitno zavistan od pola i telesne težine tj. konstitucije tela. Većina patoloških promena je u granicama od 10% sadržaja vode u telu. Manje se vode nalazi u kanceroznom tkivu nego u zdravom tkivu. Tokom života se količina i biološki kvalitet vode menja. Vode je sve manje u organizmu delimično i zbog povećane količine masnog tkiva, delimično zbog razvića a količina vezane, slabo pokretne vode se povećava sa starenjem, što je posledica smanjene sposobnosti

strukturisanja unete vode kao i biološkog kvaliteta bulk vode. Ove procese ubrzavaju različita stanja i faktori koji uzrokuju stres.

2.2. Voda u ljudskom organizmu: ekstarcelularna, ćelijska, slobodna, vezana voda

Voda je jedna od šest ključnih struktura (DNA, proteini, lipidi, ugljeni hidrati i mineralne materije) za postojanje života. Ukupna voda u telu odraslog čoveka čini oko 60% telesne težine, dok prosečna vrednost unutar ćelijske vode je 40% i vanćelijske 20%. Sadržaj vode u ljudskom telu opada sa godinama i najveće smanjenje se odvija u prvih deset godina. Unutar ćelijske vode je 2/3 (63%) od ukupne količine tečnosti i čini 70% ćelijske citoplazme. 85% ćelijske vode čini voda bulk strukture, dok je ostala voda manje mobilna i povezana sa makromolekulima. Blisko povezana voda u ćeliji je 5% dok je slobodne vode 95%. Ekstraćelijska tečnost je 1/3 (37%) vode od čega je plazme 1/4. Vezana voda je fizički povezana sa različitim molekularnim strukturama i ne može slobodno i nezavisno da se kreće.

Tabela 2. Ukupna količina vode u telu ljudi u zavisnosti od pola od rođenja do dvadeset godina. (Givens 2010.)

Starost	na rođenju	1g.	3g.	5g	7-9g.	9-11g	11-13g	13-15g.	15-17g	17-20g
♂	80.6%	79%	77.5%	76.6%	76.8%	76.2%	75.4%	74.7%	74.2%	74%
♀	80.6%	78.8%	77.9%	77.6%	77.6%	77%	76.6%	75.5%	75%	74.8%

Kao što se vidi iz tabele 2. Sadržaj ukupne vode u telu dece je nešto veći kod devojčica iako su na rođenju posedovali istu količinu vode, do drastične promene dolazi nakon dvadesete godine života, jer je ukupna količina vode kod žena primetno manja od one kod muškaraca.

Tabela 3. Ukupna količina vode u telu prosečnog muškarca i žene tokom života (Givens 2010.)

Starost	20-24g.	25-34g.	35-44g.	45-54g.	55-64g.	65-74g.	75-84g.	>84
♂	64.1%	61.4%	59.7%	58.0%	56.0%	54.2%	52.8%	49.7%
♀	56.8%	56.2%	55.2%	53.4%	50.6%	48.0%	47.4%	46.9%

Ukupna količina vode u telu muškaraca je nešto veća od sadržaja kod žene, kao posledice veće količine masnog tkiva, tokom starenja, što se vidi u tabeli 3. Starenjem se količina vode umanjuje do 50% kod muškaraca a kod žena 42%-44% što se odvija sa smanjenjem fizioloških funkcija celog organizma. Razlika u smanjenju ukupne količine vode je sve veća tokom starenja, između muškaraca i žena.

Kod novorođenčeta je izmenljivo 50% vode a kod odraslog ljudskog bića 15%. Odnos vezene prema slobodnoj vodi se stabilno uvećava tokom godina što ukazuje na veću sposobnost struktuiranja mlađih tkiva, ova sposobnost se smanjuje sa godinama.

Tabela 4. Sadržaj intracelularne i celularne vode u telu posle rođenja kod prosečnog čoveka (Givens 2010.)

Starost	do 6 meseci	od 6m.-1g.	od 1g.-5g.	više od 5g. i odrasli
Ukupna voda	<70%	70%	65%-70%	65%-<60%
Intracelularna	>30%	35%	35%-40%	40%-45%
Ekstracelularna	40%	35%	30%	20-24%.
Međucelijska	34.5%	30%	30%	17%
Plazma	5.6%	5%	5%	5%

Opšti sadržaj vode u telu sa vremenom se smanjuje, što se vidi u tabelama 3 i 4. Taj proces počinje već tokom samog embrionalnog perioda a nastavlja se tokom života čoveka, tabela 4. Ovaj proces ukazuje na bolja svojstva biološke vode i efikasniju sposobnost biolomolekula da strukturišu vodu koja je uneta u organizam, i time omogućuje bolju i bržu hidrataciju biomolekula i brži promet vode u tkivima. Telo odraslog čoveka prosečno sadrži 40%-60% vode raspoređene u kompartmentima: intracelularna tečnost 65%, ekstracelularna 35% a ona se deli na međucelijsku 25%, cirkulacionu 8% i intersticijsku 2%.

Količina ekstracelularne vode se naglo smanjuje u prvih šest meseci života od 44% do 30% telesne težine. Postepeno se smanjuje tokom detinjstva do 20% u pubertetu. Tokom života se povećava količina intracelularne vode i sa njom vezane vode, za strukture ćelije, što ukazuje na njenu smanjenu izmenljivost i pogoršanu biološku vrednost, dok se u isto vreme smanjuje količina ekstracelularne tečnosti što je posledica starenja ekstracelularnih komponenti organizma i samih ćelija tabela 5. Ukupna količina ekstracelularne vode čoveka starosti 60g. je 30.1%-23.4% a intracelularne 24.9-33.4%.

Tabela 5. Količina raznih tipova bioloških voda u prvim godinama života. (Givens 2010.)

Starost	do 6meseci	do1god.	1g.-5god.	stariji od 5god.
intracelularna	30%	35%	33.5%-40%	40%-45%
ekstracelularna	40%	35%	30%	20%-24%
međucelijske	34.5%	30%	25%	17%
plazma	5,6%	5%	5%	5%.

Tkiva kože sadrže oko 10% ukupne tečnosti, približno, dve trećine tečnosti se nalazi izvan ćelija, druga trećina tečnosti koja se može izmenjivati nalazi se uglavnom u dermisu. Sadržaj vode u koži varira, a u epidermisu, stratum germinativum, je približno 80% kao i u ostalim ćelijama. Kožu čini prosečno 62-73% vode. Različiti slojevi kože znatno variraju u sadržaju: u rožnom tkivu epidermisa je oko 10-15%, papilarnom sloju 72%, mreži dermisa oko 61% što čini 15%-18% celokupne vode tela. Pronađeno je značajno smanjenje sadržaja vode u koži starih ljudi, što može biti povezano sa promenom u količini glukozaminoglikana, povećanom broju disulfidnih veza, glikolidizaciji kolagena i dr. U sadržaju ekstraćelijske tečnosti nema razlike ili se neznatno povećava sa starenjem. Količina intracelularne voda jasno opada sa starenjem. Citoplazmu živih ćelija kože čini 75%-90% vode. Kod novorođenčadi količina vezane vode u koži iznosi: slabo vezana voda 48%-64%, vezana voda čini 6-14%, dok slobodna voda iznosi 26%-45% od celokupne vode u koži. Voda u čitavoj koži se nalazi u mladosti uglavnom u vezanom stanju. Derm sadrži oko 80%-70% vode i ta količina retko se smanjuje tokom starenja što čini 15%-18% ukupne količine vode u celom telu. Sadržaj slobodne, pokretne vode u dermisu

je stabilan od 60 do 65% između 20 i 70 godine. Starenjem se smanjuje broj interakcija između vode i proteina a takođe i opada količina vode za 30% dok raste količina slobodne (tetraedralne bulk) vode i količina vode koja interreaguje sa makromolekulima opada. Papilarni sloj sadrži 71% vode a retikularni sloj 61% vode.

Na površini kože u stratum corneumu gde se nalaze mrtve ćelije, ovaj sloj je mnogo suvlji i sadržaj vode varira od 10% do 30%. Ćelije stratum corneuma na površini kože sadrže trećinu vode u odnosu na ostale ćelije tela što im omogućuje da su elastični i da služe kao barijera. U vodi je uglavnom uronjen dermis i hipodermis, dok epidermis sadrži manje od 10% vode. Stratum corneum je u prirodnim uslovima uvek delimično hidratisan. Umetnute između spoljašnjosti i donjih slojeva kože keratinocite pokazuju različite nivoe hidratacije u različitim slojevima. Sadržaj vode ljudskih keratinocita se menja od 15% u spoljnim slojevima do 40% u unutrašnjim. Slobodna voda ili površinska voda je ona koja se polako apsorbuje i deasorbuje i čini 50-65% slobodne vode. Vezana voda se brzo apsorbuje i deapsorbuje i deo je ukupne količine vode koja ne može da rastvori u vodi rastvorljive ne elektrolite. Čini 40-50 % preostale vode i vezana je za proteine i lipide keratinocita. Čvršće vezana voda čini približno 5-10 % ukupne vode. Slabije vezana voda čini 30-35% ukupne količine vode i vezana je za sloj čvršće vezane vode. Sadržaj vode od stratum bazale kroz živi deo epidermisa ostaje relativno konstantan i opada skoro linearno kroz stratum corneum. Sa dubinom stratum lucidum sadrži oko 70 %, sa keratinizacijom naglo opada, pa je oko 30%, na dubini 20 µm a na površini stratum corneum 25%. Sadržaj vode u stratum corneum je približno 40% od vode u tkivima. Stratum corneum normalno sadrži vode od 20 do 30%, onda količina vode opada od 5% do 10% blizu površine. Spoljni sloj stratum corneum sadrži 13 do 15% vode a kad se taj sadržaj umanja za 10% i više koža postaje suva i obrazuje ljuspice. Sam keratin sadrži 2% vode. Stratum lucidum prosečno sadrži 10%-47% vode, a keratina 50%-85%. Kada je potpuno hidratisan stratum corneum sadrži 75% vode, 20% proteina i 5% lipida. Primarno vezana voda 5 mg/100 mg je ista i u normalnoj i u patogenoj koži (psorijaza i xerosis

senilis), i 27.22 mg./100 mg. za psorijazu, 20-30% je veća kod zdrave kože. 0-30% vode u stratum corneum čini vezana voda. Hronično suva koža ili perutava koža su znaci uznapredovale dehidracije tela. U suvoj koži slobodna voda je nestala. (Berrelheim Ali White Chylack 1986.)

2.3. Biološka vrednost vode sa aspekta kompatibilnosti vode u interakciji sa biomolekulima i ulozi vode u starenju

Embrion starosti 6 nedelja je sastavljen od 97.5% vode a pred samo rođenje oko 83%. Procenat vode u trećem lunarnom mesecu je 95% a u desetom 85%. Normalna deca na rođenju imaju 78.2% ukupne vode od čega je ekstracelularne vode 44.9% a intracelularne vode 33.5%. Dijabetička novorođenčad sadrže ukupno vode 70,2%, ekstracelularne 38.5 a intracelularne 31.8%. Embrion i rani fetus imaju više od 90% vode, novorođenče 70%/80% a prosečan odrastao čovek 58%. Količina ekstracelularne vode opada od 75% do 40% a sadržaj intracelularne vode raste od 20% do 30% tokom embrionalnog razvića. Kod novorođenčadi od 75%-80% vode u telu ekstracelularna voda iznosi 45%-50% telesne težine a intracelularna 30%. Nakon 1.5 godina njihove se koncentracije izjednačuju da bi nakon 4 god. odnos ovih voda bio obrnut, intracelularne blizu 50% a ekstracelularne nešto manje od 25%. Sadržaj vode sa dve godine je 81.1%. devet ipo godina 79.2%, sa 25 g. 77%. (Kanerva Elsner Wahlberg 2000.) Sadržaj vode u korteksu na rođenju je 88% a u zrelosti 86% dok je u kalosumu na rođenju 88% a u zrelosti 70%. Koža fetusa sadrži oko 90%-97% vode. Ovaj trend smanjenja količine vode u telu se nastavlja celog života. Dinamika vode, obrazovanje i nestajanje klastera u embrionu, kasnije tokom života, praćena je dinamikom paramagnetizma/dijamagnetizma, kao posledica dinamike vode i njene interakcije sa komponentama koje su rastvorene u njoj. Biološka voda na granici proteina je suštinska za njihov ekvilibrijum struktura i enzimsku aktivnost i fenomene kao molekularno prepoznavanje i interakcije protein protein. Strukture vode u graničnom sloju je određena geometrijom okolnih vodoničnih veza, prostorno organizovanom molekularnom strukturom vode koja omogućava aktivaciju biomolekula i stoga

ćelije. Kad se voda menja od guste, kolapsirajućih klastera, stanja slabih vodoničnih veza u otvorenih klastera, lakšu, stanja jačih vodoničnih veza, smanjuje svoju energiju zato što se između molekula stvaraju jače vodonične veze, i ovo pomaže smanjenju hemijskog potencijala vode. Međutim u isto vreme se menja tečnost od više haotične strukture do više uređene strukture.

Starenje kože je spor ali progresivni degenerativan proces, neizbežan i predvidljivog ishoda. Klinički, ostarela koža je atrofična, suva, naborana sa naglašenim krvnim sudovima, kvalitetom transparentnosti i gubitkom elastičnosti i potkožnog masnog tkiva. Prisutna je izrazita atrofija derma sa destrukcijom kolagenskih i elastičnih vlakana uz poremećaj proliferacijske homeostaze brojnih ćelija i posledične pojave benignih i malignih lezija.

Promene u epidermu ostarele kože nisu naročito upadljive. Epidermis postaje vremenom tanji zbog smanjenja broja keratinocita. Međutim, rožnati sloj uglavnom ostaje neizmenjen u pogledu širine i kompaktnosti tako da su njegove osnovne funkcije u celini očuvane – TEWL (transepidermalni gubitak vode) manji je u ostareloj koži. Međutim, detaljnijom analizom rožnatog sloja, zapaža se gubitak i nepravilnost diskretnih površinskih brazda što je verovatno posledica poremećaja arhitekture dermalnih papila.

Prosečna površina i zapremina korneocita linearno se povećavaju sa godinama starosti. Povećanje površine korneocita znači istovremeno smanjenje međućelijskih prostora po jedinici zapremine rožnatog sloja što bi moglo da objasni smanjenje transepidermalnog gubitka vode kod starijih osoba. Deskvamacija korneocita takođe je smanjena uz povećanu krutost i smanjenu rastegljivost rožnatog sloja. Kada se ovim osobinama pridoda smanjeni sadržaj vode i promena njene strukture, lako je objasniti izmenjena mehanička svojstva ostarele kože. Apsorpcija hidrofobnih supstancija uglavnom je neizmenjena, dok je apsorpcija hidrofilnih supstancija smanjena. Verovatno objašnjenje leži u manjem relativnom sadržaju vode i pomenutom smanjenju međućelijskih prostora po jedinici zapremine. U ćelijama granuloznog i spinoznog sloja, najčešće ne mogu da se zapaze znatnije ultrastrukturne promene. Međutim,

bazalni keratinociti pokazuju morfološke promene koje mogu da se opišu kao difuzna epidermna displazija – heterogenost u veličini, obliku i prihvatanju histoloških boja. Brzina obnavljanja epidermalnih ćelija značajno je smanjena tako da je vreme zamene rožnatog sloja dvostruko brže kod mlađih osoba.

Naj upadljivije i najstalnije promene uočavaju se u predelu dermo-epidermalnog spoja u smislu njegovog zaravnjenja, tj. smanjenja broja dermnih papila, odnosno epidermalnih prečki za preko 50% u odnosu na jedinicu površine kože i zadebljanje lamine dense. Dok bazalni keratinociti mlađih osoba poseduju brojne citoplazmatske produžetke kojima prodiru u derm, ostarelim bazalnim epidermalnim ćelijama ovi produžetci upadljivo nedostaju.

Za razliku od epiderma derm, trpi znatno izrazitije promene u procesu starenja kože. Najupadljivije promene su starenje derma, dezorganizacija dermnog matriksa, smanjena vaskularizovanost i hipocelularnost. Posebno je značajno smanjenje broja fibroblasta i mastocita, ćelije koje su odgovorne za produkciju citokina i komponenti vanćelijskog matriksa. Primetan je gubitak fascikularnih kolagenih fibrila koje zamenjuju vlakna dezorganizovanog i granularnog izgleda. Sadržaj kolagena smanjuje se približno za 1% godišnje posle puberteta. Pored smanjenje ekspresije gena za kolagen u dermnim fibroblastima, ustanovljeno je i smanjenje ekspresije gena koji kodira kolagenazu u koži starijih osoba. Istovremeno, ovi geni u fibroblastima znatno slabije reaguju na egzogeno dodate citokine. Imajući u vidu da se sinteza prokolagena ustaljuje na određenom nivou posle 30. do 40. godine života, logično je pretpostaviti da je smanjenje njegovog sadržaja u toku daljeg života posledica pojačane proteolize. Pojačana ekspresija proteazne aktivnosti mogla bi da objasni ne samo globalno smanjenje sadržaja kolagena u ostareloj koži već i opsežnu destrukciju arhitekture vanćelijskog matriksa koja je upadljiva prilikom mikroskopskog pregleda.

Hijaluronska kiselina i dermatan sulfat najzastupljeniji su glikozaminoglikani u koži. Hijaluronska kiselina učestvuje u izgradnji i organizaciji vanćelijskog matriksa, pospešuje deadheziju i migraciju ćelija i

zadržava veliku količinu vode u vanćelijskom prostoru pospešujući transport jona i hranljivih materija u koži. U procesu starenja ukupna količina hijaluronske kiseline značajno se ne menja, ali je ustanovljena promena njene distribucije unutar kože, povećanje tkivno-vezane frakcije i promena molekulske mase. Lokalizacija hijaluronske kiseline u epidermisu i dermu odraslih osoba u epidermisu opada u srednjem delu spinoznog sloja kao i u bazalnom sloju, u dermalnom sloju se uvećava koncentracija u papilarnom dermu dok opada na periferiji kolagenskih mikrofibrila i prostoru između kolagenskih i elastinskih vlakana.

U toku starenja postoji upadljiva i progresivna dezintegracija elastinskih vlakana u papilarnom dermu tako da je posle 70. godine života ovim procesom zahvaćena većina vlakana. Smanjen je broj i prečnik elastinskih vlakana koja izgledaju fragmentovana, posebno u dermo-epidermalnom regionu, sa "čupavim" krajevima koji upućuju na delovanje elastoznih enzima. Postoje takođe naglašene fokalne nepravilnosti u rasporedu elastinskih vlakana.

U koži starijih osoba registruje se smanjen broj kapilarnih petlji u papilarnom dermu dok je površina poprečnog preseka dermnih venula smanjena za 35% što se manifestuje u vidu bledila kože i sniženju temperature. (Fan Lapluye Gavach 1987.)

2.4. Tokovi vode do kože, ulazak u dermis, ulazak u epidermis, formiranje nanosloveva vode kao lipid-voda kompleks, transepidermal water loss (TEWL)

Molekul kolagena poseduje važnu ulogu u svim tkivima kao i bazalnoj membrani i međućelijskom prostoru. Kao i čitav organizam, napravljen je predominantno od dielektričkih i dipolarnih molekula, gusto upakovanih zajedno, predstavlja čvrst sistem gde električne i viskoelastične sile konstantno interreaguju. Energija koja se oslobađa tokom metabolizma rezultuje u kolektivnim načinima vibracija. Kolektivni načini kretanja mogu da budu

elektromehaničke oscilacije (fononi ili zvučni talasi) i elektromagnetske oscilacije (fotoni). Takve koherentne oscilacije čine sistem kolagen, ostale organske i neorganske materije i rastvarač osetljivim za slabe signale. Molekuli kolagena mogu da podrže transport energije na velike razdaljine u obliku solitarnih talasa u koji je uključena svaka osnova peptida. Energija ekscitacije amidne veze i vibracije može difundirati duž polipeptidnog lanca kroz dipol-dipol interakciju između susednih amidnih oscilacija zato što atomske grupe C=O poseduje električni dipol od 0,3 Debye. Amidna veza i vibracija su povezani sa torzionom vibracijom u oscilaciji peptidne osnove. (Troschin 1966.) Dva različita odgovora su prisutna u kolagenu zavisno od toga da li su vibracije aksijalne ili normalne u odnosu na osnovu molekula kolagena. Odgovor kao posledica smanjenja vrednosti talasnog broja indukuju tenziju dok ako se kasnije produkuju i rastu indukuju kompresiju. Na ovaj način se strukturisu molekuli vode koji se na površini svih molekula, naročito na dipolarnim i naelektrisanim molekulima nakupljaju u obliku hidratacionih omotača gde se vodonične veze raskidaju za vreme nekoliko nanosekundi dok je u bulk vodi trajanje vodonične veze reda veličine pikosekunde. Kolagen strukturise vodu u pravilne lance niz fibrile kolagena, pogodne za brazde u tripletu heliksa. Mogao bi neki strukturisani protonski kabl biti organizovan na ili između kolagenih fibrila, naročito u dermu i bazalnoj lamini kože. Kolagen strukturise vodu u jednoj fazi u jednom trenutku vremena, u kritičnom trenutku hidratacije se odvija iznenadni fazni prelaz u kom se uspostavlja različito stanje reda analogno strukturama nalik ledu. (Stoiljković Bojanić Stojiljković Radenković 2007.)

Dermis obezbeđuje fleksibilnost i elastičnost kože. Njene glavne komponente obezbeđuju sporu difuziju konstituentnog fluida. Stopa difuzije u dermisu zavisi od krvotoka, pokretanja međućelijske tečnosti i interakcije tečnosti sa konstituentima dermisa. (Fan Lapluye Gavach 1987.) Vaskularni sistem kože obezbeđuje ne samo ishranu nego i snabdevanje vodom dermisa kože. Male mišićne arterije iz hipodermisa dopremaju krv do dubokog retikularnog pleksusa a od njega se male arterije protežu ka površinskim slojevima epidermisa i stvaraju novi pleksus na granici papilarnog i

retikularnog sloja dermisa. Kapilari nastali iz anastemoza ovog pleksusa formiraju kapilarne petlje u dermalnim papilama i prolaze uz samu bazalnu membranu. Kapilari se nastavljaju u vene čineći venski pleksus postavljen direktno ispod arterijskog papilarnog pleksusa. Putem autonomnog nervnog sistema, menja se tonus vaskularnog korita, te se na taj način smanjuje ili povećava pritisak u vaskularnom pleksusu koji je pokretačka sila snabdevanja epidermisa vodom. (Zweifach 1965.) Mali krvni sudovi, kapilari su srž cirkulatornog sistema Razmena vode i rastvorenih materija se odvija fizičkim procesima bez utroška energije od endotelnih ćelija (hidraulički pritisak, koloidna osmoza tkiva). Postoje dva moguća puta kojim voda i rastvorene materije mogu proći kroz zid kapilara. Mogu difundovati kroz kontinuirane vodene kanale (akvaporine) ili mogu biti filtrirani kroz pore hidrodinamičkim silama koje uzrokuje krvni pritisak. Eksperimenti ukazuju da se oba ova mehanizma odvijaju zajedno. Barijera kapilara kroz koju se vrši razmena se sastoji od endotelnih ćelija koje su delimično preklopljene i formiraju kontinuiranu cev u unutrašnjosti suda, i spoljašnje okruženje (bazalna membrana) amornog fibrilarnog sloja 50 do 60 nm debelog. Površina lumena kapilara je ograničena tankim slojem glikoproteina čija je uloga kontrola propustljivosti kapilara. Granice susednih ćelija su u bliskom kontaktu, rastojanje između njih je 10 do 15 nm. Materijal koji se nalazi između endotelnih ćelija je produžetak bazalne membrane. Ukupno kretanje molekula vode kroz ovu barijeru zavisi od ravnoteže između hidraulične snage krvi i osmotskog pritiska proteina plazme. Razmena obuhvata i difuziju i glavno kretanje vode kroz vodene kanale ili pore. Dva su glavna puta za protok vode: hidrofilna matrica koja je prisutna između endotelnih ćelija i u kontinuitetu je sa bazalnom membranom i tankih delova endotelnih ćelija (akvaporini). (Lu Parker Wang 2006.)

Ekstraćelijski matriks (ECM) se sastoji od međućelijskog matriksa i bazalne membrane. Gel od polisaharida i fibrozni proteini ispunjavaju međućelijski prostor i deluju kao kompresioni bufer protiv stresa koji deluje na ECM. Obezbeđuje potporu i pričvršćivanje ćelije i učestvuje u fiziologiji ćelije,

razdvajaju tkiva jedno od drugog, regulišu ćelijsku međukomunikaciju, ćelijsku dinamiku ponašanja. Komponente ECM intercelularno proizvode ćelije smeštene u njemu, fibroblasti, i izlučuju ih egzocitozom zatim se sjedinjuju sa već postojećim matriksom koji čini izukrštanu mrežu fibrilnih proteina i glukozaminoglikana. Sastavljeni su od polisaharida koji se vezuju za proteine i čine proteoglikane, negativnog su naelektrisanja privlače pozitivno naelektrisane jone Na^+ koji privlače molekule vode osmozom čuvajući ECM i ćelije u njemu. Tečnost da bi dospela do ćelija većine tkiva mora da prođe difuzijom kroz ECM. U ECM posebno u bazalnoj membrani su prisutni multidomenski proteini: perlekan, entaktin, laminin, argin, kolagen XVIII koji su vezani preko heparan sulfata. Prisutni su i neproteoglikanski polisaharidi koji se sastoje od naizmeničnih ostataka D-glukuronske kiseline i N-acetil glikozamina. Hijaluronska kiselina u međućelijskom prostoru daje tkivu sposobnost da izdrži pritisak pružajući otpor turgoru, sili koja apsorbuje značajnu količinu vode. Ona deluje kao okolni lepak, reguliše ponašanje ćelije. Fibrili kao kolagen koji daje strukturnu podršku ćelijama tkiva i strukturišu molekule vode, egzocitozom se izlučuje iz ćelija kao protoglikan koji se onda cepaju u prokolagen proteazom da omoguće ekstracelularno okruženje. Pored brojnih funkcija uloga bazalne membrane je da bude difuziona barijera. Gustina fiksiranih naelektrisanja, bazalne membrane, kao jonogenih grupa koji se nalaze u proteoglikanu heparan sulfatu je mala. Pokazatelji mobilnosti hloridnih anjona i alkalnih klatjona se razlikuju u odnosu na one u vodi. U bazalnoj membrani je veća mobilnost Cl^- jona u odnosu na K^+ , Na^+ i Cl^{2+} . (Tang Goodenough 2003.) Struktura bazalne membrane se menja pod dejstvom pritiska. Strukture membrane se menjaju, umotani filamenti od kojih je sastavljena (elastin) se istežu kako stres deluje na membranu. Smanjenje propustljivosti se odvija uprkos uvećanju površine membrane za 75% i smanjenja debljine za 65%. Prolaz vode se odvija kroz cilindrične pore čiji se prečnik smanjuje sa povećanjem pritiska na membranu, odnosno istezanjem membrane. Sama debljina nije neophodna da bi se smanjila propustljivost bazalne membrane čije je prosečno vreme 3h. (Tang Goodenough 2003.) Voda je konstituent međućelijskog prostora, čiji je deo bazalna membrana, u kom interreaguje sa biološkim molekulima. Razumevanje ove

dinamike je od fundamentalnog značaja za saznanje o funkcionisanju tkiva pa i čitavog organizma.

U međucelijskom prostoru su veliki molekuli kao proteoglikani zarobljeni i stvaraju veliki pritisak da uravnoteže spoljašnji. Polupropustljivi matriks i fiksirana negativna naelektrisanja ovih molekula služe da proizvedu bubrenje tkiva kad je neravnoteža u balansu molekula. Strukturni molekuli, kao fibrili kolagena formiraju mrežu koja je otporna na istezanje, koja sprečava tkivo da previše nabubri i čuva integritet tkiva. Međutim kolagen malo doprinosi kao nosač, osmotski pritisak je glavni faktor u uravnotežavanju spoljašnjeg pritiska. (Ågren Zelenin Håkansson, Eklöf Aperia Nejsum Nielsen Sedin 2003.) Hidrostatički pritisak favorizuje filtraciju pod pritiskom vode kroz pore zato što je ovaj pritisak sa strane pore u krvi veći od onog u tkivu. Primarna odbrana protiv suviše filtracije je koloidni osmotski pritisak. Tako da je ukupna sila filtracije samo neznatno pozitivna ili negativna.

Hidratacija epidermisa je izuzetno varijabilan proces, kao odgovor na spoljne faktore i dermis i hipodermis su jako propustljivi za vodu. Ukupna funkcija barijere je kontrolisana od strane epidermisa, koji može da bubri apsorbujući vodu kojom se snabdeva iz mikrocirkulacije ili okolne sredine. Zapremina ćelijske faze se reguliše ulaskom vode i Na, K⁺ i Cl⁻ kroz ćelijsku membranu i njihovim kontrolisanjem u skladu sa vremenskim kašnjenjem. (Brandner 2007.) Čvrsta spojnica, koje u apikalnim delovima spajaju bazalne ćelije, obezbeđuje paracelularan put za transport vode i rastvorenih materija ne samo u stratum bazale nego i u stratum granulozum. Čvrsta spojnica je spojnica ćelija-ćelija koje se formiraju kao paracelularne barijere za rastvorke i vodu između epitelnih ćelija i međucelijskog prostora, time uspostavljaju paracelularnu barijeru. Proteini koji ulaze u sastav čvrste spojnice su nađeni u svim živim delovima epidermisa.

Veliki transepidermalni gubitak vode TEWL može izazvati ozbiljnu dehidrataciju. TEWL je strukturno svojstvo epidermisa ali može biti pod uticajem mehanizma koji ubrzava transport vode. Akvaporini su uključeni u

ekstremni gubitak vode kroz kožu. AQP 1 je detektovan u dermalnim papilama, dok je AQP 3 obilan u bazalnom sloju epidermisa. Oba akvaporina su nekoliko puta češća u embrionu nego u odraslom organizmu. Akvaporini su proteini u ćelijskoj membrani ćelija koji regulišu tok vode i deo su transcelularnog puta vode. Efikasnost akvaporina je zasnovana na prolasku individualnih molekula vode na kontrolisani način. U germinativnim ćelijama kože akvaporin 3 je propustljiv osim za vodu za glicerol i ureu. U vodenim kanalima voda može proći nesmetano u oba pravca u smeru osmotskog gradijenta. (Bielfeldt Schoder van der Pol de Sterke Klaus-Peter 2008.) Intercelularna sredina je osmotski kontrolisana da bi sačuvala molekularnu strukturu i svoju funkciju. Ova kontrola je veoma važna u epidermalnim kompartmentima koji su izloženi suvoći spoljašnje sredine. Prolaz vode od stratum bazale kroz kožu se odvija osmotskim procesom. Varijacije u osmotskom pritisku i njegova relacija u odnosu na regulaciju telesne temperature su povezane. Akvaporini su nađeni u membranama svih živih ćelija kože, nestaju tek u stratum corneumu. Unutrašnji lipidni slojevi stratum corneuma su hidrofobni, stoga provodnost molekula vode postaje mala. Da bi postojao protok vode u plićim slojevima kože slobodna voda mora proći kroz specifične kanale ili biti vezana za specifične hidrofilne supstance i onda se transportovati kroz dezmozome, mostove u epidermisu. (van Kemenade 1988.) Prostorna distribucija AQP 3 je u korelaciji sa sadržajem vode u koži, bazalni i suprabazalni slojevi ćelija sadrže 75% vode dok stratum corneum sadrži 10-15% vode. Slično tome dok je Ph na površini kože oko 5 povećava se do 7 ispod stratum corneuma. Dakle Ph senzitivan AQP 3 je inhibiran kiselim Ph i ima udela u nepropustljivosti za vodu na granulo korneocitnoj granici. Diskontinuitet u sadržaju vode između stratum granulozuma i stratum corneuma je suštinska za strukturu epidermisa zato što loša hidratacija stratum corneuma omogućava visoko uređenu lipid-voda organizovanu strukturu (suštinsku za održavanje barijere propustljivosti kože) koji postoji između korneocita.

Stratum corneum poseduje približno 30% vode, koja je uglavnom asocirana sa elastičnošću. Za lipide je vezano 10% vode, a preostalih 20% je

sekundarno vezana za keratin. Zdrav stratum corneum mora biti u stanju da održava adekvatan nivo vode nasuprot gradijentu evaporativne difuzije koju kontroliše relativna vlažnost. Zdrav stratum corneum sadrži 10 % čvrsto vezane vode, koja zavisi od prisustva prirodnih faktora vlažnosti (NMF) koji vezuju molekule vode iz vazduha. Prirodni faktori ovlažavanja (NMF) su prisutni samo u stratum corneumu. Nalaze se u dubljim slojevima na kojima nivo sadržaja NMF opada kao i nagib profila sadržaja vode u korneumu zajedno sa njim, sve do površine kože. (Xiao Imhof 2010.) Voda nije prisutna samo u korneocitima nego se nalazi i u međucelijskom regionu. Voda se akumulira u vodenim džepovima smanjujući koheziju korneocita. Uprkos prisustvu velike količine vode u stratum corneumu sloj niske hidratacije između stratum corneuma i stratum granulozum je još prisutan, širok je oko 10 μm .

Transport vode kroz kožu je blisko asociran sa razlikom u pritisku vodene pare i spoljašnje sredine. Gradient hemijskog potencijala kože nastaje zbog gradijenta potencijala pritiska. Transport vode uzrokuje prenošenje jona. Koncentracija jona na površini kože je veća od one u subpapilarnom pleksusu. Joni ne mogu proći granicu koža okolina pa prenošenje jona, zbog toka tečnosti, je uravnoteženo difuzijom jona u suprotnom smeru. Glavna sila za transport vode je gradijent hemijskog potencijala tečnosti i jona. Negativna vrednost hemijskog potencijala na površini kože je suštinska za manji pritisak pare na površini kože što smanjuje gubitak vode. Hidraulička propustljivost mrtvih delova kože je 10^7 puta manja nego u živim delovima. Epidermis se može opisati kao visko elastična čvrsta materija bez unutrašnjeg toka tečnosti. (Garidel Funari 2005.) Za difuziju vode kroz epidermis i transcelularni i intercelularni put su važni, međutim veća količina vode difunduje kroz transcelularni put zbog većeg odnosa površine korneocita u odnosu na lamelarnu oblast. Fluks difuzije vode, TEWL, je obrnuto proporcionalan u odnosu na veličinu korneocita, manja veličina korneocita dovodi do većeg TEWL jer poseduju brži proces difuzije. (Gleeson Erramilli Gruner 1994.)

Karakteristika stratum corneuma je visoko uređena strukturna organizacija lipida, čija je težina 10% ukupne težine. Velike klase lipida koji

grade uređene lamelarne strukture su ceramidi, kojih je 50%, holesterol 25% i masne kiseline 10%. Male količine holesterol sulfata i holesterol estra su takođe prisutne. Svi ceramidi i masne kiseline su štapićastog ili cilindričnog oblika i njihove fizičke osobine ih čine pogodnim za formiranje domena membrane sa visoko uređenom gel fazom. Domen gel faze će biti manje fluidan i stoga manje propustljiv za molekule vode od njemu suprotne tečnokristalaste faze. Holesterol je opšte prisutan membranski lipid i sposoban je da obezbedi stepen fluidnosti da ne bi lamelarni sloj bio rigidan i moguće krt sistem. Ovo može biti neophodno za savitljivost kože. Po modelu Forslinda ostrva gel faze domena su razdvojena kontinuiranim tečno kristalastim domenom. (Forslind 1994). Unutar takve lamele polarni molekuli difunduju bočno u ili u blizini regiona grupa polarnih glava i molekuli vode mogu difundovati bočno unutar hidrofobne unutrašnjosti hidrofobnog dvosloja. Molekuli vode mogu difundovati samo slabo kroz domen gel faze i difuzija kroz takvu lamelu će biti više favorizovana kroz tečno kristalni domen. Region većeg fluksa kroz takvu lamelu mešovite faze bi bila na granici faza. Granica faza poseduje veću frekvenciju defekta pakovanja. Struktura i organizacija ceramida u lipidnoj fazi stratum corneuma ima jak uticaj na propuštanje i zadržavanje vode u koži. Za ceramide i malo sniženje lamelarne razdaljine ponavljanja može biti povezano sa reorganizacijom ugljovodoničnih lanaca. Znak i oblik amida I jasno ukazuje da voda prodire u polarnu međupovršinu lipida, posle hidratacije amid I je uključen u mrežu jačih vodoničnih veza. Prisustvo vode nema veliki uticaj na lamelarne razdaljine ponavljanja ukazujući da se veoma mala količina vode može inkorporisati u polarnu površinu ceramidnih molekula. (Garidel 2006.) Osnovna svojstva vode kao gustina i dielektrična konstanta se menjaju u kontaktu sa jednom polarnom glavom lipida. Karakteristika različitih polimorfnih lipid voda faza je da voda zarobljena u kanalima mikroskopskih dimenzija različitih morfologija lipida ograničava vodu u jednu, dve, ili tri dimenzije. Kad nova voda dospe u region između dvosloja vrši se rad kako nova voda uređuje polarne glave. Ovo rezultuje u efikasanom odbijanju između susednih lipidnih dvosloja. Doprinos u ukupnoj slobodnoj energiji od udruživanja vode sa polarnim glavama prevazilazi ovaj rad, tako da je ukupna

promena slobodne energije negativna. Na nižem osmotskom pritisku izvan opsega hidratacionog odbijanja ovaj režim uslovljava elektrostatičko odbijanje za naelektrisane molekule vode ili van der Waals privlačenje za neutralne molekule. Kad se temperatura sistema menja voda se repartioniše dok se hemijski potencijal ne izbalansira. Zato što hemijski potencijal vezane vode strogo zavisi od debljine sloja vode između dvosloja, reparticioniranje se manifestuje kao promena u jedinici ćelijskog prostora lamelarne rešetke. Imamo sistem u kom se može otkriti ravnoteža particionisanja vode između dva stanja. Struktura dvosloja se modifikuje kako se voda particioniše u lamelarnoj strukturi. (Silva Topgaard Kocherbitov Sousa Pais Sparr 2007.) Posle hidratacije acil lanaci fitosfingozin ceramida se pakuju u nalik na heksagon lance. Amid I i amid II vibracije su osetljive na fazni prelaz ceramida. Analiza traka spektra otkriva jeke inter i intra molekularne vodonične veze između amida i hidroksilne grupe u polarnoj grupi ceramida. Mreža vodoničnih veza i konformacija polarne grupe ceramida je samo neznatno pod uticajem hidratacije. (Toskić-Radojičić 2002.) Sloj vode između lamelarnih membrana je ekstremno tanak oko 0.1 nm i vreme potrebno za potpunu hidrataciju je u poređenju sa fosfolipidnom membranom mnogo duže dok voda prodire mnogo dublje u membranu i otkrivena je delimično u sloju ugljovodoničnih lanaca, verovatno voda ubrzava lateralnu difuziju lipida u membrani. Red acilnih lanaca u lamelarnim lipidima raste sa hidratacijom kad je sadržaj vode mali dok je nezavisan od stepena hidratacije pri većem sadržaju vode. Na neznatno višoj temperaturi se fluidnost membrane povećava sa povećavanjem sadržaja vode do potpuno hidratisanog stanja. Ovo ukazuje da i temperatura i hidratacija utiču na fazno ponašanje stratum corneuma. Proces hidratacije može uticati na stepen jonizacije masnih kiselina u lipidima, moguće da koncentracija protona između lamela može varirati između nabreklog i suvog uzorka. Verovatno da Ph utiče na fazno ponašanje lipida stratum corneuma. Lipidi u gel stanju imaju mnogo manju sposobnost da apsorbuju vodu. Nađen je eksponencijalni odnos između osmotskog pritiska i sadržaja vode pri relativnoj vlažnosti od 65%. Osmotski pritisak vode je isti kao i intermolekularne sile u dvosloju lamelnog sistema, pri relativnoj vlažnosti od 100%. Egzotermni prelazi pri višoj relativnoj

vlažnosti se odvijaju usled reorganizacije lipidnih domena unutar lamelarne strukture t.j. usled fuzije lipidnih domena na većoj relativnoj vlažnosti. Svojstva ekstracelularnih lipida stratum corneuma su suštinski za svojstva barijere za kožu, tečni lipidi predstavljaju neprekidan put za transport molekula. (Membrino 2002.) Put transporta kroz stratum corneum je preko tečno-kristalnih zona bilamelne lipidne strukture koje zauzimaju prostor između korneocita. Ove bilamelne strukture su razdvojene vodenim filmom koji dodiruje funkcionalne hidrosolubilne grupe lipidnih molekula. Prema tome voda može da klizi u filmu sve dok ne pronađe prolaz u sledeći sloj. Od nivoa bazalnih ćelija ka površini stratum corneuma dužina lanca lipida primetno raste. Za funkcionisanje barijere bitno je da sadržaj neutralnih lipida bude veći od sadržaja svingolipida. Vrlo retko voda će moći da vezano prođe više slojeva, pa će stoga imati dugu krivudavu putanju. Molekuli vode su agregirani u malim bazenima koji su locirani u blizini zupčastih površina lipidnih regiona. Vodeni bazeni su uzrokovani faznom separacijom između hidrofobnih regiona lipidnih dvoslojeva i molekula vode. Predpostavlja se da su bazeni međusobno povezani, što predstavlja kontinuiranu mrežu vodenih puteva za difuziju vodenih supstanci. (Mae Wan Ho 2008.) U zavisnosti od temperature i količine vode lipidi lamela pokazuju različite vrste tečno kristalnih struktura odnosno različite vrste dvosloja razdvojenih dobro definisanim slojevima vode. Broj ovih međuslojeva vode reguliše dinamiku i strukturu dvoslojnih faza lipida. Broj molekula vode koji je vezan za svaki molekul lipida se menja nepovezano na različitim promenama strukturnih faza prelaza lipid voda sistema. Za svaku fazu je karakterističan magični broj vezanih molekula vode. Dinamika dvosloja kao rotaciono kretanje polarne glave ili kao stopa trans izomerizacije lipidnih lanaca zavisi od broja molekula vode između dva dvosloja. Osobine vezane vode kao i sile između dva sloja lipida su suštinske za funkciju barijere. Magični broj molekula vode se očekuje da bude rezultat konkurencije između privlačne van der Waalove sile između dva susedna lipidna dvosloja i odbojne sile molekula vode vezane između dva dvosloja lipida. U lipidnom dvosloju postoje domeni u kojima dominiraju istiskivanje vode odnosno hidratacione sile, koji zavise od temperature i sastava vode. (Marrink Berendsen 1994.)

2.5. Prolaz ekstracelularne vode u ćeliju: bubrezi, koža, ostala tkiva – aquaporini, ostali mehanizmi

Voda kroz sva epitelna tkiva prolazi uz pomoć tri mehanizma: prostom difuzijom, transcelularno akvaporinima i paracelularno uz pomoć kanala u tesnoj spojnici. Takvo kretanje vode se odvija u ćelijama epitelnog sloja tubularnih kanala bubrega i creva i tako omogućuju koncentrovanje urina i unošenje vode u krvni i limfni sistem organizma. Isti proces se odvija u osnovi funkcionisanja epidermisa kože.

Model četiri regiona objašnjava molekularni mehanizam difuzije molekula vode kroz ćelijsku membranu. Struktura i dinamika ćelijske membrane je u osnovi procesa difuzije. Ćelijska membrana je sistem nehomogene prirode, u kojoj ne postoji dobro definisana granica između molekula vode i lipidne faze. Kroz veoma grubu površinu između vode i polarnih glava lipidnih molekula lanci molekula vode prodiru u membranu, što se zove prolazni defekt. Raspored slobodne zapremine između molekula lipida poseduju veliku zavisnost od položaja, tečna faza alkana se nalazi samo na kraju repnog dela acilnog lanca. Sloj uznemirene vode se proteže oko 1nm u bulk vodu, njene osobine su bliske osobinama bulk vode. Ove perturbacije su važne za hidratacione sile između membrana. U regionu vezane vode više ne postoje osobine koje su slične bulk vodi. Skoro svi molekuli vode su vezani za jednu ili više polarnih grupa lipida kako bi preuzeli nedostajući atom vodonika od susednog molekula vode. Difuzija molekula vode se odvija zajedno sa difuzijom lipida, čija difuzija je malo sporija, ili skakuću od jednog do drugog hidratacionog omotača, što obuhvata proces raskidanja jake vodonične veze. Kao posledica veće gustine lipida i raskidanja povoljne mreže vodoničnih veze se povećava višak slobodne energije za oko 10 KJ po molu u ovom regionu. U regionu velike viskoznosti skoro ni jedan molekul vode nije prisutan, ulazeći u ovaj region preostale vodonične veze sa ostalim molekulima vode se raskidaju, jedina mogućnost da se održe povoljne, kratkog dometa, elektrostatičke interakcije je prisustvo karbonilnih grupa. Proces difuzije se odvija preko

pojedinačno raspršenih molekula. Za vodu dostupni prostor je mali što smanjuje mogućnost za formiranje vodoničnih veza i smanjuje elektrostatičke interakcije i rezultuje veliko povećanje slobodne energije u ovom regionu. Glavni otpor prolasku molekula vode kroz ovaj region je mala stopa difuzije i velika slobodna energija molekula vode. Region niže gustine lipida je sa repovima koji su manje uređeni i stvaraju veće slobodne džepove pa je proces difuzije mnogo brži. Prolazak molekula vode kroz membranu se odvija raskidanjem vodoničnih veza između molekula vode i gubitak elektrostatičkih interakcija. Pravi proces difuzije počinje od lipidnih lanaca gde molekuli vode prolaze duboko u membranu. Nakon što steknu dovoljno energije od slučajnih sudara da pobegnu od ovih lanaca prolazak je jedino ograničen difuzijom kroz viskoznije delove membrane. Difuzija kroz središnji deo je relativno laka, dok druga strana membrane pruža isti otpor. (Dumas Noblesse Lachmann-Weber Boury-Jamot Verbavatz Schnebert 2007.)

AQP0, AQP1, AQP2, AQP4 i AQP5 su propustljivi samo za vodu dok su AQP3, AQP7, AQP9 visoko propustljivi za vodu ali su takođe propustljivi za glicerol i druge male molekule AQP6, osim propuštanja vode omogućuje i prolazak anjona i reguliše acido baznu ravnotežu. AQP8 je podjednako efikasan u propustljivosti vode i glicerola. Transport vode kroz akvaporinske kanale, male hidrofobne molekule proteina, moguć je zahvaljujući tetramernoj arhitekturi ovih kanala težine 29 Kd koji obezbeđuju prolaz selektivno za molekule vode pošto pozitivan elektrostatički potencijal unutrašnjosti ovih kanala omogućava selektivno zadržavanje svih molekula koji nose naelektrisanje kao što su joni i protoni. Ispitivanje mehanizma transporta vode u različitim tkivima ukazuje na postojanje uskih pora u akvaporinima koje sprečavaju prolaz velikih molekula, jona, čak i protona (H_3O^+) i hidroksilnih grupa (OH^-) uz istovremeno održavanje visokog nivoa permeabilnosti za molekule vode: $\sim 10^9$ molekula H_2O u sekundi po kanalu. Nekoliko molekula vode simultano prolaze kroz kanal od kojih svaki sekvencijalno formira specifične vodonične veze i zamenjuju ih drugi molekuli vode niz gradijent. Formiranje vodoničnih veza između atoma kiseonika i amino grupa bočnih

lanaca obezbeđuje prolaz samo molekula vode kroz kanal. (Stoiljković Bojanić Stojiljković Radenković 2007. King Yasui Agre 2000. Lipowsky Grotehans 1992.)

Kod ljudi je pronađeno 13 različitih akvaporina (akvaporin 0-12) u različitim ćelijama različitih organa. U bubrezima 5 vrsta akvaporina u ćelijama nefrona omogućuju reasorpciju vode i malih organskih i neorganskih molekula iz primarne mokraće nazad u telo. AQPO 1 je čest u ćelijama proksimalnih tubula i ćelijama koje čine epitel silazne grane nefrona. Prisutan je u manjem broju i u epitelnim ćelijama sabirnih kanala bazolateralne membrane. AQPO 2 je lokalizovan u epitelnim ćelijama sabirnog kanala zajedno sa AQPO 3 i AQPO4. AQPO 6 je takođe prisutan u vezikulama epitelnih ćelija, proksimalnim tubulama i interkalarnim ćelijama sabirnih kanala.

U plućima, 4 vodena kanala koja omogućuju vlaženje disajnih puteva i viscelarne pleure, su indentifikovana u respiratornom traktu. AQPO 1 je prisutan u apikalnoj i bazolateralnoj membrani ćelija mikrovaskulturnog epitela i viscelarne pleure. AQP5 je prisutan u ćelijama apikalne membrane pneumocita i sekretornim ćelijama submukoznih žlezda disajnih puteva. AQP3 i AQP4 se nalaze u bazolateralnoj membrani raznih ćelija disajnih puteva i nasofaringealnom epitelu. Ova nepreklapajuća distribucija obezbeđuje koordinisanu mrežu za transcelularno kretanje tečnosti u respiratornom traktu.

U mozgu AQP1 je čest u apikalnoj membrani mikrovila horoidnog epitela i omogućuje stvaranje cerebrospinalne tečnosti. AQPO 4 se nalazi u mozgu u astroglijalnim ćelijama posebno u perivaskularnim membranama, takođe se nalazi u ćelijama neurona supraoptičkih i paraventrikularnih jedara.

U oku je indentifikovano u raznim domenima 5 akvaporina: AQPO 0 je malog kapaciteta akvaprotein očnog sočiva čija nefunkcionalnost može izazvati kongenitalnu kataraktu. AQPO 1 je kornealan akvaporin prednjeg epitela sočiva prisutan je u iris, kao i AQPO 5 kornealnog epitela, smanjuju sadržaj vode ovih tkiva. AQPO 4 je prisutan u osnovi Milerovih ćelija u retini, igra ulogu u hidraciji

zavisnoj od svetlosti međucelijskih prostora. AQPO 3 je prisutan u bulbalnoj konjuktivi i igra ulogu u hidrataciji zaštitnog omotača oka.

Eritrociti produžuju svoj životni vek, opstajući za vreme prolaza kroz hipertoničnu bubrežnu medulu, pomoću AQPO 1 a ljudi sa poremećajem ovog akvaporina imaju hemolizu niskog stepena. Prisutan je i AQPO 3 koji omogućuje preživljavanje eritrocita kod ljudi sa deficitarnim AQPO 1.

Pljuvačne i lakrimalne žlezde poseduju AQPO 5 koji je sličan po kapacitetu transporta vode kao i ostali akvaporini i u osnovi je mehanizma ekskrecije suza i pljuvačke. Nalazi se u apikalnim membranama sekretornih ćelija pljuvačnih i suznih žlezda ali nisu prisutni u bazolateralnoj membrani ili u ćelijama samog dukta. Distribucija AQPO 5 ima veze sa Sjorgensovom bolešću, imunološki proces koji uzrokuje suvo oko, suva usta i isušivanje traheobronhijalne sluzokože.

Otkriće porodice akvaporina, membranskih proteina omogućuju novi pogled na molekularni mehanizam propustljivosti membrane za vodu, koja je povezana sa mnogim bolestima. AQPO 7 i 9 su povezani sa metabolizmom masti, nedostatak funkcije ovih akvaporina je povezan sa uvećanjem sadržaja masnog tkiva.

AQPO 10 je prisutan u endokrinim ćelijama, omogućuje njihovu funkciju izlučivanja hormona. AQPO 12 se nalazi u acinarnim ćelijama pankreasa i odgovoran je za subcelularnu regulaciju protoka vode i malih molekula. (Marrink S.-J. and Berendsen 1994.)

Akvaporin 6 je distribuiran kroz čitav gastrointestinalni trakt. Lokalizovan je na apikalnom kraju površinske epitelijalne ćelije i uključen je u pokretanje vode i anjona kroz vile epitela. AQPO 5 ubrzava transport vode kroz plazma membranu i nađen je u ćelijama creva, duodeuma, pankreasa, zajedno sa 6 drugih vrsta akvaporina.

Otkriveno je prisustvo 7 različitih akvaporina u koži čoveka (AQP 1, 3, 5, 7, 9, 10 i 11) mogu biti selektivno prisutni. AQP 11 i AQP 1 su pronađeni u dermalnim endotelnim ćelijama, dermalnim fibroblastima, i melanocitima. AQP 10 mRNK je otkrivena u korneocitama, poznato je takođe da se odvija ekspresija AQP 9 za vreme diferencijacije ćelije. U monocitama i derivatima monocita, dendričkim ćelijama je takođe pronađen AQP 9, ali monociti takođe poseduju i AQP 10. Na kraju AQP 9 je nađen u preadipocitama, dok je u diferenciranim adipocitima nađen AQP 7, dok je u ćelijama znojnih žlezda prisutan AQP 5. Gde su AQP 1, 5 i AQP 11 isključivo vodeni kanali, AQP 3, 7, 9 i 10 propustljivi su za vodu i za glicerol. Često se nalaze dva različita akvaporina u jednom tipu ćelija, što zavisi od stanja ćelijske diferencijacije. (Willard Kadwell Overton Luther Woychik 1994.)

Unutarćelijski super akvaporin 11 je nađen u lipozomima endoplazmatskog retikuluma, omogućuje prolazak vode između različitih kompartmenata ćelije da bi se uravnotežili Ph, osmotski pritisak ili gustina vode u celoj ćeliji. AQPO 8 je propustljiv pored molekula vode za vodonik peroksid i amonijak nalazi se u mitohondrijama ćelija jetre, regulisan je tireoidnim hormonom.

Pukotinasta spojnicica čini glavnu barijeru za prolazak molekula vode kroz endotelni sloj ćelija i regulišu paracelularno kretanje molekula vode i rastvorenih materija. Ova barijera je promenljiva i fiziološki regulisana, doprinosi nastanku bolesti. Paracelularan put prenosa se odvija, preko tesne spojnice, pasivan je, rezultat je difuzije i elektrodifuzije ili osmoze niz gradijent koncentracije koji stvara transcelularan mehanizam. Ne pokazuje direkcionalnu diskriminaciju ali enormno varira u električnoj otpornosti i pokazuje male razlike u selektivnosti jona. Sama spojnicica se sastoji od razgranatih međusobno povezanih barijera koje sadrže pore koje variraju između otvorenih i zatvorenih konformacija. Mali stepen diskriminacije slično naelektrisanih ali različite veličine jona ukazuju da su vodene pore veoma velike. Pukotinaste spojnice epitelnih ćelija se sastoje od strukture nalik uskom pojasu u apikalnom regionu bočnih plazma membrana koje kružno vezuju svaku ćeliju svoga suseda.

Spojnice su veoma dinamične strukture koje se sklapaju rastu, reorganizuju i rasklapaju tokom fiziološkog ili patološkog procesa. Familije proteina kladin i okludin zajednički formiraju pukotinastu spojnicu. Kladin spaja ćelijsku membranu 4 puta sa N i C krajevima u citoplazmi, gradi dve ekstracelularne petlje koje su visoko konzervativne. Prva petlja je veća od naredne i uključena je u homofilne i heterofilne interakcije. Kladini grade osnovu pukotinaste spojnice a zajedno sa okludinom i drugim proteinima spojnice omogućuju funkcije. Okludin je transmembranski protein koji je deo pukotinaste spojnice i doprinosi funkciji barijere spojnice i formiranju vodenih kanala. Okludin formira dve spoljašnje petlje i četiri transmembranska domena, oba kraja su locirana u citoplazmi. (Harvey Lodish 2004.)

3. UOČAVANJE PROBLEMA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Uočavanje problema u razumevanju dosadašnje kompatibilnosti vode u interakciji sa biomolekulima

Sposobnost molekula vode da se samoorganizuju je posledica formiranja vodoničnih veza, jer je molekul vode simetričan donator i primalac protona. Proton jednog molekula vode interreaguje sa usamljenim parom elektrona atoma kiseonika drugog molekula vode i usamljeni par elektrona jednog molekula vode interreaguje sa protonom drugog molekula vode. Svaki molekul vode je u interakciji sa četiri susedna molekula vode preko atoma vodonika ili vodonične veze koja se obrazuje preko ovakve interakcije. Jedna od osobenosti strukture vode je velika osetljivost na spoljne uticaje i očuvanje strukture vodoničnih veza neko vreme. Faktor koji najviše utiče na strukturu vode je nehomogeno magnetno polje, koje nastaje u samoj ćeliji ili dolazi izvan organizma. U tom smislu je voda termodinamički neuravnotežen sistem. Tečna voda poseduje mikroheterogenu strukturu koja ima velike grupacije od nekoliko hiljada molekula vode. Ove grupacije sadrže aglomerate vode sa strukturom koja je kao u ledu. Pretpostavlja se da između takvih grupacija ne postoji direktna interakcija. Prostor između grupacija, tečnih kristala, je ispunjen međufazom, molekulima vode sa raskinutim vodoničnim vezama ili malim nakupinama vode koji su više mobilni. U standardnim uslovima bulk voda se sastoji od 30% pojedinačnih molekula vode, 30% slučajno asociiranih molekula vode i 40% klastera vode, gde su molekuli vode pravilno uređeni. U klasterima vodonične veze između molekula vode traju duže nego u vezanoj vodi. Efekti strukturiranja smanjuju dielektričnu aktivnost vode i indukuju crveni pomak njihove frekvencije relaksacije. Ovo je takođe izvor polarizacionog polja koji doprinosi interakciji između makromolekula.

U obrazovanju konformacije molekula proteina, voda posreduje u savijanju lanca u potrazi za prirodnom topologijom, sa najmanjom slobodnom energijom, preko levka pejzaža energija. Voda aktivno učestvuje i u

molekularnom prepoznavanju, posredujući interakciji između partnera i doprinosi njihovoj entropijskoj stabilizaciji. Voda je suštinska za samo održanje strukture bioloških molekula ne samo hidrofobno-hidrofilnom interakcijom nego i održavanjem stabilnosti njihovih struktura. Prvi hidratacioni omotač oko molekula proteina je gušći od bulk vode i molekuli vode duže borave u ovom vezanom omotaču oko proteina, koji poseduje raskinute vodonične veze, gušći je, poseduje veći hemijski potencijal i akumulira male naelektrisane jone (haotrope). Rotacija proteina proširuje ovu zonu raskinutih vodoničnih veza zone gušćih molekula vode koja se proteže dalje u zonu bulk vode utičući na njena svojstva na izvesno rastojanje od površine proteina.

Hidrofobne površine kao i fosfatidil etanolamin polarnih glava membrana oko sebe stvaraju zonu vode manje gustine, zbog prisustva hidrofobne površine energetski je povoljnije jače vodonično povezivanje između molekula vode sa pravijim vodoničnim vezama što ovu zonu vode čini manje gustom, sa manjim hemijskim potencijalom.

Očigledno vode sa različitim hemijskim sastavom i strukturom ne mogu posedovati isti biološki efekat, što se odražava na strukturu i funkciju biomolekula. Postavlja se čitav niz pitanja o mehanizmu stvaranja biološke vode i kasnije interakcije između molekula biološke vode i bulk vode kao i strukturisanja vezane (biološke vode). Proces hidratacije organskih i neorganskih molekula, u čoveku, se odvija u bulk vodi i za vreme tog procesa se obrazuje omotač od biološke vode, na koji način različite strukture vode, pojedinačni molekuli, haotične agregacije, i klasteri iz bulk vode, kao i već prisutna biološka voda oko drugih molekula, u promenljivom slabom magnetnom polju uz prisustvo mnoštva raznih interakcija utiču na obim i brzinu same hidratacije. Postavlja se pitanje samog kretanja molekula vode koji su pojedinačni ili asocirani sa drugim molekulima vode u prostoru različitim interakcija i uticaja na proces hidratacije i funkcija različitih molekula. Od suštinskog je značaja za odvijanje bioloških funkcija kao i sam život, kako se vrši izmena bioloških molekula vode (mobilnost) i bulk vode, koje strukture vode najpogodnije interreaguju sa vezanom vodom, na koji način se vrši izmena

molekula vode između biološke vezane vode i bulk vode. Proces razmene bi mogao biti brži ako bi se razmenjivale čitave grupe molekula vode (klasteri).

Da li postoji zavisnost i kakva je između razmene molekula vezane vode hidratacionog omotača i strukture klastera molekula vode. Kakva je organizacija metaboličke vode i njena interakcija sa drugim strukturama vode. Da li je vezana, biološka voda klasterisana na neki način i da li postoje različite vrste klastera i kakva je interakcija između njih. Na koji način se strukturiraju molekuli vode u tkivima čoveka i koji je mehanizam prolaska asocijacija molekula vode kroz akvaporine. Pitanje je da li vode između različitih komponenata unutar ćelije ili između ćelija komuniciraju jedni sa drugima. Promena odnosa dijamagnetizma/paramagnetizma u magnetnim poljima ćelija i međućelijskih prostora pa tim i čoveka bi mogli imati udela u dugodometnim interakcijama i prenosu informacija između bioloških struktura. Interesantno je da li i kako intracelularna voda jedne ćelije interreaguje sa okolnom ekstracelularnom vodom ili još zanimljivije sa intracelularnom vodom druge ćelije.

3.2. Uočavanje problema u razumevanju transporta vode u dermis-bazalna membrana-epidermis sistemu kože

Derm sadrži oko 80%-70% vode i ta količina se retko smanjuje tokom starenja što čini 15%-18% ukupne količine vode u celom telu. Sadržaj vode u dermu zavisi od uzrasta, stanja organizma i genetičkih svojstava. Mehanička svojstva epidermisa i količina vode u njemu se nalaze u tesnoj vezi sa mehaničkim svojstvima komponenata derma, koje su u mnogome uslovljene rastegljivošću njenih kolagenih vlakana i elastina kao i njihovim kvalitativnim odnosom i prostornom organizacijom. Nađena je značajna razlika u količini vode između spoljnog i unutrašnjeg dermisa. Ćelije i glukozaminoglikani su obilniji u površinskom dermisu nego u unutrašnjem dermisu i fibrili kolagena gornjeg dermisa su tanji i ređe pakovani u snopove nego u dubljem dermisu. Gustina kolagena je proporcionalno manja u spoljnjem dermisu tako da je proporcija mesta za interakciju protein voda manja od one u dubljem dermisu.

Kolagen čini 70% suve mase dermisa, protoni male pokretljivosti u ovom tkivu su odlika obilja vode koja je tesno vezana za kolagene dermisa usled čega im je ograničeno kretanje. Glikozaminoglikani dermalnog matriksa su asocirani sa elastinom i fibrilima kolagena i sposobni su da zadržavaju vodu i glavna su baza za hidrataciju kože. Oni obezbeđuju njene mehaničke karakteristike: elastičnost i fleksibilnost. Voda u gornje slojeve kože prodire difuzijom iz derma koji je pun vode kroz ekstracelularni matriks derma i njen specijalni deo bazalnu membranu. Ekstracelularni matriks je mreža proteina i ugljenih hidrata koji drže ćelije zajedno, okružuju i potpora su ćelijama, regulišu ćelijsku aktivnost i rešetka je za kretanje ćelija. Sastoje se od nerastvornih (ne mogu biti hidratirani) kolageni, elastična vlakna i rastvorljivi, lako se hidratiraju proteoglikani, hijaluron i adhezivni glikoproteidi. Osnovne supstance koje su hidratirane su slične gelu i suprotstavljaju se silama kompresije. Fibrili obezbeđuju istezanje dok je njihova uloga u interakciji sa molekulima vode nepoznata. Voda hidratacije sprečava brzu razmenu hranljivih materija i otpadnih materija. Glukozaminoglikani su negativno naelektrisani, izduženi nalik na štapiće, sastavljeni od disaharida koji se ponavljaju, obično vezuju velike količine vode. Visoka koncentracija Na^+ privlači ekstraćelijsku tečnost hidrirajući ekstraćelijski matriks. Glukozaminoglikani i proteoglikani zadržavaju vodu u koži, važna je ne samo za organizaciju ćelija u tkivo, reparaciju tkiva, nego i usmeravanje ćelija tokom migracije. Bazalna lamina donji deo bazalne membrane je učvršćena za susedno vezivno tkivo sa slojem fibrila kolagena umetnutih u matriks bogat proteoglikanima. (Duančić 1983.)

Transport vode do derma se odvija pomoću hidrostatičkog pritiska kapilara subpapilarnog pleksusa, dalji proces se odvija mehanizmom difuzije čiji detalji nisu potpuno objašnjeni. Molekularni mehanizam difuzije kroz ekstracelularni matriks je nedovoljno poznat jer se molekule vode u kretanju susreću sa mnogim preprekama od kojih ga neki mogu zadržavati neko vreme a drugi nerastvorni odbijaju. Potpuno je nejasan mehanizam prolaska slučajnih agregacija molekula vode kao i klastera vode kroz ovaj milje. Mehanizam strukturisanja vode epidermisa pre prolaska kroz akvaporine i pukotinaste spojnice bazalnih ćelija epidermisa je malo ispitan. Molekuli vode u dermisu su

uglavnom vezani za njegove razne strukture, njihova brzina prolaska i oblik u kom se oslobađaju iz vezanog stanja su nepoznati. Ništa se ne zna o promjenama na biološkim strukturama kao rezultat interakcije sa molekulima vode različitih organizacija. Nepoznato je da li mirovanje vode utiče na strukturisanost vode, na formiranje i razrušavanje klastera vode a da li kretanje vode u bilo kom obliku i kako utiču na strukturiranje. U kojoj se meri menja struktura vode prolaskom kroz krvne sudove, strukture kapilara, naročito u međućelijski prostor. Pitanje je da li se struktura vode razlikuje u krvi, limfi i međućelijskoj tečnosti i da li struktura pijaće vode i na koji način utiču na vrste voda u telu.

3.3. Uočavanje problema nedovoljnog poznavanje stanja vode u epidermisu i kako različite vode (sastav) utiču na stanje kože- Zrenjaninska i normalna voda

Sadržaj vode u epidermisu varira, u stratum germinativum je približno 80% kao i u ostalim živim ćelijama kože, stratum spinosum i stratum granulosum. Na površini kože u stratum corneumu koji se sastoji od mrtvih keratinocita, ovaj sloj je mnogo suvlji, sadržaj vode varira od 10% do 30% u zavisnosti od relativne vlažnosti okoline. Umetnute između spoljašnjosti i donjih slojeva kože keratinocite pokazuju različite nivoe hidratacije u različitim slojevima. Koncentracija vode pokazuje jasan gradijent u slojevima stratum corneum. Obilna sinteza lipida se odvija u stratum granulosum, postojan proces sa brzim uspostavljanjem funkcije barijere. Pošto nepolarni lipidi, uključujući i sterol estre i ugljovodonike, obezbeđuju funkciju barijere, sfingolipidi i slobodni steroli obezbeđuju dubinu barijere. Paralelno sa sintezom lipida za funkciju barijere hidroliza fosfolipida, glikolipida i holesterol sulfata odvija se u spoljnjem epidermisu što vodi do hidrofobnije mešavine lipida sa evolucijom membranskih dvoslojeva koji mogu regulisati transmembranski gubitak vode i proces deskvamacije. U susedstvu hidrofobnih površina se molekuli vode kreću kolektivno. Unutar stratum corneuma molekuli vode se sreću sa silama koje ih zadržavaju ili koje ometaju njihovo kretanje, ove sile koje zadržavaju opadaju

kako hidriranost tkiva raste. Sadržaj vode ljudskih keranocita se menja od 15% u spoljnim slojevima do 40% u unutrašnjim. Transepidermalni gubitak vode je pokretan koncentracionim gradijentom vode. Voda u stratum corneum može biti u vezanom i slobodnom stanju. Slobodna voda ili površinska voda je ona koja se polako apsorbuje i deapsorbuje i čini 50-60% ukupne vode. Vezana voda se brzo apsorbuje i deapsorbuje i deo je ukupne količine vode koja ne može da rastvori u vodi rastvorljive ne elektrolite. Čini 40-50% preostale vode i vezana je za proteine i lipide keranocita. Dalje se voda može klasifikovati u čvršće i labavije vezanu. Čvršće vezana čini približno 5-10% ukupne vode. Nešto ove vode se nalazi u intercelularnim prostorima i vezana je za polarne grupe lipida dok je ostatak vezan za polarne grupe keratina. Slabije vezana voda čini 30-35% ukupne količine vode i vezana je za sloj čvršće vezane vode. Sadržaj vode u ovom sloju je krucijelan i omogućen sa najmanje tri mehanizma: transport vode iz dermisa u stratum corneum, gubitak vlage isparavanjem (određen intercelularnim lipidima), koje formiraju barijeru za gubitak transepidermalne vode i sposobnost stratum corneuma da zadržava vodu. Struktura vode u stratum epidermisa je slabo istražena. Nepoznato je kako se menja strukturisanost vode sa prolaskom kroz bazalnu membranu. Naročito je zanimljivo a nepoznato strukturisanost vode i njena mobilnost u stratum bazale, lucidum i naročito granulozum s obzirom da se drastično menja hemijski sastav u ovim slojevima vode. Voda u stratum corneum i sa njim povezan proces uspostavljanja barijere i TEWL su potpuno neispitani na organizacionom nivou. Postavlja se pitanje kako mobilnost molekula vode utiče na njenu strukturisanost i interakcije sa raznim molekulima. Na koji način je organizacija molekula vode povezana sa procesom hidratacije, strukturom vezene i slabo vezane vode i naročito je važan mehanizam obrazovanja lamelarne organizacije. Posebno je interesantan uticaj organizacije molekula vode na fazno ponašanje lipidnog dvosloja i samo formiranje lamelarnih lipida. U kojoj meri je stvaranje i dinamika tečno kristalnih domena povezana sa organizacijom molekula vode. U lipidnim lamelama je voda na poseban način zarobljena između hidrofobnih površina u tankim slojevima, na koji način tako zarobljena voda interreaguje sa okolnim vazduhom. U kojoj meri različiti tipovi vode u epidermisu utiču na

njegove različite funkcije, kao odvajanje keratinocita, TEWL, privlačenje i zadržavanje vode iz spoljašnje sredine. Kako se sa starenjem strukture kože menjaju u zavisnosti od vrste struktura voda koje ljudi konzumiraju. Postavlja se pitanje kako molekuli vode u zavisnosti od njihove organizacije interreaguju sa keratinom i lipidnim strukturama epidermisa. Nepoznata je interakcija između vezane vode u korneocitima i vode iz lamelarnih lipida u zavisnosti od strukture vode koja se konzumira.

3.4. Uočavanje značaja definisanja, razumevanja i izučavanja vode sa aspekta njene biološke vrednosti $BVV = MB + HS +$ odnos $H-O-H/X-H...Y-H$ + veličina i tip klastera (veličina i vrsta jonsko-vodenog kompleksa) + paramagnetizam/diamagnetizam vode (dinamike kompleksa jona i vode)

BVV je do skoro definisana kao MB i HS jer bakterije, virusi, protozoe i helminti očigledno deluju na organizam pre svega kao patogeni, dok je hemijski sastav bitan za fiziološke funkcije organizma i ne samo količinski nego i odnos više različitih mineralnih materija koji dovodi do fiziološkog disbalansa. Strukturisanost odnosno klasterizacija vode su bili nepoznati pa nisu uzimani u obzir. Različite rastvorene materije poseduju efekat na vodu, preko vodoničnih veza koje uspostavljaju sa molekulima vode, utičući stvaranjem uređenih struktura (hidratacioni omotač Na^+) ili stvaranjem neuređenih, (više haotičnih struktura kao K^+ zbog svoje manje površinske gustine naelektrisanja). Strukturisanost vode pokazuje znatan uticaj na biološke strukture pre svega brzinom hidratacije i razmenom molekula bulk vode sa hidratacionim omotačem oko molekula da bi omogućili njihovo funkcionisanje. Odnos vodoničnih veza između molekula vode prema vodoničnim vezama između drugih atoma koji su donori ili akseptori vodoničnih veza (N, C, O, Cl...) i atoma molekula vode ima svoju dinamiku koja zavisi od vodonične mreže molekula vode na koju utiču različiti spoljašnji faktori pre svega jonski sastav od čega takođe zavisi biološka vrednost vode. Dinamika kompleksa jona i vodoničnih

veza molekula vode utiču na vrstu i karakteristike struktura koje se obrazuju u vodi i njenu dinamiku i trajanje, što je praćeno promenom elektronske strukture molekula vode od čega i zavisi formiranje i trajanje vodonične veze što je važno za sve biološke osobine molekula vode. Ovaj proces je praćen promenom odnosa dijamagnetizma/paramagnetizma tj. pojačavanjem i slabljenjem spoljnog magnetskog polja. Veoma je značajno pored MB i HS u definiciju o BVV uključiti i njenu strukturisanost i dinamiku jonskog kompleksa i molekula vode koji suštinski utiče na formiranje, trajanje i veličinu klastera molekula vode. Interakcija struktura molekula vode sa biološkim molekulima utiče na sve fiziološke funkcije organizma, starenje, kvalitet i trajanje bioloških struktura. Voda tokom ciklusa kruženja prolazi kroz različita polja sila koji utiču na raspored protona i elektrona u jednom i između različitih molekula vode, i zajedno sa kvantnim efektima utiču na dinamiku obrazovanja, vrste i trajanje struktura vode. Voda nije samo faktor rizika za različite infektivne bolesti već predstavlja faktor rizika za hronične i akutne neinfektivne bolesti i to ne samo njen hemijski sastav nego i njena strukturisanost koja zavisi i od odnosa hemijskih materija u vodi. Struktura vode je od bitnog značaja za dešavanja na graničnim površinama svih organskih i neorganskih molekula u ćeliji pa i čitavom organizmu i od suštinskog su značaja za nastanak i odvijanje molekularnog mehanizma patoloških procesa u organizmu.

3.5. Predlog pravca istraživanja i priroda vodonične veze

Priroda vodonične veze je dualna, klasična (elektrostatička interakcija na bazi Kulonovog zakona) i kvantna (talasna funkcija zasnovana na Šredingerovoj jednačini). U vodi postoji 5 vrsta vodoničnih veza prema tome sa koliko se susednih molekula vode uspostavljaju ili između kojih atoma se uspostavljaju. Dužina vodonične veze se menja, grana a sama vodonična veza traje reda veličine pikosekunde dok se promene rasporeda elektrona i kvantni efekti koji utiču na vodoničnu vezu odvijaju u molekulu vode u toku femtosekunde. Trajanje i osobine vodonične veze zavise kako od termalnih efekata tako i od okolnih polja sila elektrostatičke, magnetne, raznih vrsta kovalentnih i

nekovalentnih veza, koja utiču kvantnomehanički i klasično pre svega na konfiguraciju i energetske nivoe valentnih elektrona. Sve te interakcije mogu da utiču na trajanje, položaj i dužinu vodonične veze da bi se uspostavile veze između susednih molekula čiji parametri teže uspostavljanju međusobnih odnosa u skladu sa pravilima zlatnog preseka ili ih narušavaju pod dejstvom tih istih polja sila. Na koji način te interakcije dovode atome molekula u takav položaj i kakva je uloga kvantno mehaničkih fenomena u ovom procesu. Eksperimentalno je moguće odrediti na pacovima, kao modelima koji su fiziološki dosta slični čoveku i lako se uzgajaju, kako različiti tipovi vode u zavisnosti od njihovih hemijskih sastava i strukturnih svojstava interreaguju sa tkivima, pre svega kožom, interakcijom sa biomolekulima njihovih biostruktura i njihovim metaboličkim procesima. Interesantna je dužina izlaganja pojedinim tipovima voda kao i embrionalni razvoj pod tim uslovima i reakcija različitih struktura vodoničnih veza (strukturiranost) molekula vode na biološke funkcije. Kod čoveka se isti efekti mogu lako pratiti na koži ljudi raznih dobi i pola koji su konzumirali razne tipove voda. Interesantno je kako biološke strukture reaguju na različite tipove voda u zavisnosti od starosti i pola ispitanika. Promene u koži bi se pratile skidanjem lepljivim flasterima sloj po sloj kože i metodama OMF i AMF bi se pratilo stanje vode u raznim slojevima kože i u kombinaciji sa električnom impedancom kože koja daje precizne podatke o stanju molekula vode u koži a samim tim i o biološkim strukturama. Dostupni su za istraživanje površinski slojevi kože naročito stratum corneum sa njegovim lipidno vodenim kompleksima, lamelama, stratumi granulozum, spinozum i bazale, koji su lako dostupni skidanjem lepljivim flasterima, dok je dublji dermis slabije dostupan za analiziranje.

3.6. Očekivani rezultati u istraživanju

Vode sa različitim strukturama: pojedinačnim molekulima, slučajnim asocijacijama i klasterima različitih veličina, pokazuje različite biološke efekte, bržu hidrataciju i bolju, uspešniju interakciju sa vezanom vodom bioloških struktura. Usled ovog procesa tkiva životinja i koža ljudi su bolje hidratirani

sadrže više vode, dok se odnos vezane i slobodne vode menja, tako da je sličan kod mlađih tkiva. Razviće se odvija drugačije kod jedinki koje konzumiraju razne tipova voda što je u vezi sa dinamikom stvaranja i razgradnje klastera vode što je praćeno promenom dijamagnetizma i paramagnetizma vode tj. njene organizacije i dinamike jonsko vodenog kompleksa. Organizacija molekula vode i različiti jonski kompleksi utiču na fiziološke funkcije organizma na molekularnom nivou jer su procesi hidratacije i dehidratacije suštinski ne samo za uspostavljanje odgovarajuće konformacije proteina nego i za njegovo održavanje. Različiti tipovi voda utiču na obrazovanje i funkcionisanje lipidno vodenog kompleksa tj lamelarnih membrana u stratum granulozum i corneum što utiče na njegovu funkciju pre svega TEWL kao i starenje kože. Postoji veza između dužine unošenja voda raznih struktura i odnosa paramagnetizma /dijamagnetizma u tkivima kože čoveka, pre svega ćelijama stratum granulozum i epidermalnoj komponenti lipidnih lamela i deskvamacija korneocita takođe zavise od dužine unosa voda raznih jonsko vodenih dinamika.

4. MATERIJAL

4.1. Demivoda (18.2 MΩ voda), česmovača i Zrenjaninska voda

U istraživanju su korišćene vode raznih vrsta mineralnih sastava, koncentracija mineralnih materija koje se nalaze u upotrebi u gradskim vodovodima Beograda na lokaciji Torlak, zatim voda iz Zrenjanina i 18.2 MΩ, voda prečišćena demineralizovana i klasterisana (izlagana magnetskim polima) voda poreklom iz centralnog vodovoda u Beogradu. Korišćena je nisko mineralna voda Zlatiborskih izvora kao vode iz prirode, sa prirodnom strukturom.

Molekul vode se sastoji od dva vodonikova atoma i jednog atoma kiseonika. Pri normalnim uslovima kod vode se tečna i gasna faza nalaze u dinamičkoj ravnoteži. Na sobnoj temperaturi voda je tečnost skoro bezbojna, bez ukusa i mirisa. Voda je univerzalni rastvarač i jedina je supstanca koja se u prirodi nalazi u sva tri agregatna stanja. Nesumnjivo najvažniji od svih oksida, a možda najvažniji od svih jedinjenja uopšte je voda.

Oblik molekula vode je nelinearan, u obliku je trougla, savijen, zato što dva ne vezujuća para elektrona ostaju bliže atomu kiseonika, ova naprezanja jače odbijaju vezujuće parove elektrona i guraju vodonikove atome bliže jedan drugom. Kao posledica ovih interakcija se ugao između H-O-H umesto pod uglom od 109° (koji se formira u čvrstom stanju) obrazuje pod uglom od 104.45° . Zbog velike razlike u elektronegativnosti između vodonika i kiseonika, molekul vode je izrazito dipolnog karaktera. Pozitivan kraj jedne molekule vode privlači negativan kraj druge, što posredstvom vodonične veze dovodi do asocijacije molekula i u tečnom i u čvrstom agregatnom stanju.

Molekula vode je visokosimetrična struktura, što svakako ima uticaja na njenu samoorganizaciju i formiranje klastera pa i na biološka svojstva.

Hemijski čista voda je mešavina izotopa, postoje dva stabilna izotopa vodonika ${}^1_1\text{H}$ i ${}^2_1\text{H}$, često se obeležava sa D, i kiseonika O^{16} i O^{18} koje dovode do kombinacija kao što su H_2O^{18} , HDO^{16} . Količine izotopa kiseonika i vodonika u vodi varira dovoljno od mesta do mesta i moguće je determinisati starost i izvor. U vodi dva vodonikova atoma sadrže protone čiji magnetni momenat može biti paralelan i antiparalelan što uzrokuje u orto i para vodi. Ove dve forme su u vodi prisutne u odnosu 3:1. Voda se formira od smese izotopa vodonika i kiseonika od kojih su neki ređi a neki češći, najrasprostranjeniji su: H_2^{16}O i H_2^{18}O . Molekuli vode sastavljeni od različitih izotopa kiseonika i vodonika poseduju različita svojstva u odnosu na najrasprostranjeniji izotop H_2^{16}O pa prema tome svojim prisustvom u biološkim sistemima ispoljavaju nepoželjne biološke efekte. Vodonična veza (H-veza) je vrsta slabe hemijske veze zasnovane na elektrostatičkom privlačenju između atoma vodonika i nekog nukleofilnog atoma koji sadrži slobodne elektronske parove. Vodonična veza u vodi je parcijalno (oko 90%) elektrostatička i delimično (oko 10%) kovalentna i može biti približno od veza sastavljenih od: kovalentnih $\text{HO}\cdots\text{OH}_2$, jonskih $\text{HO}^{\delta-}\cdots\text{H}^{\delta+}\cdots\text{O}^{\delta-}\text{H}_2$, i dugo vezanih kovalentnih veza $\text{HO}\cdots\text{H}\cdots\text{O}^+\text{H}_2$. Vodonične veze u kojim učestvuju sve molekularne orbitale uključujući unutrašnju $\text{O}1s$ orbitalu čija je veza 318 kJ mol^{-1} (3.3 eV) su manje jake, u tetraedralnoj vodoničnoj vezi glavne mase vode (bulk) tečne faze u poređenju sa gasnom fazom. Elektroni, između molekularnih orbitala (menjaju se sa lokalnom topologijom vodonične veze) sa različitim doprinosima, mogu se promeniti za manje od femto sekunde. Doprinos jačini vodonične veze vode su i nuklearni kvantni efekti (nulta tačka energije vibracije) čiji je uticaj na dužinu O-H kovalentne veze, duža je od ekvilibrijuma pozicije dužina.

Jačina vodonične veze zavisi od njene dužine i njenog ugla, sa većom jačinom vodonične veze u vodi nastaje sa protonom u sredini jon H_5O_2^+ sa jačinom veze od 120 kJ mol^{-1} . Međutim malo odstupanje u uglu veze (do 20°) ima relativno minoran efekat. Zavisnost od dužine veze je veoma važna i jačina veze eksponencijalno slabi sa dužinom. Vodonična veza se prekida kad je dužina veze veća od 0.31 nm ili ugao veze manji od 146° , mada izračunavanja ukazuju

da najveći deo energije vezivanja preostaje i uzrokuje mnogo savijanja, ali kraće veze mogu biti relativno jake. Vezivanja zavise od orijentacije i pozicije drugih vezanih i nevezanih atoma i "usamljenog" para elektrona.

Postoji razmena između jačina kovalentne i vodonične veze; kada jača $H\cdots O$ veza, slabi O-H kovalentna veza, i kraća $O\cdots O$ rastojanje. Slabljenje O-H kovalentne veze daje povišenje, kao dobar indikator, jačine energije vodonične veze, na primer kada je pritisak bitno uvećan preostale vodonične veze ($H\cdots O$) se prinudno skraćuju uzrokujući da se kovalentne veze O-H izdužuju. Jačina vodonične veze može biti pod uticajem elektromagnetnih i magnetnih polja.

Kooperativnost je fundamentalno svojstvo tečne vode gde su vodonične veze 250% jače nego pojedinačne vodonične veze u dimeru. Preraspodela elektrona prema tome rezultuje u oboje saradnji (primajući jednu vodoničnu vezu pomaže prihvatanje druge) i anti kooperativnost (prihvatajući jednu vodoničnu vezu sprečava prihvatanje druge) u vodoničnoj vezi koja se obrazuje u vodenoj mreži. Kooperativna vodonična veza uvećava O-H dužinu dok uzrokuje veće smanjenje razdaljina u $H\cdots O$ i $O\cdots O$. Stoga $O\cdots O$ rastojanje unutar klastera će verovatnije biti kraće na periferiji, što je u saglasnosti sa modelom ikosaedralnog klastera. Dužina vodonične veze u vodi varira sa temperaturom i pritiskom. Dužina kovalentne veze mnogo manje varira u zavisnosti od temperature i pritiska, a mnogo više od gustine vodoničnih veza. Kako jačina vodonične veze zavisi skoro linearno od njihove dužine (manja dužina daje jaču vodoničnu vezu) ovo takođe skoro linearno zavisi (pod ekstremnim uslovima) na povećanoj temperaturi i pritisku. Tečna voda se sastoji od mešavine kratkih, pravih i jakih vodoničnih veza i dugačkih slabih i izvijenih vodoničnih veza sa mnogo prelaza između ovih ekstremnih stanja. U strukturi tečne vode ova rastojanja i njihove varijacije rastu sa temperaturom.

Vodonične veze se račvaju (kad su oba vodonikova atoma jedne molekule vode povezani vodoničnim vezama, ili jedan vodonikov atom istovremeno formira vodoničnu vezu sa druga dva molekula vode) kad poseduju manje od pola snage normalne vodonične veze (veza se popola razdvaja) i poseduje malu

energiju za preuređenje vodonične veze. Bilo kakva nužna rotacija može takođe izazvati savijanje ili istežanje drugih vodoničnih veza. Račvanje vodoničnih veza ne uzrokuje raskidanje mreže molekula vode i jedino se dešava kad se prekinuta vodonična veza oslobađa a usamljen par prihvata dolazeću vodoničnu vezu donora. Grananje na tri dela vodonične veze (kada jedan vodonikov atom formira istovremeno vodoničnu vezu sa tri molekula vode formirajući lik tetraedra) ima samo jednu šestinu snage normalne vodonične veze po svakoj trećini račvaste vodonične veze.

Vodonična veza traje 1 - 20 ps dok je vreme raskidanja oko 0.1 ps sa "klimanjem", vodonična veza postoji duže od jedne pikosekunde što je beznačajano. Raskidana veza je u osnovi nestabilna i verovatno će se reformisati da bi obrazovala drugu vodoničnu vezu pogotovo ako druge tri veze još postoje, raskidanje vodonične veze postaje mnogo nezavisnije od lokalne strukture a više zavisi od trenutne snage vodonične veze. Ako se ne prekine vodonična veza obično dovede do rotacije oko jedne od preostalih vodoničnih veza i nije za dalje premeštanje kao rezultat čega nastaje hidroksilna grupa i vodonikov jon i oba su reaktivna. Gubitak vodonične veze izaziva preuređivanje elektronskog oblaka bez promene ugla u O-H...O položaju atoma.

Molekuli H₂O, zahvaljujući neravnomernom rasporedu električnog naelektrisanja po svom obimu su sposobni da se međusobno privlače i obrazuju haotične rojevite strukture i uređene "vodene kristale" klastere. Veze u takvim asocijacijama su vodonične. Ona je jako slaba, lako razrušiva, za razliku od kovalentne veze. Slobodni nevezani u asocijaciji molekuli H₂O su prisutni samo u vrlo maloj količini. Voda je više nalik na "gel" sastavljen od pojedinačnih, ogromnih klastera vezanih vodoničnim vezama. Njihovo postojanje je u vremenskom rasponu 10⁻¹²-10⁻⁹ sec, rotacija i druga termalna kretanja uzrokuju raskidanje pojedinačnih vodoničnih veza i ponovno formiranje nove konfiguracije koje su uvek promenljive. Klasteri mogu imati najraznovrsnije oblike, u osnovi građe je tetraedar, a baš takav oblik poseduje raspored pozitivnih i negativnih naelektrisanja u molekuli vode. Grupišući se tetraedri molekula vode obrazuju razne trodimenzionalne strukture. Molekuli vode su

podvrgnuti brzom termalnom kretanju tokom kratkog vremena, tako da je trajanje bilo koje specifične konfiguracije klastera prolaznog karaktera, samo oko nekoliko ps do nekoliko ns. Tečna voda se može zamisliti i kao kipuća masa molekula vode u kojoj se klasteri, koji su formirani vodoničnim vezama, stvaraju, nezavisno raskidaju i ponovno formiraju.

Brojne promene u strukturi vode se dešavaju sa porastom temperature. Kad molekuli vode dobiju energiju, kojom se uzrokuje krivljenje i kidanje vodoničnih veza usled njihove složene prirode oko molekula vode, centralni molekuli u klasteru su podesni za obnavljanje nepromenjene vodonična veze, posle raskidanja perifernih molekula čime će biti izgubljen za drugi klaster, manje strukturisan sa spoljašnje i unutrašnje strane. Podizanjem temperature, veličina poređanih klastera opada, broj malih klastera raste, broj vodoničnih veza opada, a prosečna daljina između dva molekula se povećava. Postoji uvek dovoljno vodoničnih veza, međutim verovatnije je da će skoro sve molekule biti povezane za skoro sve ostale u najmanje jedan ceo lanac vodoničnih veza. Neke vodonične veze, reda veličine 1-2 vodonične veze po molekuli su zavisne od gustine.

Zrenjaninska voda, zabranjena za piće i kuvanje zbog hemijske neispravnosti, kao i vode iz Srednjeg Banata, se eksplatiše iz podzemnih ležišta arterskim bunarima i bez ikakvog procesa prečišćavanja uz dezinfekciju hlornim preparatima, distribuira zastarelim vodovodom do domaćinstava. Poreklo pijaće vode koja je iz drugog i trećeg vodonosnog sloja, sa dubina od oko 60-130 m. Vode sa ovog područja imaju žutu boju, sadrže povećane količine gvožđa, amonijaka i rastvorenih organskih i neorganskih materija što se dokazuje reakcijom utroška $KMnO_4$, a u mnogim uzorcima je sadržaj hlorida i ostatak isparenja visok. Analizama rađenim 1991 godine u vodi izvorišta centralnog vodovoda grada Zrenjanina nađene su povećane količine arsena trihalometana, fenola i tragova pesticida. Prilog tabele (19) i (20). Zbog visokih vrednosti gvožđa i amonijaka postupak dezinfekcije se vrši veoma otežano jer ovi elementi vezuju veliki deo rezidualnog hlora koji treba da obezbedi dezinfekciju do konačnog mesta distribucije. Najčešći razlozi fizičko hemijske

neispravnosti vode za piće ovog regiona su neodgovarajuće organoleptičke osobine (boja i mutnoća), velika količina amonijaka i organskih (oksidabilnih) materija u vodi za piće, kao i nedozvoljena koncentracija arsena koji je toksičan element, svrstan u prvu grupu kancerogena. Fizičko hemijske osobine tla, karakteristični redukcionni uslovi podzemnih slojeva pogoduju prelasku arsena u vodu, navedeni uslovi, kao i njegovu biokinetiku u organizmu. Podaci o hemijskom sastavu Zrenjaninske vode su pretstavljeni u prilogu tabela (19) koju je radio Zavod za javno zdravlje Zrenjanin, centar za higijenu i humanu ekologiju. U trećini uzoraka voda koje su ispitivane na području srednjeg Banata je nađena bakteriološka neispravnost. Kao dominantan uzrok bakteriološke neispravnosti javlja se povećan broj bakterija saprofita (aerobnih mezofilnih bakterija), zatim bakterije-indikator, kao što su: Pseudomonas, Proteus, Streptokokus, termotolerantne koliformne bakterije dok su ostale koliformne bakterije sulfitoredujuće klostridije treći i četvrti po učestalosti uzrok bakteriološke neispravnosti.

Voda za piće centralnog vodovoda Zrenjanina ne odgovara za piće zbog povećane potrošnje KMnO_4 koncentracije amonijaka, nitrita, ortofosfata, rezidualnog hlora gvožđa i zbog većeg intenziteta boje. Ostale analize uzoraka vode su sličnih vrednosti u gradskom i seoskim vodovodima. Rađene su detaljnije analize za potrebe Zrenjaninskog vodovoda u Institutu za vode Karsrue na izvorištu su uzimani uzorci koji su dali detaljan uvid u hemijski sastav Zrenjaninske vode. Prilog tabela (20). Naročito su interesantni podaci o organskim jedinjenjima u malim koncentracijama, iako su bez maksimalno dozvoljenih vrednosti, koji svojim prisustvom deluju na fizologiju organizma i na strukturisanost vode. Značajno je prisustvo organohlorinih jedinjenja kao i sintetičkih kompleksa i pesticida koji pored fiziološkog dejstva na organizam poseduju neistražen uticaj na osobine vode. Prilog tabela (20).

Voda u delu grada Beograda koji se naziva Voždovac, gde su u institutu Torlak rađeni eksperimenti na pacovima koristi se centralni tip vodovoda sa vodom koja zadovoljava mikrobiološke i hemijske standarde, čiji su osnovni hemijski parametri prikazani u prilogu tabela (21) Ova voda je korišćena u

eksperimentima sa pacovima i uglavnom je u zadovoljavajućim granicama osim nešto povišenog sadržaja mangana i nitrita.

Akvafotomiks Zrenjaninske i Beogradske vode pokazuje spektre čije informacije ukazuju da se interakcija molekula vode sa rastvorcima ova dva tipa voda razlikuju što je posledica interakcije molekula rastvoraka sa molekulima vode i interakcije sa mrežom vodoničnih veza molekula vode akvagrami (7) i (9). OMF spektri ispitivanih voda: demitabela (42), Beogradske (tabela 43) i Zrenjaninske (tabela 44) pokazuju različitu paramagnetsku /dijamagnetsku aktivnost, pikove različitih veličina na različitim talasnim dužinama što kao i akvafotomiks ukazuje na različite interakcije vode sa rastvorcima naročito jonima tj. na različite vrste vodoničnih veza, hidratacione omotače kao i njihovu stabilnost, različite vrste klastera i njihove osobine.

4.2. Pacovi i njihovo potomstvo

U eksperimentima su korišćeni laboratorijski pacovi vrste *Rattus norvegicus*, aguti soj, linije DA kao model za istraživanje uticaja voda različitih struktura na organizam. Aguti gen kod pacova poseduje dva alela, (a) neaguti i (A) aguti. Pacovi sa aguti alelom (A) su sa žuto-crvenim i crnim pigmentom. Aguti gen takođe učestvuje i na ponašanje, neaguti (a) alel utiče na poslušno ponašanje u odnosu na aguti (A) alel. Aguti pigment zaustavlja MSH. (melanocitni stimulirajući hormon) ne stimulirani melanociti produkuju žuto crvenkasti pigment. MSH je u familiji melanokortina nalazi se i u mozgu, moćan je neuromodulator. Uticaj na ponašanje se ogleda posredstvom neurokortinskih receptora. Aguti i ne aguti životinje poseduju različite profile kateholamina. Kateholamini (kao dopamin i noradrenalin) neurotransmiteri koji aktiviraju telo i pripremaju ga za stres. Aguti protein utiče na distribuciju kateholamina u mozgu i zato mogu uticati na poslušnost životinje. Ne aguti životinje poseduju manje nadbubrežne žlezde, za razliku od aguti, koje produkuju adrenalin i hormone stresa. Dlaka aguti pacova sadrži dve vrste melanina, svetlo crvenkasto-žuti pigment i tamno braon-crni pigment. Relativan odnos ova dva

tipa melanina je pod kontrolom hormona MCH. Ovi pigmenti se proizvode u melanocitima koji se nalaze u bazalnom sloju ćelija bulbusa folikula dlake. Aguti protein koči sintezu MCH koji stimulise proizvodnju ćelija koji proizvode pigment. Nestimulisane pigmentne ćelije proizvode crvenkasto-žuti pigment. (Lu et al. 1994, Willard et al. 1995)

Norveški pacov kako se obično zove, je čest u ljudskoj populaciji i neophodan je u laboratorijskim ispitivanjima (odmah posle miševa) u medicini, farmaciji, kozmetici i uopšte u svim oblastima istraživanja kao i prehrambenim, genetskim istraživanjima i u ekologiji. U istraživanjima se koriste razni sojevi pacova *Rattus norvegicus* zbog jednostavnosti uzgajanja, sklonosti raznovrsnoj ishrani, svoje pogodnosti za različite dizajne eksperimenata, male cene koštanja, velike plodnosti, blage naravi, lakoće rukovanja, kratkog perioda gastracije, inteligencije, dostupnosti i velike sličnosti sa fiziologijom čoveka. Godinama mnogi istraživači u različitim oblastima istraživanja su stvorili više od 234 inbrid soja za proučavanje poremećaja od hipertenzije do uroloških defekata. Laboratorijski pacov (*Rattus norvegicus*) je neophodan alat u eksperimentalnoj medicini i farmaciji i dao je veliki doprinos ljudskom zdravlju. Sekvenca genoma pacova je treća kompletna sekvenca sisara koja je dešifrovana. Poređenje ova tri genoma rešavaju detalje evolucije sisara. Ova analiza obuhvata gene, proteine i njihove odnose prema bolestima ljudi, sekvence koje se ponavljaju, uporedne, na nivou genoma, studije ortologih regiona sisarskih hromozoma i tačke preuređivanja, rekonstrukcija kariotipa predaka i događaja koji su doveli do postojećih vrsta, stope varijacija i za rod specifični i od roda nezavisni evolucionni događaji kao širenje familija gena, ortologni odnosi i evolucija proteina. Genom pacova je 2.75 Gb veličine, sličan je ljudskom 2.9 Gb i kodiraju sličan broj gena, veći je od genoma miša 2.6 Gb. Diploidni broj hromozoma pacova je 42 hromosoma. Ljudski geni povezani sa bolestima su ortologni sa genima pacova. Oko 40% gena pacova su ortologni sa ljudskim. (Kim Preethi 2006.) Pacovi su 1895 god korišćeni za proučavanje efekata ishrane, toksikologije i drugih fizioloških kao i biohemijskih istraživanja. Tokom narednih godina, pacovi su se koristili u mnogim istraživanjima koja su

doprinela našem razumevanju genetike, bolesti, uticaja lekova, i ostalih oblasti koji su doprineli velikoj koristi za zdravlje i dobrobit čovečanstva.

Napredak u razumevanju patofiziologije i lečenju srčanih insuficijencija ne bi bio moguć bez pacova kao životinjskih modela srčanih bolesti i hipertrofije. Upotreba pacova kao životinjskog modela za gojaznost, dijabetes ili oba stanja, u kombinaciji sa drugim faktorima rizika razjašnjavaju kako svaka komponenta doprinosi kardiovaskularnoj bolesti. Podaci istraživanja na pacovima ukazuju da specifične kardiomiopatije kod pacova nisu povezane sa bolešću koronalnih arterija što bi moglo objasniti povećanu smrtnost i stopu slepila kod dijabetičara. (Crepaldi i Nosandini, 1988.) Pacovi su primarni animalni model koji se koristi u toksikološkim istraživanjima. Uprkos popularnosti ovog postupka postoji čitav niz sumnji o adekvatnosti pacova za ispitivanje promena u toksikološkim reakcijama tokom različitih faza života. Savremena istraživanja ukazuju da pacovi predstavljaju dobar model za toksikološka ispitivanja tokom embrionalnog razvoja. Međutim stariji pacovi često imaju spontane degeneracije bubrega usled hronične progresivne nefropatije, što ih čini lošim modelom za proučavanje odgovora bubrega na ksenobionte.

Laboratorijski pacovi su se takođe pokazali uspešnim u proučavanju učenja i drugih mentalnih procesa. Istraživanja su pokazala da pacovi poseduju metakogniciju, mentalnu sposobnost prethodno nađenu kod ljudi i nekih primata. (Foote Jonathon 2007.) Pacovi su najbolji životinjski model za proučavanje određenih ljudskih bolesti i stanja, uključujući gubitak pamćenja, mišićne distrofije, cistične fibroze, raka, AIDSa, bolesti zavisnosti, genetskih bolesti, povreda kičmene moždine i bolesti srca. Pacovi se koriste u istraživanju bolesti kao što su Alchajmerova bolest, šećerna bolest i Parkinsonova bolest. Adrenokortikotropin pacova je imunološki i biološki veoma sličan ljudskom, fiziološki mehanizam stresa je veoma sličan kod ove dve vrste. Pacovi obezbeđuju izvanredan i reproducibilni sistem u kojem se istražuje pad kognitivnih funkcija povezan sa starenjem. Postoji iznenađujuća sličnost između

pacova i čoveka u anatomiji mozga uključujući i to da su delimično osetljivi na pad kognitivnih funkcija tokom starenja

Za ekstrapolaciju eksperimentalnih podataka dobijenih od pacova na ljude važno je znati sličnost i razlike između pacova i ljudi. Postoje zanimljive sličnosti u subcelularnoj distribuciji azot monoksid sinteze između tkiva čoveka i pacova. Aktivnost azot monoksid sinteze je u vagini čoveka i pacova znatno viša nego u miometriju. U trudnoći se odvija pad regulacije aktivnosti azot monoksid sinteze u miometriju čoveka i pacova. Pacovi kao životinjski modeli su korišćeni u istraživanju učešća epitelnih pukotinastih spojnica u patogenezi disajnih puteva čoveka. Morfologija pukotinastih spojnica ove dve vrste je poređena sa obzirom na dubinu spojnica, broj lanaca i kompleksnost spojnica. Osnovni arhitektonski aranžman pukotinastih spojnica u obe vrste je sličan, međutim, pukotinaste spojnice u tkivu pacova su bile malo dublje, sa manje lanaca i imali su manje interkonekcija sa susednim strukturama u poređenju sa onima kod čoveka. Broj lanaca po interkonekciji je sličan kod obe vrste. Uprkos opštoj sličnosti pukotinastih spojnica epitelnih ćelija disajnih puteva pacova i čoveka, postoje specifični kvalitativni detalji morfologije koji moraju biti razmotreni u pokušaju ekstrapolacije rezultata istraživanja propustljivosti epitela disajnih puteva sprovedenih na pacovima u odnosu na čoveka.

Postoji nekoliko sličnosti između sistema organa za varenje pacova i čoveka, kao što su lokacija i funkcija. Digestivan trakt pacova je toliko sličan ljudskom da je moguće tvrditi da funkcionišu na sličan način. Pacovi i čovek su omnivore, jedu meso i biljke. Velika je razlika što sekutići pacova nastavljaju da rastu do kraja života, dok kod čoveka prestaju sa rastom nakon dostizanja određenog stadijuma. Druga velika razlika je probavni kanal, pacovi nemaju žučnu kesu, umesto nje imaju žučni kanal koji formiraju nekoliko cevčica jetre. Pacovi su skloni da se hrane tokom čitavog dana jer ne poseduju gene koji kontrolišu osećaj gladi. Kada hrana kod pacova uđe u cekum onda se apsorbuje, ali za razliku od čoveka na kraju cekuma pacovi nemaju slepo crevo i takođe nemaju crevne resice. Pacov kao model je ekstremno važan, posebno kad se

malo zna o osnovi ljudskih bolesti i stanja jer mogu da obezbede uvid u klinički relevantni put, kao indentifikacija leptina u životinjskom modelu gojaznosti.

Pacov je pogodan model za istraživanje histoloških promena povezanih sa starenjem kože i mehanizmom stvaranja bora. Na modelu Ishibashi pacova, dobijenih ukrštanjem Wistar i divljih pacova, proučavane su promene makromolekularnih komponenti vezivnog tkiva kože u toku prirodnog starenja koje nastupa posle 12. nedelje života u vidu boranja i brazdanja kože. Naj upadljivije su promene zabeležene u sadržaju i kvalitetu elastinskih vlakana – smanjenje izodezmozina i intaktnih elastinskih molekula sa povećanjem koncentracije elastinskih fragmenata. Autori su zaključili da je proces starenja u koži ovih pacova posledica smanjenja sadržaja elastina, njihove pojačane degradacije i lakog smanjenja sadržaja kolagena. (Sakuraoka 1996 g.)

Pacovi su prosečno teški 140-500 g, dužine prosečno 400 mm od nosa do repa. Mužjaci su obično veći od ženki. Kod ovih životinja uši i rep su goli a rep je kraći od dužine tela. Uši Norveškog pacova su upadljivo kraće nego kod ostalih vrsta pacova i ne pokrivaju oči kad se povuku nadole. Pacovi su društvene životinje sa poliginandros sistemom parenja teže da se uzgajaju u velikim grupama. Kada ženka uđe u šestočasovnu fazu estrusa može da se pari više puta sa više mužjaka. Prosečna ženka je u stanju da rađa 7 puta godišnje. Oko 18 dana posle koćenja ženke ulaze u postpartum estrus i ponovo se pare, tako da mogu da okote 60 mladunaca godišnje. Stadijumi estralnog ciklusa se odlikuju velikom regularnošću. Estralni ciklus čine pet faza od kojih svaka traje jedan dan osim estrusa koji traje manje od jedan dan (šest sati) Broj novorođenčadi može biti 2-14 prosečno 8. Trajanje bremenitosti raličitih linija pacova varira (20-26 dana) i prosečno je oko 22 dana. Veličina spontane embrionalne smrti obično ne premašuje 15%, pri čemu 10% embriona umire do implatacije i 5% na kasnijim stadijumima embrionalnog razvoja. Pacovi se rađaju goli i slepi, kao i miševi, težine 2.5-3g. Temperatura tela kod njih je nepostojana. Sekutići se pojavljuju 8 mog dana, 9-12 dana se pokrivaju dlakom, a 14-17 dana otvaraju oči. Odvikavaju se od dojenja nakon 3-4 nedelje. Krajem ovog perioda se mladunci obično odvajaju od majki u specijalnom većem kavezu za mladunčad.

U uzrastu od 1,5 meseca se ženke odvajaju od mužjaka i uzgajaju odvojeno. Mladi su prosečno teški 5g. (Parker 1990.) Mladunci postaju nezavisni nakon 4 do 5 nedelja a reproduktivno sazrevaju oko 3. meseca mužjaci a ženke oko 4. meseca.

Pacovi su se uzgajali u suvoj ocednoj prostoriji sa dobrim prirodnim i veštačkim osvetljenjem i prinudnom ventilacijom. Temperatura se nalazila u granicama 20-22 °C pri vlažnosti od oko 50%. Pored osnovnog smeštaja koji je 60 m² (zapremina 180 m³) na 400 ženki i 80 mužjaka, postoji posebna karantinska prostorija za nove životinje, za posude za umivanje, kaveze i za hranu. Pacovi su držani u metalnim kavezima sa razmerama 50x30x30 cm. Kavez je predviđen za najviše 5 ženki a u njima su smešteni 1 mužjak i jedna ženka a kasnije njihovo potomstvo. Svaki kavez je snabdeven podmetačem, automatskom hranilicom i pojilicom. Pacovi su se prenosili iz jednog u drugi kavez kad su se odvajali mužjaci od ženki i ženke od mladunčadi. Dnevne potrebe za hranom odraslog pacova su prosečno 30-32 g. Za ishranu pacova se upotrebljavala briketirana hrana, koja je sadržala neophodne proporcije proteina, masti, ugljenih hidrata i vitamina, soli i mikroelemenata. Pacovi postaju polno zreli u 8-9 nedelji, poliestralne su životinje sa spontanom ovulacijom, koja se regularno ponavlja svakih 4-5 dana.

Na početku eksperimenta su izdvojeni u posebnih šest kaveza po jedan mlad mužjak i ženka koji do tada nisu sparivani. Uzgajani su pod istim uslovima jedino su konzumirali različite tipove voda koje su im bile uvek na raspolaganju. I grupa je konzumirala obogaćenu vodu 1. II grupa je konzumirala obogaćenu vodu + NaCl. III grupa je pila vodu sa hidrolizovanim ugljeničnim nanomaterijalima. Sve ove vode su bile klasterisane, izlagane magnetnim poljima koji su omogućili njihovo klasterisanje a razlikuju se samo po jonskom sastavu koji omogućuje duže vreme trajanja klastera, dužu ili kraću stabilizaciju, sve ove vode su u početku bile 18.2 MΩ. IV grupa je pila vodu koja je doneta sa izvora na Zlatiboru. V grupa je pila vodu iz vodovoda kojim se snabdeva institut Torlak. VI grupa je konzumirala vodu iz Zrenjanina koja je zabranjena za piće i

kuvanje. Pacovi prosečno konzumiraju 10-12 ml/100g/dan što je po jedinki oko 60 ml/dan. (Parker, 1990)

Pacovi su nejednako pili različite vrste voda u zavisnosti od njihovog hemijskog sastava i njene strukturisanosti. Uočeno je neujednačeno konzumiranje vode tokom eksperimenta a pacovi su preferirali iste tipove voda, verovatno su neke vode u većoj količini omogućivale hidrataciju, dok su druge pre svega obogaćene sa manjom količinom rastvoraka omogućavale hidrataciju, pa su u manjoj količini zadovoljavali životinje. U tabeli (6) su pretstavljeni podaci o konzumiranju vode različitih tipova tokom boravka životinja zajedno u kavezima. Odstupanja su značajna, prva tri oplemenjena tipa voda su konzumirana manje nego vode koje se upotrebljavaju za piće, voda iz Zlatibora, dozvoljena za piće, je više konzumirana i od Zrenjaninske koja je zvanično zabranjena.

Tabela 6. ♂i♀ 16 dana / po danu pili vode

I	II	III	IV	V	VI
19,01	17,41	18,79	20,08	19,55	19,64

Mušjaci su tokom eksperimenta nakon 16 dana odvojeni od ženki u posebne kaveze i nastavili da piju isti tip voda ali u znatno većoj količini uz veće razlike u količini konzumirane vode ali preferiraju iste vode kao i kad su bili sa ženkama. Iz tabele (7) se vidi da je potrošnja na 100g telesne težine u III kavezu najveća, što znači da struktura vode nije stabilisana pa pacov pije nestrukturisanu vodu

Tabela 7. ♂ sami 29 dana /danu i / 100g t.t. na početku i krajem 16 dana pili vode.

I	II	III	IV	V	VI
24,90	24,75	26,97	28,37	27,26	27,88
10,85/100g	11,67/100g	13,02/100g	13,01/100g	11,64/100g	12,67/100g
10,82/100g	11,14	12,66	12,38	11,31	12,67

Pacovi su za 16 dana dobili na težini pa su na kraju ovog dela eksperimenata vrednosti konzumirane vode po 100g težine drugačiji, prikazano u tabeli (8). Vrednosti su bliže podacima iz literature o konzumiranju vode na 100g telesne težine. Od oplemenjenih voda samo voda iz III kaveza zahteva veću

upotrebu za adekvatnu hidrataciju. Voda iz Zrenjaninskog vodovoda je pored oplemenjene vode iz III kaveza pokazala najlošiju hidrataciju, najviše je potrebno da se ugasi žeđ životinje.

Tabela 8. ♀ posle odvajanja od ♂, porađaju se posle 25 dana od početka eksperimenta i 9 dana posle odvajanja od ♂, nastavlja se uzgajanje ♀ sa mladuncima još 20 dana. Merenje potrošnje vode traje ukupno 29 dana, samo skotne ženke, a ženke i mladunci 20 dana.

I	II	III	IV	V1	V2	VI
279,1mm	322,35	419	427,5	372,85	372,85	378,5
398,71ml	460,50ml	598,57ml	610,71ml	90,71ml	155ml	540,71ml
13,74ml	15,87ml	20,64ml	21,05ml	17,75+11,33ml	17,75+19,37mlk	18,64ml
potomaka	2	6	7	0	9	2

V grupa potrošila za 23 dana 372.85ml, zatim je dodata još 1 ženka koja je pila istu vodu i odgajane su posebno 8 dana. U različitim kavezima je bio različit broj potomaka U I nije bilo potomaka, u II su bili 1 muški i jedan ženski potomak. U III grupi je bilo 3 mužjaka i tri ženke, u IV grupi je bilo 5 ženki i 2 mužjaka, u V grupi je okoćeno 4 ženki i 5 muških mladunaca. Dok je u VI grupi bilo 1 ženka i 1 mužjak

Zbog različitog broja potomaka po leglu je nejasna potrošnja po leglu odnosno tipu vode koji su životinje konzumirale. Potrebe za vodom su očito povećanje u skotnosti i laktaciji. Primetno je znatno više pijenje vode u VI grupi u odnosu na II grupu koja je pila oplemenjenu vodu sa dodatkom NaCl što se vidi u tabeli (9). Ženke su sa mladuncima odgajane još 10 dana zajedno sa zabeleženom potrošnjom vode posle prekida dojenja.

Tabela 9. pijenje vode posle prestanka laktacije ženki i mladunaca zajedno.

I	II	III	IV	V1	V2	VI
57,5mm	99	210	262	71	214,5	94
82,14ml	141,42ml	300ml	374,28ml	101,42ml	306ml	134,28ml
8,21	14,14	30	37,42	10,14	30,6	13,4

Pošto je različit broj jedinki po leglu, pijenje vode po leglu je krajnje različito od ranijih potrošnja. Naj upadljivija je velika količina popijene vode u III grupi i mala količina popijene vode u VI grupi sa Zrenjaninskom vodom.

U narednih 9 dana nakon odvajanja od majki praćena je potrošnja vode u kavezima sa posebno majkama i razdvojenim potomstvom po polu. Potrošnja vode u kavezima je različita kod majki i mladih potomaka. Ostaje karakteristična razlika u potrošnji vode ako se porede posebno majke i posebno potomci koji imaju brži metabolizam. Naj karakterističnija je i dalje značajna razlika u konzumiranju vode između majki I i VI kaveza tj koje su pile oplemenjenu vodu i Zrenjaninsku vodu. Generalno red konzumiranja vode je isti s time da je drastično manje konzumiranje u III grupi jedinki što se vidi iz tabele (10).

Tabela 10. Potrošnja vode nakon 9 dana od odvajanja majki i potomaka.

I♀m	II♀m	II1♂p	II1♀p	III♀m	III3♀p	III3♂p	IV♀m	IV5♀p	IV2♂p
10,31	11,03	19,20	21,98	15,71	7,76	10,95	12,61	6,57	8,73
V2♀m	V4♀p		V5♂p		VI♀m	VI1♂p			
8,61	7,51		8,53		13,96	23,69			

Merenje potrošnje vode je nastavljeno još narednih 9 dana. Primećena je veća potrošnja vode po jedinki što je prikazano u tabeli (11). Razlike u konzumiranju vode su kao i na početku eksperimenta kod mužjaka ali kao i u prethodnoj tabeli primećeno je znatno manje konzumiranje kod potomaka IV i V grupe.

Tabela 11. Potrošnja vode nakon narednih devet dana tj. ukupno 18 dana od odvajanja od majki dnevno.

I♀m	II♀m	II1♂p	II1♀p	III♀m	III3♀p	III3♂p	IV♀m	IV5♀p	IV2♂p
14,92	15,71	23,33	21,38	21,26	12,27	14,33	29,36	14,92	21,34
V2♀m		V4♀p		V5♂p		VI♀m	VI1♂p		
14,92		7.737,73		7,967.96		20,63	26.192		

Razlike u konzumiranju voda različitih tipova su značajne i zavise od mineralnog sastava odnosno od strukturisanosti kao i perioda u razviću, pola i genetske konstitucije. Oplemenjene vode u zavisnosti od dodatih mineralnih

materija se u manjoj meri piju u odnosu na različite vode iz vodovoda, gde je najveća potrošnja vode iz Zrenjanina, koja pored zabrane za upotrebu zbog hemijskog sastava pokazuje i lošije strukturne osobine mada ne mnogo slabije od ostalih vodovodskih voda čija je upotreba dozvoljena.

4.3. Humana koža

Pokrovni sistem čoveka je pravi naziv kompleksne strukture u čiji sastav ulazi koža sa pridruženim strukturama. U pridružene strukture spadaju:

1. Epitelijalni sastav,
2. Mezenhim,
3. Žlezdane strukture (znojne, lojne i mlečne žlezde),
4. Rožaste strukture (nokti, vlasi i mišićno tkivo koje je funkcionalno pridruženo dlakama)
5. Neurovaskularni sastav.

Pokrovni sistem, čija lokacija i funkcija predstavlja barijerni sistem, funkcioniše u oba smera: ka spoljašnosti, štite telo od gubitaka materije i zračenja, ali i ka unutrašnjosti, zadržavajući u sebi kako infektivne agense, tako i životno podržavajuće zalihe krvi i vode. Tako je koži povereno obavljanje brojnih, izrazito raznorodnih, funkcija, od obezbeđenja fizičke, hemijske i imunološke zaštite, preko prijema i sprovođenja čulnih nadražaja, sve do regulacije toplotnog i metaboličkog statusa, funkcije depoa krvi i vode itd. Struktura kože, sa aspekta sistema, je zadužena da omogući obavljanje svih vitalnih funkcija među koje ubrajamo:

1. Barijerna: zaštita od mehaničkih štetnih dejstava i povreda.
2. Neuro-perceptivna: čulno informisanje o stanju okoline.
3. Metabolička: sprečavanje gubitka telesnih tečnosti i formiranje depoa krvi i vode; fotohemijska faza sinteze holekalciferola, itd.
4. Imunološka: zaštita tela od spoljašnjih bioloških i hemijskih agenasa.
5. Termo-regulativna: pomoćni sistem upravljanja telesnom temperaturom.

6. Proliferativna: stanište kolonija matičnih ćelija.
7. Hormonalna: sinteza androgena i sprega adipocitnog leptina, insulina i hipotalamusa u regulaciji metabolizma.
8. Neuro-endokrina: veza sa centralnim neuroendokrinim sistemom preko keratinocitne i melanocitne ekspresije receptora za neuropeptide i neurotransmitere.
9. Anti-onkogena: smanjenje uticaja ultraljubičastog zračenja kroz apsorpciju putem melanina. (Chuong 2002.)

Koža pripada grupi epitelnih tkiva koje karakteriše gust, zbijen, raspored ćelija (sa malom količinom cementne supstance), koje su slojevito raspoređene i koje oblažu površinu tela i organa ili se nalaze u unutrašnjosti boraveći u masi (kakav je slučaj u žlezdanim strukturama). Kao podvrsta epitelnih tkiva, koža pripada klasi stratifikovanih tkiva. Ćelije kože imaju skvamoznu geometriju, kod koje je visina manja od širine i varira od bazalnih slojeva (višeg stepena nepravilnosti, sa stubastom i poligonalnom građom) ka površinskim slojevima (pretežno pločaste građe). Ova vrsta epitela može da orožnava te se dodatno opisuje kao keratinizirajući epitel. Kao epitelno stratifikovano skvamozno keratinizirajuće tkivo, koža, specifičnost svoje strukture i funkcije duguje slojevitosti i raznolikosti njene građe koja se, osim kroz dva glavna strukturalna sloja epidermis i dermis, ogleda i kroz brojne ćelijske vrste i strukture koje na svojstven način doprinose jedinstvenosti njenog funkcionisanja. (Uitto 1989.) Osim toga, varijacije u anatomskim karakteristikama su izražene i na različitim regijama tela, tako da na dlanovima i tabanima imamo zadebljani epidermis (u poređenju sa kožom kapaka) dok na regiji epitela usana imamo odsustvo dlakinih folikula (što je suprotno regiji glave sa gusto raspoređenom folikularnom komponentom). Stoga je koža visoko specijalizovan i pedantno upravljani sistem koji nastanjuju brojne različite ćelijske vrste koje na svojstven način doprinose mnogostrukosti njenih funkcija.

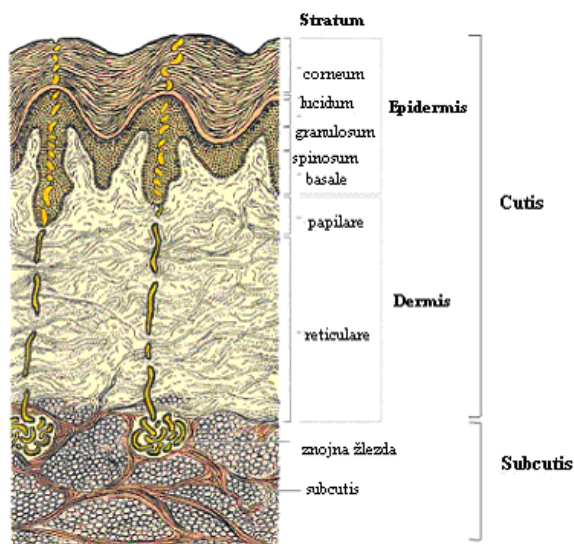
Ljudska koža je barijera između unutrašnje sredine organizma i njegove okoline. Sa površinom 1.15-1.8 m² je najveći organ. Na površini kože nalaze se

nabori i jarci razne veličine, a dele se u crteže koji nastaju zbog same građe kože i u crteže nastale kretanjem zglobova, kao i kontrakcijama mišića u koži samoj ili ispod nje. Strukturni crtež posebno je istaknut na dlanovima, tabanima i jabučicama prstiju u obliku virova, omči i lukova, taj crtež je individualno različit i ne menja se do smrti. Osim toga, postoji i površinski crtež, sastavljen od trouglastih i četvorouglastih plitkih jaraka, ovima još pridolaze ušća folikula dlaka i pora. Grubi nabori kože uslovljeni su kretanjem zglobova i kontrakcijama muskulature. Linije cepanja kože nastaju jer se koža u jednome smjeru jače rasteže nego u smeru okomitom na nju a to je uzrokovano time što vezivna vlakna koja stvaraju između sebe romboidne šupljine daju veći otpor prema rastezanju nego ona koja su položena uspravno na njih. Ako se na koži izdube rupice, one će se produžiti u jednom smeru kao pukotine, a kad se ti rascepi produže u tome smeru, dobijaju se Langerove linije cepanja kože. One teku na trupu i vratu cirkularno, a na ekstremitetima uglavnom uzdužno.

Koža se sastoji iz tri posebna sloja što je pretstavljeno na slici 1: coriuma cutisa i subcutisa koji formiraju glavninu kože, sastoje se od elemenata vezivnog tkiva odnosno masnog tkiva, vodi poreklo od ektoderma, a kržno i potkožno vezivno tkivo od mezoderma. Potrebno je istaći da se u epidermu ne nalaze samo ćelije poreklom od ektoderma (keratinociti) već i ćelije označene kao Langerhansove ćelije, koje su epidermni makrofagi. Epitel epiderma pokriva čitavu površinu tela i učestvuje u izgradnji kožnih tvorevina, kao što su: dlake, nokti i žlezde. Gornji avaskularni epidermis je sastavljen prvenstveno od keratinocita i podeljen je u četiri sloja naime stratum bazale, spinozum, granulozum i corneum. Ovi slojevi predstavljaju različite stadijume u ćelijskoj diferencijaciji zvanoj keratinizacija. Koža pokriva celokupnu površinu tela što iznosi 1,15 do 1,8 m² i učestvuje sa oko 8% u ukupnoj masi tela čoveka. Debljina kože varira na raznim delovima tela od 0,5 do 5 mm. Struktura kože je kompleksna i visoko specijalizovana, kao što je prikazano na slici 1.

Epidermis je ektodermalna tvorevina koja šalje u kutis svoje izdanke ili prečke (rete), i one su na različitim mestima tela raznoliko debele od 0.027 mm do 3 mm u zavisnosti od lokacije. Debljina epidermisa varira u zavisnosti od

regiona tela prosečna vrednost je 77 μm , minimalna je na očnom kapku 30 μm a maksimalna 1,6 mm na tabanima. Dve vrste ćelija čine epidermis. Prvo keratinociti (90%), koje su odgovorne za proizvodnju keratina i zajedno se drže dezmozomima. Drugo dendričkih ćelija (10%): melanocita (pigmentnih ćelija), Langerhansove ćelije (ćelije imunog sistema), kao i Markelove ćelije (odgovorne za percepciju). Epidermis sačinjavaju slojevi: stratum bazale ili germinativum, stratum spinozum, stratum granulozum, stratum lucidum, stratum corneum. Epidermis odlikuje maksimalan kontakt između ćelija, minimum ekstracelularnog matriksa, nekoliko tipova spojnica koje spajaju ćelije zajedno (dezmozomi), leže u osnovi bazalne lamine, avaskularan je (nema krvnih sudova) i derivat je svih germinativnih slojeva.



Slika 1. Shematska prezentacija različitih slojeva kože (Junqueira, 1991)

Stratum basale se sastoji iz jednog niza prizmatičnih živih ćelija koje su međusobno vezane fibrilarnim strukturama, višegonaog su oblika, imaju jako obojeno jedro i šalju prema bazi izdanke koji su fino nazubljeni i čvrsto spojeni sa korijumom, a između ćelija se nalaze Herxheimerova vlakna i dendričke ćelije (melanociti). Naslanjaju se na bazalnu membranu za koju su "usidrene" posebnim fibrilarnim strukturama koje se nazivaju hemidezmozomi. Ćelije ovog sloja su prizmatičnog oblika sa dobro razvijenim granularnim endoplazmičnim retikulumom, polizomima, mitohondrijama i goldži sistemom. U njima se vrši

sinteza belančevina od kojih se obrazuju intracelularni filamenti, tonofilamenti... Po bokovima, ćelije su međusobno spojene zupčasto. Osim toga, povezane su i sa dezmozomima. U narednom, višespratnom sloju poligonalnih i nešto spljoštenih ćelija, tonofilamenti se udružuju u snopove i obrazuju tonofibrile, koji se pripajaju na dezmozomima. Dezmozomi i tonofibrili sprečavaju istezanje epiderma. Sve, bazalne i lateralne površine jesu nepravilne, s niskim naborima i talasastošću. Među susednim ćelijama redovni su dezmozomi ili maculae adherentes (MA). U ovim područjima međućelijski je prostor prosečno oko 24 nm i zauzet je umereno zgusnutom materijom. U ovoj gustoj materiji može se naći središna gusta crta koja se pruža uporedo s plazma membranama, katkada pojačana dodatnim crtama. Citoplazma sadrži velik broj tonofilamenata od kojih su mnogi združeni u snopove ili tonofibrile. Ima nešto kratkih cisterni hrapavog endoplazmatskog retikuluma, dok su grupe slobodnih ribozoma brojne. U citoplazmi se nalazi određen broj mitohondrija i zrnaca melanina ili melanozoma. Melanozomi potiču od melanocita, a mogu se naći pojedinačno ili u grupama razne veličine, omotani membranom. Zrnca melanina su najbrojnija u ćelijama donjih slojeva epidermisa. Na unutrašnjoj površini plazma-membrane nalazi se pločica guste citoplazmatske materije. Nešto citoplazmatskih tonofilamenata konvergira prema toj gustoj materiji. Na bazalnoj površini ćelije koja leži iznad dermisa, a koja nije u neposrednom dodiru s drugim ćelijama, nalaze se polovice dezmosoma ili hemidezmozomi. Ispod njega se nalazi posebna struktura, bazalna membrana specijalni deo ekstracelularnog matriksa za koga su bazalne ćelije vezane hemidezmozomima.

Bazalni sloj osnovnih ćelija koje se stalno dele stvaraju kolone keratinocita koje se na kraju dele u spljoštene korneocite. Stratum spinosum i stratum bazale čine zajedno stratum Malphiggi, tvorni sloj. Ovaj sloj se zbog svoje funkcije umnožavanja ćelija naziva i germinativni sloj ili klijajući sloj. U ćelijama Malpigijevog sloja epiderma nalaze se i zrnca melanina koja potiču od melanocita dendritskih ćelija u kojima se sintetišu. U melanocitima su telašca veličine 0,2—0,6 μm melanozomi u kojima se obrazuju pigmentna zrnca. Bazalni sloj ćelija je prožet specijalizovanim dendritskim ćelijama koje sadrže

organele, melanozome, koje imaju specifičnu funkciju - proizvodnja pigmenta melanina čija je uloga zaštita kože od oštećenja uzrokovanih sunčevim zračenjem kroz apsorpciju elektromagnetnog zračenja u opsegu talasnih dužina koji nazivamo ultraljubičasta svetlost. Intenzitet proizvodnje ovog pigmenta je određen genetski. Boja kože određena je, između ostalog, metabolizmom melanozoma što se više melanina proizvodi, koža postaje tamnija. Pege, mladeži i pigmentacija kože, koja se javlja u starijem dobu, nastaju nagomilavanjem melanina na određenim lokacijama površine kože. Iako je funkcija melanozoma i melanina dugo poznata, još uvek su nerazjašnjeni detalji biosinteze melanina. Preko dendrita, jedan melanocit ostvaruje dodir sa 36 susednih keratinocita formirajući tako kompleks koji se naziva epidermo-melaninska jedinica. Mnogo više melanocita ima u vezivu na granici pokožice i veziva. Produžetke sa pigmentnim zrcima pružaju ove ćelije i između ćelija pokožice. Deobe se ne odvijaju isključivo u bazalnom sloju, već u slojevima od bazalnog sve do spoljašnjeg sloja stratum spinosum. Keratinocite bazalnog sloja se neprekidno razmnožavaju mitotičkom deobom, potiskujući ka površini kože ćelije koje se nalaze iznad njih. Polovina broja ovih ćelija se u nediferenciranom obliku ponaša i pomera se ka površinskim slojevima u kojima se nastavlja njihova diferencijacija, dok druga polovina ostaje u bazalnom sloju kako bi svojom deobom stvorila naredne generacije ćelija. Brzina proizvodnje novih ćelija u klijajućem sloju nije konstantna već se prilagođava brzini gubitka ćelija sa površine stratum corneum. Upravljački mehanizam koji vrši usklađivanje ovih brzina se naziva epidermopoeza i predstavlja proces uravnotežavanja stimulatornih i inhibitornih signala. Sudbina svake keratinocitne ćelije u bazalnom sloju je maturacija i diferencijacija u keratinizovanu ćeliju koja izgrađuje čvrst spoljašnji sloj kože.

Stratum spinosum, najdeblji je sloj epidermisa, se sastoji iz više slojeva poligonalnih ćelija koje imaju trnaste izdanke zbog prisustva obilja dezmozoma a među njima se pružaju vlaknasti mostići i prema površini postaju sve spljošteniji. Debljina sloja stratum spinosum je od 60 do 150 μm , i zadržava oko 35% epidermalne vode. Zbog prisustva tonofibrila i dezmozoma i delimičnim

skupljanjem, ćelije ovog sloja izgledaju trnolike. U ovom sloju se keratinocite, potekle iz bazalnog sloja, duže zadržavaju i raspoređuju u 5-7 slojeva, menjajući svoj oblik od stubastog preko poligonalnog ili trnastog ka lagano spljoštenom. Oko spinalnih ćelija se prostiru intercelularni prostori, u kojima se nalazi tečnost, a pružaju se do stratum granulozum. U međućelijskom prostoru su dosta široki i premošćeni trnastim nastavcima, međućelijski mostići, koje pojačavaju epitelna vlakna, tonofibrile, koja su pričvršćena za dezmozome. U ćelijama ovog sloja se prvi put javljaju lamelarna tela (membranski sloj granula, keratinozoma ili Oblandovih tela) i raste količina keratinskih filamenata. Ćelije stratum spinozuma predstavljaju prvi stepen diferenciranja bazalnih ćelija u procesu keratinizacije. U gornjim slojevima bodljikavog sloja ćelije su nešto sploštene i imaju u središtu jedro koje sadrži jedarce. Citoplazmatski tonofilamenti ovih ćelija bolje su organizirani u snopove ili tonofibrile, skloni su da zauzmu uporedni pravac s površinom ćelije. Proteini tonofilamenata se sintetišu uz pomoć ribozoma i predstavljaju prvi stadijum u formiranju vlaknastog proteina keratina. Mala zrnca, okrugla do jajasta. takođe se nalaze u gornjim slojevima. Izgleda da ove tvorevine nastaju u blizini Goldžijeva aparata, a imaju gustu, lamelarnu, unutrašnju građu. Bilo je objavljeno da se ova zrnca spajaju s plazma-membranom i oslobađaju svoj sadržaj koji obmotava površinu ćelije zaštitnim slojem. Zbog tog razloga ona su nazvana zrcima obmotanim membranom. Površine ćelija su vrlo nepravilne, s mnogo grebena i citoplazmatskih izdanaka ili bodljika. Ti izdanci dodiruju opne susednih ćelija, a u tim se područjima nalaze i dezmozomi. Mitohondrije su raspoređene oko jedra. Citoplazmatski ribozomi nisu ovde tako obilni kao u ćelijama bazalnog sloja. Ovaj sloj je glavni transporter materije ka spoljašnjosti i ka unutrašnjosti organizma. U ovom sloju se formiraju plikovi i rane usled ogrebotina. Delimično diferencirane keratinocite, pristizanjem u trnasti sloj otpočinju sintezu vlakana keratina, po kojima su i dobile ime. Ova vlakna se po izlučivanju grupišu u tonofilamente (slika 2). Razasute širom trnastog sloja se nalaze i tzv. Langerhansove ćelije koje su specijalizovane ćelije (makrofage), pripadaju imunološkom sistemu i njihova je uloga da se prilikom povreda pripoje ćelijama

stranih tela koja prodiru u organizam, kako bi izazvale reakciju imunološkog sistema. Ove ćelije se stvaraju u koštanoj srži kao i ostale makrofage.

Ćelije stratuma spinozum stvaraju ćelije stratum granulozum koje su poređane u jedan do četiri sloja. Germinativni sloj (u čiji sastav ulaze podslojevi stratum granulozum i stratum lucidum) nastaje daljim potiskivanjem keratinocita ka površini kože tokom koga, usled dejstva enzima, dolazi do degradacije jedra i organela. Postepeno dolazi i do preoblikovanja ćelija ka spljoštenom i uvećanom obliku, zatim međusobnog pripajanja ćelija i obrazovanja tvrdog, čvrstog i dehidriranog sloja koji nastavlja da se kreće ka površini kože. Ćelije se sve više pune keratinskim vlaknima i sadrže manje intracelularne vode od bazalnih i spinoznih ćelija. Ovaj sloj je oko 5 μm debeo i poseduje veoma uređene slojeve lipid voda od 5 do 20, zavisno od uslova kože. Slojevi vode su debljine od 20 do 50 nm.

Ovaj sloj se deli u više zasebnih tanjih slojeva koji formiraju sledeći površinski sloj kože. Ćelije su međusobno povezane zupčastim produžecima, koji uležu u odgovarajuća udubljenja susedne ćelije. Ove spinalne ćelije opkoljene su intercelularnim prostorima u kojima cirkuliše limfa do stratum granulozuma. Izgrađuju više spratova i broj slojeva zavisi od predela kože. Ćelije zrnastog sloja su spljoštenije od onih u bodljikavom sloju i sadrže zrnca keratohijalina. Ta se zrnca sastoje od nepravilnih, uglastih masa guste materije koja je u vezi sa snopovima tonofilamenala. Pomoću ovih ćelija se sintetiše gusta materija, a zatim odlaze među tonofibrile koje već otpre postoje. Ima nešto mitohondrija a ribosomi se nalaze u ciloplazmi između zrnaca keratohijalina, jedra su sploštena i često su bez jedarca. Površinski izdanci nisu tako brojni ili istaknuti kao oni u ćelijama bodljikavog sloja. ali dezmozomi ostaju. Kad keratohijalinska zrnca dostignu maksimum veličine, ćelija gubi svoje jedro i citoplazmatske organele, a istovremeno i svoju sposobnost za sintezu proteina. Stratum granulozum sastavljen je iz 2-4 reda spljoštenih romboidnih ćelija, u čijoj citoplazmi se nalaze keratohijalinska zrnca koja u površinskim ćelijama postaju sve brojnija. U citoplazmi ćelija granularnog sloja se nalaze i granule keratohijalina i lamelarne granule (Odlandova telašca). Granule keratohijalina

dovode do daljeg sazrevanja keratina i stvaraju amorfnu proteinsku matricu (sa tonofilamentima) pomoću koje ćelijske membrane oblažu slojem enzima i ne propusnih lipida koji predstavlja "cement" koji učvršćuje spojeve "ćelijskih cigli" i postepeno učestvuje u izgradnji barijere narednog višeg, rožastog, sloja. Tokom prolaska ćelija kroz granularni sloj, njihove membrane se postepeno zadebljavaju usled nagomilavanja gustih naslaga keratina na unutrašnjim površinama membrana. Zrnca su jajolika, štapićasta lamelarne građe, obmotana membranom. Sadržaj ovih zrnaca se prazni u međućelijski prostor i deluje kao cementna materija između ćelija i sprečava prodor stranih materija u dubinu. U ovom sloju se odvija kvantitativno povećanje sinteze keratina. Keratohijalinske granule koje sadrže proteine (profilagrin, loricin i keratin) postaju progresivno veće i po njima ovaj sloj dobija ime. Površinske ćelije ovog sloja pokazuju jedinstvenu strukturnu i funkcionalnu organizaciju, lamelarna tela u skladu sa njihovom spremnošću da se terminalno diferenciraju u korneocite tokom koje lamelarna tela istiskuju u međućelijske domene. Debljina ostalih (tzv. ćelijskih slojeva) kože (granularni, trnasti i bazalni) se uglavnom određuje integralno zbog visoko varijabilnih granica međućelijskih slojeva i iznosi oko $\approx 55 \mu\text{m}$ na dorzalnom delu podlaktice, $\approx 70 \mu\text{m}$ na ramenu, $\approx 80 \mu\text{m}$ na butini.

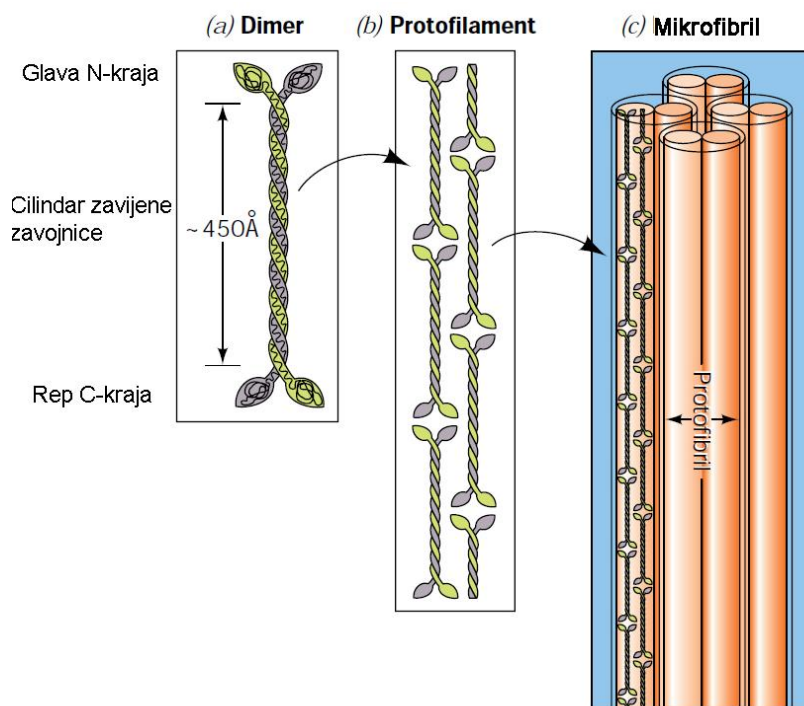
Stratum lucidum je tanak homogen sloj koji je acidofilan i prelama svetlost. Jedra i granice ćelija su isčezle a citoplazma sadrži polutečnu supstancu eleidin, koji nastaje rastvaranjem zrnaca keratohijalina. Svetli sloj deluje kao neka vrsta pokretnog sloja između mekanog tvornog sloja i ne elastičnog rožnatog sloja. Stratum corneum, rožnati sloj, koji se nalazi iznad stratum granulozum.

Stratum corneum na različitim delovima tela različito je debeo, prosečno $15\text{-}\mu\text{m}$. Sastoji se od keratiniziranih ćelija koje se preklapaju, a svaka korneocita je debela $<1 \mu\text{m}$ i površine su $900 \mu\text{m}^2$, ćelije su bez jedra sa dobro izraženom ćelijskom membranom. Ćelije rožnatog sloja su široke, pljosnate ljuške. Citoplazma ovih ćelija ne sadrži organele, nego je puna gusto zbijenih, finih filamenata, uloženi u gusti matriks. Rožasti sloj se sastoji od oko 15-26 slojeva orožnalih ćelija formiranih u dubljim slojevima epiderma. Debljina ovog sloja

iznosi oko 10-40 μm \approx 17 μm na obrazu, \approx 11 μm na ramenu, \approx 15 μm na butini, \approx 18-23 μm na volarnoj strani podlaktice, \approx 30-40 μm na dlanu. (Charras Horton 2002.) Međutim, kako ukupna debljina SC ne odstupa bitno u okviru grupe rasne ili etničke pripadnosti, pretpostavlja se da su kohezija i kompaktnost ovih slojeva verovatni činilac razlikovanja. U okviru stratum corneuma se uočavaju dva međusloja: na spoljašnjoj strani je otpadni sloj, stratum disijunctum a na unutrašnjoj kompaktni sloj, stratum compactum. Ove ćelije su dodatno spljoštene i keratinizovane, izgubile su jedro i citoplazmatske organele, unutrašnjost im je ispunjena matricom keratinskih tonofibrila i progresivno degenerišu kako se približavaju samoj spoljašnjoj površini kože. Takođe dolazi i do postepenog dodatnog međusobnog prodiranja i stapanja ovih ćelija čime se formiraju strukture izrazite čvrstoće kojoj doprinosi i prisustvo lipida u međućelijskom prostoru i disulfidne veze keratina. Ovaj sloj ima i osobinu deformabilnosti koja se ogleda u njegovoj sposobnosti da primi u sebe količinu vode tri puta veću od njegove sopstvene težine. Ukoliko se pak iz sloja ukloni veća količina vode, iščezava i svojstvo elastičnosti. Pritisak ili trenje iz spoljašnje sredine uzrokuju neprekidno uklanjanje slojeva ćelija sa površine stratum corneuma i njihovu zamenu novim slojevima koji izvire iz dubine epidermisa. U proseku je potrebno 52-75 dana da se svi slojevi stratum corneum-a u potpunosti zamene novim slojevima ćelija. Proces obnavljanja se sa starošću usporava, dok se kod nekih ljudi abnormalno ubrzava i izaziva oboljenje karakterisano pojavom ljušpičaste, krljušaste površine kože, koje je poznatije kao psorijaza. Pored toga, mehanička opterećenja koja se na nekim lokalitetima zadržavaju duže vreme, stvaraju zadebljanja na tim mestima od kojih neka u slučaju pojave patoloških stanja prerastaju u žuljeve.

Pod keratinima se podrazumevaju vlaknasti proteini koji učestvuju kao sastavni deo ćelija kože i njenih produkata kao što su nokti i kosa slika (2). Većina keratina poseduje α -heliks. Osnovna jedinica građe molekula keratina je alfa-heliks koji učestvuje u građi protofibrila (dijametar 2 nm) koji se proteže dužinom molekula. Protofibrile zatim stvaraju mikrofibrile koje su izgrađene od devet perifernih protofibrila i dve centralne protofibrile (8 nm). Stotine

mikrofibrila zajedno sa cementnim materijalom koji ih okružuje i koji je bogat aminokiselinama sa sumporom čine makrofibrilu (200 nm). Keratini su opisani kao "meki" i "tvrdi" na osnovu sadržaja sumpora koji učestvuje u građi makrofibrila. Koža sadrži mek, a nokti tvrd keratin.



Slika 2. Dva keratinska polipeptida formiraju dimerizovanu zavijenu zavojnicu (dvostruki heliks ili tonofilament). (b) Pomoću nastavaka zavijene zavojnice, koji se spajaju krajevima N-glava. (c) Sledi dimerizacija protofilamenata u protofibrilu. Spajanjem četiri protofibrile formira se mikrofibril. Osobine protofibrilarnih nadstruktura nisu dovoljno proučene. (Junqueira 1991)

Filamenti su sastavljeni od proteina i predstavljaju tonofilamente koji su oformljeni u donjim slojevima, dok gusti interfibrilarni matriks može biti keratohijalin koji je sintetisan u stratum granulozum. Površina ćelije može imati široke grebene i uglaste oblike, ali su brojni izdanci i bodljike nižih slojeva nestali. Dezmozomi su takođe značajno promenili svoju građu i predstavljani su samo gustom pločicom na mestu prvobitne međućelijske pukotine. Pločica je odvojena od zadebljanih ćelijskih membrana tankom pukotinom i ona eventualno degeneriše i nestane. Ove su ćelije krajnji proizvod procesa keratinizacije. U završnim stadijumima keratinizacije, sulfhidrilne grupe proteina se oksidišu u disulfide, za koje se smatra da od njih zavisi velika

otpornost rožnatog sloja na mnoge supstance, uključujući enzime, kao što su tripsin, razređene baze i organski rastvarači. Proces keratinizacije (promet ćelija) traje 28 dana i zavisi ne samo od telesnog regiona već i od čitavog niza faktora. Površinske ćelije rožnatog sloja neprestano se ljušte, a zatim nadoknađuju diferenciranjem ćelija iz dubljih slojeva. Osim procesa keratinizacije u epitelu se odvija i proces melanizacije (u širem smislu pigmentacije). Ovaj proces se odvija sa nizom promena koje se odvijaju u ćelijama melanocita. Melanociti nisu nastali direktno od ektoderma već od ćelija koje su jedno vreme bile u sastavu nervne ploče. Kada se nervna ploča zatvorila u nervni žleb jedan deo materijala nervne ploče je ostao sa strane nervne cevi. Ćelije sa strane nervne cevi migriraju i naseljavaju kožu negde između trećeg i šestog meseca intrauterinog razvika. Označene su kao melanociti i formiraju pigmentni sistem kože. Čestice melanina prožimaju čitav stratum i istiskuju sadržaj u međućelijski prostor korneocita. Sadržaj lipida je upadljivo drugačiji od onog u donjim slojevima epidermisa. Glavna razlika je prisustvo više nepolarnih lipida, uglavnom ceramida 1-9 koji se sintetišu i delimično u lamelnim telašcima u stratum granulozum i kasnije omogućuju barijeru za bulk vodu. Korneocite su spljoštene i sadrže umrežena vlakna keratinskih fibrila. Orožnala supstanca keratin je veoma otporna prema većini reagensa, providna je i zamenjuje citoplazmu. Dva sloja se mogu razlikovati u SC stratum compactum koji je stabilizovan korneodezmozomima između ćelija, što prenosi strukturnu stabilnost u SC. Površinske ćelije stratum disijunctuma su spljoštene i stalno se ljušte (proces deskvamacije korneocita) zbog degradacije korneodezmozoma. Osnovno svojstvo ovih ćelija je prisustvo snopova keratinskih filamenata i međusobna povezanost ćelija dezmozomima. Organizacija SC može jednostavno biti predstavljena kao dvokompartimentni cigla i malter model. Terminalno diferencirane keratinocite korneocite (cigle) stvaraju diskontinualni ugrađen deo u kontinuirani lipidni matriks (malter). Ovaj aranžman kreira put kroz koji voda mora da prođe kako bi prošla kroz kožu. SC se sastoji od približno 18-21 slojeva ćelija. Korneocite u SC su okružene kornifikovanim ćelijskim omotačem koji formiraju proteini (loricin i involucrin). Kornifikovani omotač je kovalentno vezan za ω hidroksilnu kiselinu koju sadrži

ceramid lipidnog omotača, što omogućuje koheziju omotača i lipidnog matriksa. (Karadaglić, 2000 god.)

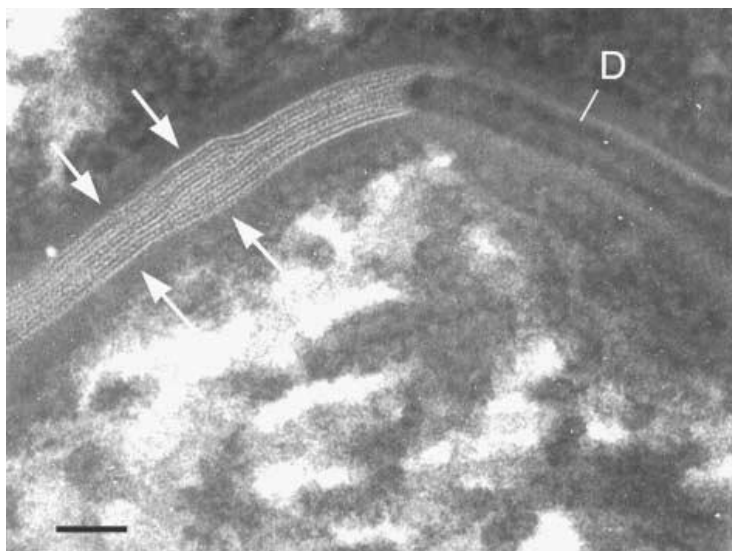
Lipidi barijere SC nastaju od lamelarnih tela (LT) koje sadrže gomile lipidnih lamela sastavljene od fosfolipida, masnih kiselina, holesterola i glikozil ceramida koje su prekursori SC intercelularnih lipida. Osim toga sadrže enzime kao fosfolipaze i β -glukocerebrozidase. Tokom diferencijacije keratinocita u stratum granulozum, u graničnoj površini SC, LT se spajaju sa ćelijskom membranom i istiskuju svoje lipide u međućelijski prostor gde se lipidne ploče spajaju svojim krajevima. Ova promena u strukturi je u korelaciji sa nizom promena u sastavu lipida. Od mešavine polarnih lipida do nepolarnih lipida koje čine ceramidi, slobodni steroli i slobodne masne kiseline. (Landeman 1986 god.) Formiranje barijere kože se odvija kontinuirano visoko dinamičnim procesom, ukrštanjem lipidnih membrana, koje se slobodno odvija u jedinstvenu i koherentnu trodimenzionalnu strukturu. Mreža lamelarnih tela koja se izlučuju preko goldži aparata i intracelularni lipidi SC se neprekidno povezuju u (slično kocki) membranske strukture, koje se transformišu u ravne lamelarne membranske strukture na površini između stratum granulozum i SC. (Norlén 2001.) Glavne lipidne komponente koje se mogu izolovati iz kože su ceramidi, holesterol i masne kiseline, koje čine oko 50%, 25% i 10% lipida SC. Male količine holesterol sulfata i holesterol estra su takođe prisutne. Fosfolipidi koji su glavna komponenta ćelijskih membrana su prisutni samo u tragovima.

Holesterol je opšte prisutna komponenta membrana koja povećava i smanjuje fluidnost u zavisnosti od procenta holesterola i sadržaja drugih komponenti. U SC holesterol obezbeđuje stepen fluidnosti krutih inače krtih ćelijskih membranskih sistema.

Iako je količina holesterol sulfata u SC mala, igra ključnu ulogu u koheziji ćelija i ovim učestvuje u procesu deskvamacije. Holesterol estri (uglavnom oleati) ne formiraju dvostruke slojeve i uglavnom služe da izoluju ostatke nezasićenih masnih kiselina da bi sprečili njihov efekt fluidizacije na membranske domene. (Wertz 2000.)

Slobodne masne kiseline SC se uglavnom sastoje od ravnih zasićenih vrsta lanaca i nastaju de novo sintezom iz epidermisa. Oni se kreću od 16 do 30 ugljenikovih atoma u dužinu. Ove kiseline i holesterol sulfat su jedini jonizabilni lipidi u SC i važni su za formiranje dvoslojeva.

Ceramidi su strukturno heterogena i kompleksna grupa sfingolipida koji uglavnom sadrže sfingozin, fitosfingozin ili 6-hidroksi sfingozin amid povezan sa različitim ne hidroksi, α -hidroksi ili ω -hidroksi kiseline. Dužina ovih lanaca masnih kiselina varira između 16 i 30-40 ugljenika. Svi alifatični lanci u ceramidima kao i u masnim kiselinama su veoma uređeni i zasićeni. Polarne grupe su veoma male u poređenju sa fosfolipidima što je preduslov za funkciju barijere SC. (Wertz 1996.) Ceramidi imaju veoma važnu ulogu u obrazovanju dugoperiodične faze. Ceramidi poseduju ulogu molekularnih nitni koji vezuju trilamelarne jedinice zajedno i zbog toga uslovljavaju široko usko široke sekvence u dugoperiodičnim fazama. Na fiziološkim temperaturama lipidni lanci SC su u visoko uređenom stanju. (Velkova, Lafleur, 2002.)



Slika 3. Intercelularne membrane u stratum corneum. Strelice pokazuju međucelijske lamele. D ukazuje na desmosom. Neposredno levo od desmosoma grupa od devet lamela prelazi u grupu od dvanaest lamela. Svetla traka je 50 nm širine (Kuempel 1998)

Lipidi su organizovani u lamele u međucelijskom prostoru SC. Snimci elektronskim mikroskopom pokazuju neobične aranžmane trilamelarnih jedinica koje se ponavljaju sa široko usko širokim izgledom i intervalima

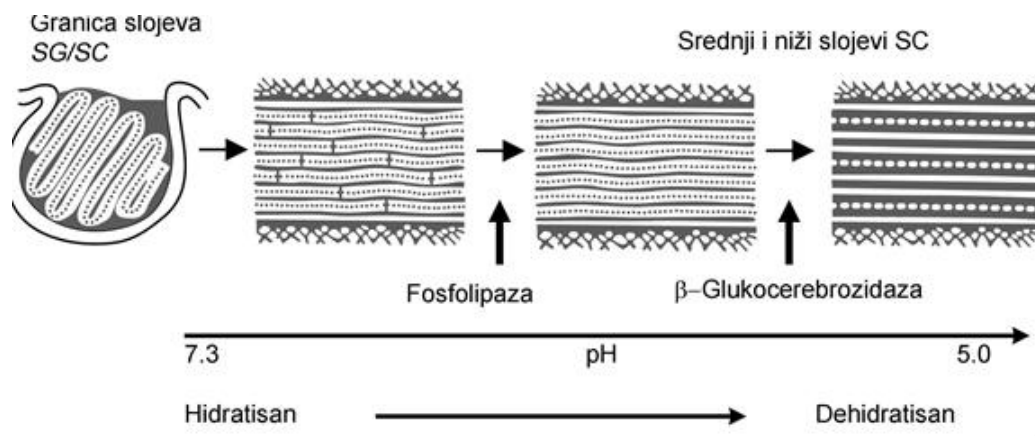
dimenzija od 13 nm. Takođe su otkrivene dvolamelarne faze sa periodičnošću od 6 nm (kratko periodične faze) i 13 nm (dugoperiodične faze). Lipidi su uglavnom u kristalnoj fazi, koegzistiraju ortorombni i heksagonalni kristalni aranžmani u SC. (Fenske Thewalt Bloom Kitson 1994.) Dugoperiodične faze od 13 nm su ključne za funkciju SC. (McIntosh Stewart Downing 1996.) Tačno određivanje unutrašnje strukture dugoperiodične faze je suštinska za određivanje osobina funkcije barijere kože.

Model mozaičnih domena koje je predložio Forslind (Forslind 1994) opisuje glavninu lipida kao razdvojene u kristalne/gel domene koji efikasno sprečavaju gubitak vode iz organizma. Domeni su ograničeni zrnastom granicom sa lipidima u tečnom kristalnom stanju. Karakter fluidnosti granične oblasti između kristalnih domena omogućava difuziju molekula vode kroz barijeru.

Sendvič model predlaže da su domeni raspoređeni u različitim slojevima u trolamelarnom aranžmanu. Prema ovom konceptu linoleatni delovi su locirani u širokom centralnom sloju dugoperiodične faze i vezuju tri sloja zajedno. Centralni sloj je u tečnoj fazi. Dva regiona u kojima kristalnost raste se nalaze neposredno do centralnog sloja. Smanjena mobilnost u susednim slojevima se može pripisati prisustvu manje mobilnog dugačkog zasićenog ugljovodoničnog lanca. Tečna faza centralnog sloja, kako se pretpostavlja je nepovezana i omogućuje molekulima vode da prolaze kroz kožu, voda pokušava da prođe region kristalno lipidne membrane i delimično difundira kroz region lipida manje gustine pakovanja (slika 4). (Kuempel 1998.)

Model pojedinačne gel faze se znatno razlikuje od prethodno navedenih modela i predlaže da se barijera kože formira jednu koherentnu lamelarnu gel strukturu u međucelijskom prostoru SC. Nema faze razdvajanja, niti između tečnosti i gel kristalne faze niti između različitih kristalnih faza sa šestostranim i rombičnim pakovanjem lanaca, prisutan je u samoj strukturi barijere. Predloženo je da jedinstvena lipidna struktura poseduje nizak sadržaj vode mali stepen mobilnosti i nisku propustljivost vode zbog bliskog pakovanja lipida.

Nasuprot mozaiku domena i sendvič modelu, koji predlažu da su ceramidi organizovani u konformaciji lakta (paralelno orjentisani lanci ka unutrašnjosti membrane), model pojedinačne gel faze pretpostavlja raširene i lakat lance, (centar lanca i polarna grupa su udaljene u suprotnim pravcima) konformacije ceramida u lipidnom matriksu SC. (Corcery, 2002.)



Slika 4. Prikazuje shematski prikaz transformacija koje dovode do sinteze ceramidnih nano-lamela u SC-u. Međucelijske lipidne lamele mogu se nalaziti u čvrstoj fazi ili u fazi tečnokristalnog gela. Ravnoteža ovih faza zavisi od stepena zasićenosti masno-kiselinskih lanaca. Uporedno sa modifikacijama polarnih lipida egzocitovanih iz lamelarnih telašaca odvija se i modifikacija pH sredine i stepena hidratisanosti. (Kuempel 1998)

Površinu kože prekriva sloj lipida koji su poreklom iz keratinocita epidermisa i lojnih žlezda. Sastav lipida sa površine varira od mesta sa kojeg je uzet uzorak. Glavnina mase sebuma je mešavina relativno nepolarnih lipida od kojih je većina sintetisana de novo iz žlezda. Lipidi koje produkuje koža imaju mali udeo u oblastima bogatim lojnim žlezdama. Lipidi epidermalnog porekla ispunjavaju prostor između keratinocita kao malter (slika 4). Lipidi lojnih žlezda su prvenstveno nepolarni kao trigliceridi, vosak i estri skvalena, dok su epidermalni lipidi mešavina ceramida, masnih kiselina i holesterola. Sastav sebuma je upadljivo karakteristika vrste. Sebum odraslog čoveka sadrži dva puta više saponifikovanog materijala u odnosu na nesaponifikovan materijal. Više od pola ljudskog sebuma je sastavljeno od triglicerida i slobodnih masnih kiselina. Prosečna molekulska težina triglicerida čoveka odgovara dužini lanaca C₅₄₋₅₅. Slobodne masne kiseline nisu prisutne u lojnim žlezdama, ali se formiraju od triglicerida aktivnošću lipaza kad je sebum u blizini površine kože. Alifatički

monohidroksilni alkoholi su prisutni kod svih uzoraka sebuma, oni grade tip I diestar voskove i monoestar voskove. Dužina lanaca ovih alkohola je uopšte relativno velika, sebum odraslog čoveka je sa C₁₀-C₂₄ maksimalnom dužinom lanaca. Slobodne masne kiseline se oslobađaju iz triglicerida i poseduju antifugalna i antimikrobna svojstva. Seba čoveka sadrži zasićene i nezasićene ugljovodonične lance u alifatičkim alkoholima. Sterol estri odraslog čoveka sadrže veliku količinu mononezasićenih lanaca i relativno malu koncentraciju razgranatih lanaca. Sebum čoveka sadrži relativno visoku koncentraciju skvalena i veoma malo slobodnog ili esterifikovanog holesterola. Glavno mesto za sintezu skvalena u ljudskoj koži je lojna žlezda dok je sinteza sterola uglavnom u keratinizovanom epidermisu. Površina ljudske kože siromašna lojnim žlezdama poseduje malo skvalena i visok sadržaj slobodnog holesterola i obrnuto kada je koža bogata lojnim žlezdama sadrži veliku količinu skvalena i veoma malo ukupnog holesterola koji je uglavnom esterifikovan. Slobodni holesterol nastaje uglavnom u epidermisu dok esterifikovani holesterol i skvalen nastaju u lojnim žlezdama. (Nikkari 1974.)

Korijum ili cutis ima debljinu oko 0,3 mm-4 mm a proteže se od epiderma do subkutisa. Načinjen je od spoljašnjeg rastresitog vezivnog tkiva i unutrašnjeg gušćeg vezivnog tkiva, čini 90% kože. Sastoji se od pre svega vezivnog matriksa koji je sastavljen od 90% kolagena (uglavnom tipa I) zajedno sa elastičnim vlaknima, lojnih i znojnih žlezda, folikula dlaka, nervnih vlakana, senzornih receptora, krvnih i limfnih sudove, kapilara i međućelijskog prostora. U dermisu postoje dva pleksusa krvnih sudova jedan u dubljoj oblasti dermisa na dodiru sa potkožnim tkivom (retikularni pleksus) i drugi (površinski subpapilarni pleksus) u papilarnom sloju dermisa odakle krvni sudovi snabdevaju papile i epidermalno dermalnu spojnicu. Deli se na: retikularni (unutrašnji) i papilarni (spoljašnji) ili corpus papilare sa brežuljkastim izbočinama (retama) prema epidermisu, u kojima se nalaze krvni i limfni kapilari, (subpapilarni pleksus koji sadrži kapilarne petlje) rastresito vezivno tkivo i nervni produžeci koji omogućuju osećaj bola, sadrže Maisnerova telašca koja omogućuju osećaj dodira. Kapilari hrane epidermis i snabdevaju ga

tečnošću i uključeni su u termoregulaciju, sadrže ih dermalne papile. Ovaj sloj je tanak i nalazi se iznad retikularnog sloja. Neke papile sadrže telašca za dodir dok neke sadrže samo krvne sudove. Osim toga što sadrže mnogo limfnih kapilara u ovom sloju se nalaze brojne vezivne ćelije i fina kolagena i elastična vlakna, koja imaju uglavnom vertikalni položaj. Corpus subpapilaris se sastoji iz većeg broja ćelija a vezivna vlakna se pružaju vertikalno za razliku od dubljeg sloja koji ima manje ćelija i gušću mrežu debljih vlakana kolagena koji se pružaju horizontalno u različitim pravcima. Corpus reticularis je širok a prema supkutisu je nejasno omeđen. Retikularni sloj gušće nepravilno tkivo i kolagen koji čine ekstracelularni matriks omogućuje snagu, elastičnost, čini dermis kompaktnim, kolagen također vezuje vodu (čiji je sadržaj 80%) da bi se sačuvala hidratacija kože. Kroz čitav dermis se protežu kolagena, elastična i retikularna vlakna, vezivne ćelije, krvni i limfni sudovi, lojne žlezde, folikuli dlake, znojne žlezde, mm. arrectores pilorum, nervna vlakna i čulne ćelije. Kolagena vlakna, elastin kao i kompleks šećera iz ekstracelularnog matriksa obezbeđuju strukturni integritet kože. Kolagena vlakna su skupljena u snopiće, koji su isprepletani i pružaju se u raznim pravcima stvarajući romboidne prostore. Elastična se vlakna rastežu, ali se vraćaju u svoj pređašnji položaj, smeštena su u snopovima kolagena kao njihov kostur. Retikularna vlakna se pružaju oko folikula dlake, ispod epiderma, oko sudova i kožnih žlezda. Preovlađuju fibroblasti i fibrociti od ćelija. Cutis prožima mezenhimalna interfascikularna osnovna materija, koja se sastoji od: proteina, neutralnih šećera, kiselih mukopolisaharida (hijaluronska kiselina i hondrotin-sumporne kiselina). Ovaj sloj sadrži manje ćelija a više debljih ukrštenih snopova kolagenih vlakana, koji se pružaju pretežno u blagim spiralama, praćena elastičnim vlaknima. Ćelije dermisa su: fibroblasti, makrofazi, mastociti i krvne ćelije, receptori i nervni produžetci. Osnovnu masu dermisa čini ekstracelularni matriks koji je mreža proteina u čiju mrežu su uključene različite vrste osnovnih supstanci, hidratizirani polisaharidi: glikoproteini i proteoglikani čija količina i raspored obezbeđuju razna svojstva dermisa pre svega elastičnost. Ovi molekuli su veoma veliki i razgranati, nose mala naelektrisanja na svojim molekulima i tako privlače naelektrisane (polarne) molekule vode i na taj način zadržavaju

molekule vode u prostoru dermisa. Drži ćelije zajedno, okružuju ih i potpora su im, regulišu ćelijsku aktivnost i rešetka su za kretanje ćelija, sastoje se od retikalarnog sloja sa debelim gusto pakovanim kolagenim vlaknima i manjim brojem fibroblasta i sub papilarnog sloja sa ređe pakovanim manje gustine pakovanjima kolagenih vlakana i većim brojem fibroblasta. Dermis obezbeđuje fleksibilnost i elastičnost kože. Njene glavne komponente obezbeđuju sporu difuziju konstituentnog fluida. Stopa difuzije u dermisu zavisi od krvotoka, pokretanja međućelijske tečnosti i interakcije tečnosti sa konstituentima dermisa. Veći deo funkcionalnosti dermisa je ostvaren kroz vanćelijsku matricu, koja predstavlja složenu mešavinu bioaktivnih makromolekula, proizvedenih od strane ćelija dermisa, koji su ili sekretovani kao intaktni ili naknadno grupisani izvan ćelije. Mutacije u genima koji kodiraju molekule vanćelijske matrice uzrokuju širok spektar oboljenja. U opštem slučaju, vanćelijsku matricu grade veliki oligomeri, sastavljeni iz jednog ili više polipeptida koji se udružuju u helikoidne suprastrukture (zavijena zavojnica). Oni poseduju adhezivnost koja im omogućuje vezivanje ćelija i mikroorganizama bez potrebe za postojanjem receptorsko-ligandnih struktura koje bi zahtevale specifičnost u pogledu vezivanja. Pored kolagena, kao najzastupljenije komponente, prisutni su elastin, fibrilini, latentni TGF-beta vezivni proteini, tubulini, laminini, proteoglikani, integrini i enzimi uključeni u procese njihove obrade.

Ekstraćelijski matriks (ECM) se sastoji od međućelijskog matriksa i bazalne membrane i energetski razdvaja epidermis od dermisa. Gel koji čine polisaharidi i fibrozni proteini ispunjava međućelijski prostor i deluje kao kompresioni bufer protiv stresa koji deluje na ECM. Obezbeđuje potporu i pričvršćivanje ćelija, razdvajaju tkiva jedno od drugog, regulišu ćelijsku među komunikaciju, ćelijsku dinamiku ponašanja, njegovi delovi poseduju opsege faktora rasta i deluju kao lokalni depoi za njih. Komponente ECM intercelularno proizvode ćelije smeštene u njemu, fibroblasti, i izlučuju ih egzocitozom zatim se sjedinjuju sa već postojećim matriksom koji čini izukrštanu mrežu fibrilnih proteina i glukozaminoglikana Sastavljeni su od polisaharida koji se vezuju za proteine i čine proteoglikane, negativnog su naelektrisanja privlače pozitivno

naelektrisane jone Na^+ koji privlače molekule vode osmozom čuvajući ECM i ćelije u njemu. Proteoglikani takođe mogu čuvati i skladištiti faktore rasta unutar ECM. Heparan sulfat je linearan polisaharid nalazi se u svim tkivima. Nalazi se kao proteoglikan koji je sa dve do tri SH grupe zakačen u blizini površine ćelije ili ekstracelularnih proteina matriksa u takvom obliku da se SH grupe vezuju za različite ligande proteina i regulišu veliki raspon bioloških aktivnosti. U ECM posebno u bazalnoj membrani su prisutni multidomenski proteini: perlekan, entaktin, laminin, argin, kolagen XVIII koji su vezani preko heparan sulfata. Prisutni su i neproteoglikanski polisaharidi koji se sastoje od naizmeničnih ostataka D-glukuronske kiseline i N-acetil glikozamina. Hijaluronska kiselina u međućelijskom prostoru daje tkivu sposobnost da izdrži pritisak pružajući otpor turgoru, sili koja apsorbuje značajnu količinu vode. Ona deluje kao okolni lepak, reguliše ponašanje ćelije. Maseni udeo kolagena učestvuje sa 90% u masi dermalnih proteina i 75% u masi cele kože. Od 25 tipova kolagena koliko ih ukupno ima u ljudskom telu, oko polovine tog broja je prisutno u koži; pritom kolagen tipa 1 učestvuje sa oko 85-90%, kolagen tipa 3 sa oko 8-11% i kolagen tipa 5 sa oko 2-4%. (Vlatković 1979.) Imajući u vidu njegovu dominantnu poziciju u koži, nije neočekivano njegovo učešće u raznovrsnim procesima, od potpore tkivu kože (kroz popravku tkiva, migraciju i adheziju ćelija) do obezbeđenja osnove za morfogenezu tkiva i agregaciju krvnih pločica kada je to potrebno. Relativan dopinos različitih vrsta kolagena varira pod različitim okolnostima. Primera radi, kolagen tip 3 se intenzivnije sintetisuje u procesu zarastanja rana iako su score save vested kolagena sintetisane u samoj koži (dermisu), endotelne ćelije dermalnih krvnih sudova takođe proizvode epidermalni kolagen. Kolageni imaju zajedničku hemijsko strukturalnu osobenost koja je za polipeptidni lanac (homotrimer ili heterotrimer) koji formira trostruki heliks kolagena. Svaka treća aminokiselina u ovom lancu je glicin, dok su preostale dve pozicije dominantno (ne i isključivo) zastupljene prolinom ili 4-hidroksiprolinom, tako da se vodonično vezivanje hidroksilnih grupa ostvaruje na susednim lancima što dodatno doprinosi stabilnosti trostruke zavojnice. U znatno manjoj proporciji se javljaju i 3-hidroksiprolil i 5-hidroksilizil ostaci. Prototip kolagena (tip 1) sačinjava lanac od

1000 aminokiselina (dužine oko 300 nm), i formira krutu oblicu prečnika 1.5 nm. Biosinteza kolagena je složen proces koji obuhvata sintezu prokolagenskih polipeptida kome sledi unutarćelijska i vanćelijska obrada kojom se generiše zrelo i funkcionalno vlakno kolagena. Prokolagenski polipeptid se podvrgava višestrukim izdvajanjima kratkih sekvenci sa oba kraja lanca, i brojni patološki sindromi nastaju ukoliko pravilna obrada izostane. Osim toga, sprovodi se i hidroksilacija prolina dok se lizinski ostaci glikolizuju. Unutar lančani i vanlančani disulfidni mostovi se formiraju pre nego što molekul poprimi sekundarnu i terciarnu strukturu. Prokolagenski molekuli se sjedinjavaju u granule radi izlučivanja van ćelije. U vanćelijskom prostoru se odvija dodatno izdvajanje sekvenci krajnjih peptidnih komponenti nakon čega se formiraju suprastrukture, obrazovanjem unakrsnih kovalentnih veza sa kolagenskim vlaknima drugih tipova kao i sa ne kolagenskim molekulima. Biosinteza kolagena zahteva, osim enzima, i prisustvo raznih kofaktora među koje spadaju i O_2 , Fe^{2+} , askorbat itd. Kolagenski proteini su ključni za formiranje spoja između epidermisa i dermisa. (Uitto 1979.) Kolagen tipa 7 formira komponentu koja se kolokvijalno naziva "usidrujuća žilica" čija je uloga vezivanje bazalne membrane za vanćelijsku matricu papilarnog derma, dok kolagen tipa 17 doprinosi takozvanim "usidrujućim končićima" koji vezuju bazalne keratinocite za bazalnu membranu. Bazalna membrana koja se nalazi u dermalnim krvnim sudovima sastoji se iz kolagena tipa 8 i tipa 18. Prisustvo tipa 18 je od posebnog kliničkog značaja zato što proteolitičko raskidanje malih C-terminalnih fragmenata (endostatini) zaustavlja formiranje novih krvnih sudova što inhibitorno utiče na tumorske angiogenetske aktivnosti. Ekstrafibrilarna matrica, dermalni materijal koji se nalazi van ćelije, i ne sastoji niti od kolagena niti od elastičnih vlakana, se naziva vanćelijska matrica. Ovaj amorfn i higroskopski materijal je biološki veoma aktivan, visoko raznovrstan i visoko organizovan. Sastoji se od proteoglikana, glikoproteina, vode i hijaluronske kiseline. Proteoglikani se formiraju vezivanjem proteina sa glikozamino-glikanima koji poseduju negativno naelektrisanje, mesta za vezivanja vode, jona i polisaharidne molekule supstituisane sulfatnim ili acetil grupama. Ipak hijaluronska kiselina je primer glukozaminoglikana koji ne sadrže proteinsku

komponentu. Pet dodatnih, fiziološki značajnih, grupa glikozaminoglikana su: hondroitin sulfat, dermatan sulfat, keratin sulfat, heparan sulfat i heparin. Najvažniji proteoglikan u koži je versikan proizveden u fibroblastama, ćelijama glatkog mišićnog i epitelnog tkiva. Versikan je pridružen elastičnim vlaknima i hijaluronskoj kiselini sa ulogom da koži obezbedi zategnutost. Još jedan primer je perlekan koji se nalazi u bazalnoj membrani. Sindekani pripadaju porodici višenamenskih proteoglikana koji učestvuju u ćelijskom adheriranju za vanćelijsku matricu, kaskadama koagulacije, signalnim putevima faktora rasta itd. Nekoliko dodatnih grupa nazvanih "mali proteoglikani bogati leucinom" se takođe nalazi u koži, i svaka ima višestruke regulatorne zadatke. Vanćelijska matrica sadrži nekoliko drugih glikoproteina koji su uključeni uglavnom u strukturisanje bazalne membrane, ćelijsku adheziju, ćelijsko migriranje i međućelijsku komunikaciju a to su laminini, fibronektini, vitronektini, matrilini, trombospondini, tenacini itd.

Fibrili elastina kao kolagen daju strukturnu podršku ćelijama tkiva i druga su glavna komponenta vanćelijske matrice. Egzocitozom se izlučuje iz ćelija kao protoglikan koji se onda cepa elastin proteazom da omogući ekstracelularno sklapanje. Ovaj monomer ili nepolarizovani molekul poseduje dužinu oko 200 nm i satoji se od samo jednog ili nekoliko polipeptidnih lanaca. Postoji stroga tendencija za bočne i interakcije krajevima koje vode ka obrazovanju fibrila. I sa druge strane za razliku od kolagena elastin daje elastičnost tkivu što im omogućuje da se istežu i zatim vraćaju u njihovo originalno stanje. Elastin sintetišu fibroblasti ili glatki mišići. Molekule elastina karakteriše mogućnost istezanja preko 100% sopstvene dužine u nedeformisanom stanju. Razlikuju se tri vrste elastinskih vlakana. Prva vrsta, nazvana "oksalaska vlakna", sadrže mikrovlakna (10-12 nm u prečniku) dok preostale dve sadrže manje odnosno veće količine dodatnih amorfni komponenti. Osobine elastičnosti vlakana proističu od amorfne komponente, koja sadrži visoko unakrsno povezane polimere. Upravo je sposobnost formiranja unakrsnih veza između pojedinačnih molekula elastina ono što ovim vlaknima obezbeđuje i svojstva elastičnosti i svojstva ne rastvorljivosti.

Mikrovlaknasta komponenta elastičnih vlakana je sačinjena uglavnom od fibrilina-1 (velikog glikoproteina čija primarna sekvenca sadrži preko 2800 aminokiselina) koji poseduje periodično postavljena mesta za vezivanja jona Ca^{2+} koja pospešuju stabilizaciju molekula.

Adhezija ćelija za ECM se dešava na dva načina fokalnom adhezijom se vezuje ECM za filamente aktina ćelije i hemidezmozome koji vezuju ECM za posredne molekule kao što je keratin. Adhezija ćelije za ECM se reguliše specifičnim ćelijskim adhezionim molekulima poznatim kao integrini i povezuju ćelije sa strukturama ECM kao što su fibronektin i laminin. Fibronektin se vezuje za površinu ECM makromolekule i olakšava njihovo vezivanje za transmembranske integrine. Pričvršćivanje fibronektina za ekstracelularni domen inicira intraćelijske signalne puteve za asocijaciju sa ćelijskim citoskeletom preko niza adaptorskih molekula kao aktin.

U međućelijskom prostoru su veliki molekuli kao proteoglikani zarobljeni i stvaraju veliki pritisak da uravnoteže spoljašnji. Polupropustljiv matriks i fiksirana negativna naelektrisanja ovih molekula služe da proizvedu bubrenje tkiva kad je neravnoteža u balansu molekula. Strukturni molekuli, kao fibrili kolagena formiraju mrežu koja je otporna na istezanje koja sprečava tkivo da previše nabubri i čuva integritet tkiva. Međutim kolagen malo doprinosi kao nosač, osmotski pritisak je glavni faktor u uravnotežavanju spoljašnjeg pritiska. Sadržaj ekstracelularnog matriksa čini samo 5 klasa molekula: nerastvornih (ne mogu biti hidratizirani) kolageni, elastična vlakna i rastvorljivi, lako se hidratišu proteoglikani, hijaluron i adhezivni glikoproteidi. Osnovne supstance koje su hidratizirane su slične gelu i suprotstavljaju se silama kompresije. Fibrili obezbeđuju istezanje. Voda hidratacije sprečava brzu razmenu hranljivih materija i otpadnih materija. Glukozaminoglikani su negativno naelektrisani, izduženi nalik na štapiće, sastavljeni od disaharida koji se ponavljaju, obično vezuju velike količine vode. Visoka koncentracija Na^+ privlači ekstraćelijsku tečnost hidrirajući ekstraćelijski matriks. Glukozaminoglikani i proteoglikani zadržavaju vodu u koži slično mukus proteinu. Druge komponente ekstracelularnog matriksa su debeli gusti fibrili, koji deluju kao čelične šipke i

ojačavaju konstituente dermisa. Pored kolagena elastin, strukturni protein, obezbeđuje elastičnost dermisu u kojem je u partnerstvu sa kolagenom. Gde kolagen obezbeđuje krutost, elastin je protein koji omogućuje dermisu da se nakon deformacije, izazvane nekom silom, vrati u početno stanje. Elastin je elastičan i relativno stabilan protein sa mnogim unutrašnjim vezama. Ove veze čine elastin otporan na normalne prekide koji su karakteristični za većinu proteina. (Harvey Lodish 2004.)

Bazalna membrana, specijalni deo ekstracelularnog matriksa, važna je ne samo za organizaciju ćelija u tkivo, reparaciju tkiva, nego i usmeravanje ćelija tokom migracije. Četiri opšte prisutna proteina imaju glavnu ulogu u bazalnoj lamini. Tip IV kolagen, molekul sa oba domena, nalik na štapić i globularan domen, koji formira dvodimenzionalnu mrežu. Laminini su veliki ekstraćelijski kompleksi, glukoproteini ekstraćelijskog matriksa u principu smešteni su u bazalnoj membrani. Laminini mogu da se samosklapaju i vezuju za druge makromolekule matriksa. Kroz njegovo vezivanje sa drugim molekulima laminini kontrolišu razviće i fiziologiju ćelija epidermisa. Laminin, multi adhezivni protein koji formira vlaknastu dvodimenzionalnu mrežu sa kolagenom IV tipa i za mrežu su vezani integrini. Entaktin (nidogen), molekul nalik na prutić i potpomaže inkorporisanje ostalih komponenti. Perlekan molekul sa velikim multidomenima i vezuje se za mrežu, ukršta se sa ostalim komponentama i molekulima sa površine ćelija. Jedna strana lamine je vezana za ćelije adhezionim molekulima, uključujući integrin koji se vezuje za laminin iz bazalne lamine. Fibronektin je glikoprotein koji služi kao spona u ECM. Služi kao opšti ćelijski adhezioni molekul koji učvršćuje bazalnu ćeliju za kolagen ili proteoglikanski molekul. Druga strana bazalne lamine je učvršćena za susedno vezivno tkivo sa slojem fibrila kolagena umetnutih u matriks bogat proteoglikanima. (Harvey Lodish 2004.)

Bazalna membrana je pločasta naslaga ECM, sastoji se od dva sloja, bliže epitelnoj ćeliji – bazalna lamina (glikoproteini, laminin i aktin) i deluje kao barijera za transport i dalje od epidermalne ćelije, retikularna lamina (snopovi kolagena IV koje proizvode ćelije dermisa i obezbeđuju čvrstinu. Ne fibrilaran

kolagen, tip IV ili kolagen bazalne membrane je najzastupljeniji kolagen, specijalizovane strukture nađene u graničnom tkivu isnad epitela i drugih graničnih tkiva. Relativno tanka ploča debljine (tipično 40-50 nm) sastavljena osim kolagena IV tipa od laminina, heparin sulfata, proteoglikana i nidogena čini mrežu otvorene strukture, koja je stabilizovana disulfidnim vezama preko ostataka lizina. Ugljenohidratne komponente bazalne membrane čine n-galaktoza, manoza, fukoza, dezoksiriboza, riboza, glukozamin i sialna kiselina, njihov sadržaj je 9.50%. Pored brojnih funkcija uloga bazalne membrane je da bude difuziona barijera. Gustina fiksiranih naelektrisanja, bazalne membrane, kao jonogenih grupa koji se nalaze u proteoglikanu heparan sulfatu je mala. Pokazatelji mobilnosti hloridnih anjona i alkalnih klatjona se razlikuju u odnosu na one u vodi. U bazalnoj membrani je veća mobilnost Cl^- jona u odnosu na K^+ , Na^+ i Cl^{2+} . Struktura bazalne membrane se menja pod dejstvom pritiska. Strukture membrane se menjaju, umotani filamenti od kojih je sastavljena (elastin) se istežu kako stres deluje na membranu. Smanjenje propustljivosti se odvija uprkos uvećanju površine membrane za 75% i smanjenja debljine 65%. Prolaz vode se odvija kroz cilindrične pore čiji se prečnik smanjuje sa povećanjem pritiska na membranu, odnosno istezanjem membrane. Sama debljina nije neophodna da bi se smanjila propustljivost bazalne membrane čije je prosečno vreme 3h. Voda je konstituent međucelijskog prostora, čiji je deo bazalna membrana, u kom interreaguje sa biološkim molekulima. Razumevanje ove dinamike je od fundamentalnog značaja za funkcionisanje tkiva pa i čitavog organizma.

Potkožno vezivno tkivo (hypodermis, subcutis, tella subcutanea) je od rastresitog vezivnog tkiva sa kolagenim, retikularnim i elastičnim vlaknima koja teku u raznim pravcima sastoji se uglavnom iz masnog tkiva, koje je međusobno odvojeno vezivnim septama u režnjeve. Rastresitost ovog sloja i prisustvo vlakana omogućava pomeranje i istezanje kože do izvesne mere. Između ćelija i vlakana je međucelijska osnovna supstancija. Naročito je upadljivo prisustvo ćelija masnog tkiva, koje su raspoređene u manjim ili većim grupama, između kojih su vezivne pregrade sa većim krvnim sudovima. Kroz potkožno vezivno

tkivo prolaze veći krvni sudovi čiji ogranci daju ispod epiderma subepidermalnu kapilarnu mrežu i u papilama takođe grade splet kapilara (sudovne papile). Limfni sudovi počinju limfnim kapilarima u površnom sloju krzna, oko žlezda i dlaka i izlivaju se u limfnu mrežu u potkožnom vezivnom tkivu. Masne ćelije su velike i nalaze se jedna uz drugu. Osim masti koje čine: gliceridi, oleinska, palmitinska i stearinska kiselina poseduju boju koja potiče od lipohroma i lipofuscina. (Duančić 1983. Karadaglić 2000.) Krvni sudovi kože se sastoje iz arterija, vena i kapilara. Pred njima i iza njih se nalaze arteriole i venule. Arterije se granaju u tri pleksusa: fascijalni, kutani i subpapilarni. Pleksus cutaneus se nalazi na granici kutis – subkutisa i on snabdeva: papilu dlake, folikul, lojne žlezde i izvodne kanale znojnih žlezda. Subpapilarni pleksus se nalazi ispod papila i završnim arterijama snabdeva papile. Najniži je pleksus fascialis u masnom tkivu subcutisa. Subpapilarne vene primaju venozne sudove papila, ali i iz vena hipodermisa. U venozni pleksus na granici kože i potkožja ulaze vene korijuma i subkutanog pleksusa kao i sa fascije. U koži se nalaze i neuro-mioarterijalni glomusi kao komunikacije između arterija i vena, a služe za preraspodelu krvi. Prisustvo limfnih sudova sprovodi funkciju zdravstvene zaštite kože i organizma jer limfna tečnost sadrži "arsenal" ćelija imunološkog sistema koje kruže kroz telo i kožu do limfnih čvorova u kojima se obnavljaju i napadaju sva strana tela koja mogu dopreti do ovih slojeva kože.

Sekrecija aneksnih organa obuhvata sekreciju znojnih i lojnih žlezda. Znojne žlezde luče sekret, koji je sastavljen od 99% tečnosti a 1% iz čvrstih sastojaka naročito od soli NaCl. Izlučivanje znoja zavisi od temperature tela i okoline od autonomnog nervnog sistema od sadržaja tečnosti u krvi kao i psihičkim faktorima. Od sekundarnih struktura najbrojnije su znojne žlezde. Njih u proseku ima oko 3 miliona i mogu biti apokrine ili ekrine. Ekrine žlezde učestvuju u termoregulacionom upravljačkom kolu time što po prijemu stimulusa od strane simpatičkog dela autonomnog nervnog sistema omogućavaju ubrzano odavanje toplote mehanizmom znojenja, potpomognutog izvorima tečnosti koji potiču od povezanosti sa sistemima krvnih i limfnih sudova. Apokrine žlezde imaju drugačiju ulogu i kroz njihove kanale se izlučuju

feromoni. Uz znojne žlezde postoji i nekoliko populacija kontraktilnih ćelija, poput mioepitelnih ćelija u kanalu znojnih žlezda, koje se kontrahuju kako bi istisnule tečnost ka spoljašnjoj površini kože tokom termoregulacionog procesa, kao i mišićne ćelije pripojene folikulu dlake koje su zadužene za formiranje refleksa podizanja dlake kojim se protok vazduha u graničnom sloju u neposrednom dodiru sa kožom delimično usporava ili zaustavlja čime se stvara toplotno izolacioni zaštitni sloj vazduha.

Lojne žlezde su po građi alveolarne i sastavljene su iz više redova ćelija (poliptihe) a luče sekret po holokrinom tipu tj. ćelije se same pretvaraju u loj. Znojne žlezde su tubularne građe sa jednim redom ćelija a luče po merokrinom tipu, tj one pri sekreciji ostaju netaknute. Postoje i apokrine žlezde koje su po tipu sekrecije merokrine, tubularne su, veoma velike po građi i monolitne. Loj iz lojnih žlezda se sastoji od estara holesterola, palmitinske i stearinske kiseline a čini površinu kože mekom, elastičnom i masnom štiteći je od isušenja i delovanja vode i rastvorenih materija u njoj. Jačina sekrecije zavisi od konstitucionalnih faktora i količine masti u hrani.

Povezanost kože i nervnog sistema formira se još u toku embrionalnog razvića ovih tkiva kada se iz ektoderma razvija tzv. nervna kresta, struktura bilateralno uparenih traka ćelija na granici neuralne tube. Ćelije nastale iz nervne kreste migriraju ka brojnim lokacijama u kojima se diferenciraju i poprimaju raznovrsne specifične funkcije. Primeri su ćelije nervnog sistema, kože, lica, nadbubrežnih žlezda, gastrointestinalnog trakta itd. Osim toga, ove ćelije doprinose i izgradnji perifernog nervnog sistema kroz ćelije senzornih ganglija (dorzalna korena ganglija), ganglija simpatičkog i parasimpatičkog sistema, i nervnih pleksusa u unutrašnjim organima. Nervni sistem kože je sastavljen iz senzitivnih cerebrosposinalnih i simpatično-parasimpatičnih nerava. Senzitivni nervi grade mrežu u dubljem hipodermisu odakle idu prema površini kože. Vegetativna nervna vlakna su u vezi sa ramus communicantesima, a pružaju se u spiralama prema zidu krvnih sudova, prema znojnim žlezdama i mm. arrectores pilorum, a protežu se sve do stratuma corneuma, kao prenosioci osećaja boli. One mogu biti i u obliku terminalnih nervnih telašaca, ćelija za

dodir, koje su dobro diferencirane. U ta telašca ulaze nervna vlakna. Takve su građe Merkel-Ranvierove, Krosmayerove svetlije ćelije u bazalnom sloju epiderma, zatim dodirni menisci Grandija u hipodermisu i prava telašca za dodir Maisnerova, koja se nalaze u papilarnom telu. Osim navedenih telašaca nalaze se još i završni klipovi, koji su umotani u deblju kapsulu, a na čijoj je strani smešteno nervno vlakno (*corpora bulbosa Krause*). Ti klipovi leže u gornjem kutisu i služe za osećaj hladnoće. U koži se nalaze još i velika *corpuscula lamelosa Vater-Pačinijeva*, koja se nalaze u subkutisu, a registruju osećaj položaja i lokalizacije. Za osećaj toplote služe Ruffinijeva vretena, terminalni cilindri, slični Pačinijevim cilindrima. Nervi kože pripadaju aksonima čija su tela smeštena u dorzalnoj korenoj gangliji čija veličina varira u proseku od 0.2 - 20 μm . Približno milion nishodnih (afherentnih) nervnih vlakana obavlja funkciju inervacije kože. Ona mogu biti mijelinizirana i nemijelinizirana. Njihova raspodela je neravnomerna jer se većina završava na licu, šakama i genitalijama dok se manji deo završava na ekstremitetima i leđima. Gledano u odnosu na slojeve kože, nervna vlakna se završavaju u dermisu i epidermisu.

Histološka građa dlake, deo dlake nad površinom kože se zove scapus, dok deo uloženi u omotač korena nosi naziv radix pili. Čitava tvorevina se zove follikulus pili. Dlaka se sastoji iz srčike (*supstancia medikularis*), kore (*supstancia corticalis*) i pokožica (*cuticulas epidermicula pili*). Sama dlaka je položena u epidermalnoj i vezivnoj ovojnici. Epitelijalni se deo sastoji iz unutrašnje ovojnice, koju čine *epidermicula vaginae pili*, Huxlijev i Henleov sloj. Spoljašnja ovojnica korena se deli na spoljašnji i unutrašnji deo. Zadnji se sastoji od kolagenih i elastičnih vlakana, te iz duguljastih ćelija, koje imaju sposobnost kontrakcije, a one služe za istiskivanje dlake. Spoljni deo ovojnice korena poseduje uzdužna kolagena i elastična vlakna. Na samoj dlaci razlikujemo papilu, bulbus, donji isthmus, collum folliculi i infundibulum. *Musculi arrectores pilorum* inseciraju u srednjem delu folikula pod lojnom žlezdom, pa se povezuju sa vezivnim omotačem na strani tupog ugla, što ga čini dlaka sa površinom kože. Ti mišići nemaju fiksnu tačku u kutisu, i zato njihova kontrakcija dovodi folikul

dlake u vertikalni položaj. U isto vreme sa tom kontrakcijom se vrši i pritisak na samu lojnu žlezdu i tako ona počinje lučiti loj.

Koža prekriva površinu tela i na taj način ima višestruku zaštitnu ulogu. U prvom redu štiti od mehaničkih povreda, temperaturnih promena, isušivanja, od spoljašnjih hemijskih uticaja, od infekcije jer kroz neoštećenu kožu mikrobi ne mogu da prodru. Ako i prodru kroz nevidljive pukotine u koži, se obično lokalizuje proces i sprečava širenje. Preko kože jedinka održava vezu sa sredinom u kojoj žive i upravlja se prema nadražajima koje prima ne samo preko složenih čula već i čulnim organima smeštenim u koži i ispod kože. U njoj su zastupljeni receptori za prijem toplotnih nadražaja, za hladno i toplo (termoreceptori), zatim za dodir, pritisak i bol (upor. završeci nervnih vlakana). U koži se vrši sinteza vitamina D pod uticajem svetlosti, ultravioletnog zračenja.

Na telesnim otvorima, koža prelazi u sluznice. Fiziološke funkcije kožnog organa su višestruke, a mogu se svrstati u: mehaničku zaštitu od spoljašnjih uticaja, regulatornu funkciju telesne toplote, ekskreciju lojnih i znojnih žlezda, funkcionalne metaboličke zadatke kao i u imunološke fenomene.

Mehanička zaštita kože stvorena je barijerom rožnatog sloja epiderma, koja osim što štiti telo od fizičkih, hemijskih i bioloških pretežno mikrobno gljivičnih štetnih činilaca sprečava i gubitak tečnosti iz organizma. Na mestima na kojima je koža izložena delovanju pritiska, zadebljala je. Masna površina nepovredene kože štiti od marceracije rastvorenih hemikalija. Protiv delovanja sunčeve svetlosti i veštačke svetlosti koža se brani stvaranjem melanina, zadebljanjem rožnatog sloja na epidermisu i jačim lučenjem lojnih žlezda. Mreža kapilara u papilarnom sloju kože sprečava prodor vazduha u dublje slojeve kože, a isto to čini i melanin. Suv rožnati sloj epidermisa služi i kao izolator električnoj struji. Nepovredeni epiderm zaustavlja prodiranje tečnosti u tkivo a isto tako i izlazak tečnosti napolje. Površina kože poseduje kiseo omotač, koji je Ph između 3,3 i 4 a ujedno štiti organizam od invazije mikrobne i gljivične flore. Normalna koža poseduje veliku neutralizacionu moć alkalija što joj omogućuje kontrolu Ph i prodor stranih mikroorganizama. Keratin je rastvorljiv u alkalnom

rastvoru a ne kiselom a naj jače deluje kalijum hidroksid a naj slabije amonijak. (Duančić 1983.) Smanjenjem kožne rezistencije se omogućuje i alergijska senzibilizacija prema spoljašnjim alergenima.

Regulacija toplote organizma se vrši preko nervnog sistema, a sama koža je loš provodnik toplote. Krvni sudovi učestvuju veoma aktivno u regulaciji toplote. Njihovim širenjem telo gubi toplotu a sužavanjem je zadržava. Toplota deluje preko senzitivnih nervnih vlakana na sekreciju znojnih žlezda a isparavanjem znoja se hladi površina tela. Osim primetnog znojenja postoji i neprimetno isparavanje tečnosti u obliku perspiratio insensibilis ili TEWL što zavisi od vlažnosti i strujanju vazduha. U termoregulaciji koža učestvuje i kožnim žlezdama izlučivanjem vode i izvesnih sastojaka (znoj), širenjem i skupljanjem krvnih sudova kože. Kada su krvni sudovi prošireni u koži se mogu zadržati prilične količine krvi. U vezi sa zaštitnom ulogom je i sloj masnog tkiva kože (panniculus adiposus), naročito razvijen u pojedinim životinjskih vrsta, koji čini depo masti i pored drugih kožnih organa učestvuje u termoregulaciji sprečavanjem odavanja toplote. Žlezde u koži luče loj, sekret potreban za održavanje i sprečavanje isušivanja kože (lojne žlezde), a druge pored toga izlučuju proizvode metabolizma (klupčaste žlezde).

Senzibilitet kože omogućuju mnogi senzitivni nervi, čiji su završetci raspoređeni u njoj u obliku tačkica. Autonomni nervni sistem koji se sastoji od simpatičkih i parasimpatičkih vlakana, koja inervišu krvne sudove, lojne žlezde, folikul dlake, glatke mišiće i stvaranje pigmenata. U koži se nalaze nervi za osećaj pritiska, za dodir Neiserovim telašcima, te spletovi vlakana oko folikula dlake. Osećaj hladnoće prenose završni Krausovi organi a osećaj toplote Ruffinijeva telašca.

Sposobnost nagomilavanja materija i metabolita u kožnom tkivu je veoma velika i u vezi je sa endokrinim organima, nervima i vaskularnim sistemom. Koža učestvuje u metabolizmu: ugljenih hidrata, mineralnih materija, vode, azota, masti i glikogena. To svojstvo je omogućeno brojnim histocitima i peritelijama oko krvnih sudova. Resorpcija materija je veoma mala ili uopšte ne

postoji za izvesne materije koje su nerastvorljive u vodi. Respiracije, razmena O_2 i CO_2 je neznatna. Kroz kožu se mogu apsorbovati male količine rastvorenih lipoidnih supstanci, kao i neki gasovi, a preko folikula dlake se mogu apsorbovati neki elementi rastvorljivi u mastima (Hg, Cl, J ...). Iako je koža na površini orožnala, ipak može da primi ili resorbuje izvesne male polarne molekule i gasove. Ona prima neznatne količine kiseonika i oslobađa ugljen dioksid. (Duančić 1983.) Imunološke osobine kože su velike i predstavljaju zaštitnu meru organizma. Koža protiv infektivnih agenasa stvara antitela. Ta se sesilna antitela stvaraju kako na endogene tako i na egzogene infekcije. U koži se stvaraju antitela ne samo protiv proteina nego i protiv supstancija koje same po sebi nisu antigeni nego su polo antigeni ili hapteni. Njihovim spajanjem sa proteinima se stvaraju kompletni antigeni. Sesilna ćelijska antitela stvaraju se pretežno u retikulo-histocitnom sistemu. Antitela koja su stvorena u koži su deset puta jači od onih iz drugih tkiva.

U imunodermatologiji se opisuju ćelijska i humoralna komponenta imunološkog sistema kože i ukazuje se da praktično svaka ćelijska vrsta koja počiva ili prolazi kroz kožu može ispoljiti imunološku funkcionalnost. (Tapio 1989.) Među komponente kožnog tkiva koje su bolje proučene spadaju: keratinocite, limfocite, Langerhansove ćelije i druge dendritske ćelije, monocite i makrofage, endotelne ćelije krvnih i limfnih sudova, mastocite, neutrofile, eozinofile i bazofile. Među molekularne komponente ubrajaju se slobodni radikali, anti-mikrobni peptidi, katekolamini, citokini, hemokini, neuropeptidi, adhezioni molekuli i širok opseg proinamatornih i antiinamatornih medijatora. Imunoglobulini i antitela su dodatni proteinski učesnici imunog odgovora koje sekretiraju aktivirani B-limfociti i imaju ulogu neutralizacije noksinih agenasa. Osim pomenutog, novija oblast foto-imunologija otkriva povezanost produžene stimulacije ultraljubičastim zračenjem poteklim iz sunčeve svetlosti sa povećanim izumiranjem Langerhansovih ćelija ili promenom njihove funkcije. Koža nije samo prijemnik signala od udaljenih hemijskih glasnika već ona ispoljava i aktivnu endokrinu ulogu koja se sastoji u ekspresiji specifičnih hormonskih receptora, organizovanom metabolizmu, aktivaciji i inaktivaciji

hormona u specijalizovanim ćelijama kože (sebocite), ispoljavanje biološke aktivnosti i oslobađanje hormona u cirkulaciju. Primera radi, androgeni poput dehidroepiandrosterona (DHEA) i androstendiona se u koži konvertuju u testosteron i potentniji androgen 5 α -dihidrotestosteron. (Zouboulis 2009.) Hormoni, generalno posmatano, ispoljavaju plejotropno dejstvo na kožu a smatra se da deluju parakrinim, autokrinim, intrakrinim i endokrinim mehanizmima. Osim toga, važna je i povezanost između hormona leptina i insulina. Leptin je proteinski hormon koji igra važnu ulogu u dugoročnoj regulaciji stope metabolizma, telesne težine i reproduktivne funkcije. Ekspresuju ga uglavnom adipocite dok se manje količine sekretuju i od strane epitela želudca i placent. Receptori leptina su visoko ekspresovani u oblastima hipotalamusa, T limfocitima i vaskularnim endotelijalnim ćelijama što upotpunjuje zaključak da su veze kože, endokrinog, nervnog sistema i celog tela mnogosturke i složene.

Brojne pridružene strukture kože funkcionišu i kao neuroendokrini organi čiji je rad izmešten ka periferiji organizma. Osim toga, njihovo funkcionisanje je u mnogome nezavisno od upravljanja posredovanog centralnim mehanizmima za obradu stresa. (Charras 2002.) Nalazeći se na granici između unutrašnje i spoljašnje sredine, neuroendokrini sistem kože poseduje isturene mehanizme za detekciju stresnih uticaja. Poseban značaj u tom smislu je ekvivalentnost komponenti neuroendokrinog sistema kože, hipotalamično-hipofizno-adrenalnoj osovini. Iako "sistem za obradu stresa" u koži nije strukturalno organizovan na sličan način (različita tkiva daju različitu funkcionalnost), on ipak poseduje višestruku funkcionalnost koja se nalazi u jednom istom tkivu a ponekada deluje u okviru samo jedne ćelijske vrste. Glavne funkcije ovog sistema su: proizvodnja hormona koji oslobađa kortikotropine (a potom i proopiomelanokortinske peptide uključujući i endorfine), steroidosinteza (sinteza, metabolisanje i ciljno oslobađanje androgena i estrogena), sekosteroidosinteza (sinteza steroida po razlaganju jedne ili više prstenastih struktura uz adiciju vodonika svakoj terminalnoj grupi), razdvajanje 7-dehidroholesterol izazvano UVB zračenjem (iz koga se

proizvodi vitamin D3) itd. Poznavanje ovih mehanizama postavlja i pitanje postojanja hipotalamičko-hipofizno-tireoidnog ekvivalenta u koži, na šta najistaknutije ukazuje ekspresija funkcionalnih receptora za tireostimulirajući hormon.

Epidermis nastaje prvenstveno od embrionalnog površnog (somatskog) ektoderma, a u njega migriraju melanociti, poreklom iz nervne kreste i Langerhansove ćelije koje nastaju od matičnih ćelija kostne srži. S druge strane, dermis se razvija iz mezodermalnog tkiva i to najvećim delom iz somatopleuralnog sloja lateralnog mezoderma, a manjim delom iz dermatoma. Derivati kože, lojne i znojne žlezde nastaju iz površinskog ektoderma urastanjem u mezoderm, dok se folikuli dlaka razvijaju iz oba klicina lista. Epidermis koji pokriva embrion u početku je jednoslojan. Neposredno po završetku procesa neurulacije (razvoja nervne cevi). Tokom četvrte nedelje, ćelije površinskog ektoderma proliferišu i stvaraju nov površinski sloj sastavljen od ljuspastih epitelnih ćelija – periderm, koji naleže na sloj ćelija sa proliferacijskom sposobnošću i koji se naziva bazalni sloj. Ćelije periderma postepeno otpadaju u amnionsku tečnost. a čitav sloj tako u potpunosti nestaje tokom 21 nedelje. Međutim može da zaostane do rođenja. Specifične karakteristike periderma ukazuju na njihovu ulogu u razmeni materija između amnionske tečnosti i fetusa. Na njihovoj površini zapažaju se mikrovili, koji kasnije zamenjuju prvo pojedinačne, a kasnije višestruke citoplazmatske protruzije. Pred kraj petog meseca protruzije nestaju, tako da membrana površinskih ćelija postaje glatka. Mikrovile i protruzije uvećavaju površinu kože koja je u kontaktu sa amnionskom tečnošću u vezi su sa transportom vode. U toku 11 nedelje intrauterinog razvića, proliferacijom ćelija bazalnog sloja nastaje intermedijarni sloj neposredno ispod periderma. Ovaj sloj prethodi ostalim slojevima zrelog epidermisa. Ćelije intermedijarnog sloja sintetišu keratin i u njima se već zapažaju heteropolimeri. U toku petog meseca razvića, u vreme kada periderm otpada, intermedijarni sloj zamenjuju definitivni slojevi keranocita, stratum spinozum, stratum granulozum i stratum corneum. Ova

transformacija koja uključuje programiranu smrt ćelija, započinje u kranijalnom kraju fetusa i napreduje ka kaudalnom delu. (Karadaglić 2000 g.)

Melanociti naseljavaju kožu iz nervne kreste u toku šeste nedelje intrauterinog razvića i potrebno im je 1-2 nedelje da migriraju u epidermis. Melanociti se zapažaju u dermisu fetusa, međutim najveći deo ovih ćelija se nalazi u toku migracije ka epidermisu. Gustina melanocita povećava se u toku fetalnog razvoja dostižući maksimum oko 2300 ćelija/mm³ na kraju trećeg meseca, da bi se postepeno smanjivao do konačne vrednosti od oko 800 ćelija/mm³. Melanociti predstavljaju 5-10% ćelija epidermisa odraslih osoba. U 10. nedelji mnogi melanociti bivaju udruženi sa razvijajućim folikulima dlaka gde učestvuju u njihovoj pigmentaciji. (Pantić 1980.)

Langerhansove ćelije potiču od prekursora koji se nalaze u kosnoj srži i u epidermisu se pojavljuju u 7. nedelji, da bi do 12. nedelje razvića ispoljavali sve karakterističnije imunocitohemijske markere. Langerhancove ćelije kontinuirano migriraju u epidermis tokom čitavog života. U toku 7-8. nedelje u subepidermalnom delu dermisa zapaža se prisustvo derminih dendrocita.

Merkelove ćelije se pojavljuju u epidermisu u toku 6. nedelje, a najverovatnije nastaju lokalno u epidermisu. Razvijaju se pre pojave nervnih vlakana u epidermisu, pa se smatra da imaju značajnu ulogu u privlačenju nervnih vlakana u epidermis.

Derma-epidermalni sloj je u početku jednostavne građe. Bazalna lamina morfološki je uočljiva od samog početka, ali su u njoj indentifikovani samo kolagen tipa IV i laminin. Hemidezmozomi i ankorirajući fibrili (kolagen tipa VII) tek se kasnije pojavljuju, u vreme pojave keratinizacije epidermalnih ćelija. Najveći deo dermisa nastaje iz somatopleuralnog sloja mezodermalnih lateralnih ploča, dok se deo razvija iz dermatoma somita. U toku 3. meseca, spoljašnji deo dermisa proliferiše i formira dermalne papile, koje urastaju u epidermis. Embrijski dermis sačinjen je iz mreže mezenhimskih ćelija, retkih fibrila i obilne količine osnovne supstancije u kojoj dominira hijaluronska

kiselina. Dermis je tako u veoma hidratisanom stanju; koža fetusa sadrži oko 90% vode, a pred samo rođenje oko 83%. Količina hijaluronske kiseline u dermisu se postepeno smanjuje razvojem fibroblasta i njihovim stvaranjem veće količine vezivnih vlakana i proteoglikana. Količina ekstracelularnog matriksa u toku razvića postepeno se povećava, a povećava se i prečnik kolagenih fibrila. U vezivnim vlaknima dominiraju molekuli kolagena tipa I, III i IV, kao i mikrofibrili kolagena VII. Sa povećanjem prečnika fibrila, procentualno se povećava količina kolagena tipa I, a smanjuje količina tipa III. Kolagen tipa IV pojavljuje se homogeno raspoređen po čitavom dermisu. Tip VII je u početku difuzno prisutan u čitavom dermisu, da bi oko 6. meseca intrauterinog razvića ispoljio ograničenu lokalizaciju, zapažajući se samo u papilarnom dermisu. Nasuprot ovome, kolagen tipa XIV u početku se uočava u vidu primetne mreže oko folikula dlaka (u 19. nedelji razvića), da bi kasnije progresivno zauzimao čitav dermis neposredno pre rođenja. Primitivni dermis ubrzo pokazuje dve zone: gornju, površnu, zbijenog sastava, sa krupnim kolagenim fibrilima i donju zonu sa rastresitim i sitnijim kolagenim fibrilima od kojeg kasnije nastaje retikularni sloj - sekundarno krzno (corium). U njemu se po rođenju, javljaju i elastična vlakna. U prvo vreme njegova granica prema pokožici je vodoravna, ali se u daljem razvoju razvijaju grebeni i useci (cristae et sulci), i granična linija uzima talasast izgled sa mnogobrojnim papilama, zbog čega ovaj površni sloj derma dobija naziv papilarni sloj (pars papillaris cutis). (Kostić 1968 g.)

Krvni sudovi u potkožnom mezenhimu ispod dermisa razvijaju se u toku 4. nedelje. Granaju se dajući pojedinačne sudove koji urastaju u dermis krajem 6. nedelje. U 8. nedelji razvijaju se po dva paralelna pleksusa, duboki i površni vaskularni pleksus. Procenjeno je da u koži novorođenčeta ima oko 20 puta više krvnih sudova nego što je potrebno za metaboličku aktivnost. Ovaj višak je neophodan za termoregulaciju novorođenčeta. Definitivna vaskularizacija kože završava se u prvim nedeljama posle rođenja. (Karadaglić 2000 g.)

Hipodermis se prvi put prepoznaje u toku 4. meseca, kad se vezivno tkivo organizuje u vidu tananih lobulusa, a ćelije postepeno počinju da nakupljaju lipidne kapi i da se transformišu u adipocite. Ovaj sloj se izgrađuje sa krupnim

šupljinama, koje su ograničena vezivnim, ukrštenim, snopovima. (Kostić 1968 g.)

Folikuli dlaka najranije se pojavljuju u predelu obrva, očnih kapaka, gornje usne i brade i to na kraju drugog meseca intrauterinog razvića. Na drugim mestima pojavljuje se tek u 4. mesecu, da bi u toku 5. meseca praktično svi folikuli bili razvijeni, ukupno oko 5 miliona. Folikuli dlake prvo se razvijaju u vidu bazalnog zadebljanja ektoderma, zametka dlake. Smatra se da nastanak ovih zametaka nastaje pod indukcijskim dejstvom mezenhimskih ćelija. Ćelije zametka proliferišu u dermis i razvijaju se u cilindrične tvorevine sa bulbusnim proširenjem na kraju, gde se 4. nedelje posle nastanka zametka razvija udubljenje, dermna papila. U tom delu epidermne ćelije diferenciraju se u germinativni matriks, čijom proliferacijom i specifičnom keratinizacijom nastaje stabljika dlake koja se pomera naviše kroz kanal u folikulu. Od epidermalnih ćelija koje oblažu folikul razvijaju se omotači korena dlake. Prva generacija dlaka nije pigmentisana i naziva se lanugo. One se prvi put pojavljuju u toku 12. nedelje razvića. Najveći broj otpada pre rođenja i biva zamenjen grubljim, pigmentisanim dlakama posle rođenja. (Pantić 1980 g.)

Proliferacijom epidermalnih ćelija nastaju lojne i znojne žlezde. Lojne žlezde uglavnom nastaju iz derivata folikula dlaka. Ovi pupoljci nastaju oko 4. nedelje posle stvaranja zametka dlake. U nekim delovima kože gde nema dlaka, lojne žlezde nastaju proliferacijom epidermalnih ćelija u dermis. U predelu lica, zrele lojne žlezde vide se u toku 6. meseca razvića. Lojne žlezde prilično su aktivne kod fetusa i sedum koji proizvode zajedno sa deskvamiranim epidermalnim ćelijama i ostacima periderma formira zaštitni omotač na površini kože, vernix caseosa.

Apokrine znojne žlezde razvijaju se zajedno sa folikulima dlaka od izdanaka. Te žlezde se razvijaju od izdanaka dlakine grede koje niču na strani koja zaklapa tupi ugao sa pokožicom. Krajem 5. meseca u tim punim celularnim izdancima javlja se pukotina a žlezda počinje da funkcioniše u 7. fetalnom mesecu inicijalno su prisutne u većem delu tela, ali u kasnijoj fazi razvoja se

gube i zadržavaju samo u aksilama, prepucijumu, skrotumu, mons pubisu i labia minora.

Ekrine znojne žlezde nastaju u 20. nedelji razvića od pupoljaka bazalnog sloja epidermisa, sličnih pupoljaka od kojih postaju dlake, koji rastu u dermis i formiraju veoma izuvijane nerazgranate žlezde sa jasno ograničenom pukotinom. Distalni kraj se smotava u klube, obložen u prvo vreme dvorednim a zatim jednorednim epitelom. Centralne ćelije ovih pupoljaka umiru putem apoptoze, a periferne ćelije diferenciraju se u sekrecijske i mioepitelne ćelije, kao i u ćelije izvodnih kanala. Mišićne ćelije znojnih žlezda postaju od metamorfoziranih ektodermalnih ćelija. (Kostić 1968 g. Karadaglić 2000 g.)

Anatomske promene kože povezane sa starenjem ostaju donekle kontraverzne. Zbog varijacije debljine kože od jednog do drugog dela tela čine generalizaciju promene debljine stare kože veoma teškom. Starenje kože je spor ali progresivni degenerativan proces, neizbežan i predvidljivog ishoda. Klinički, ostarela koža je atrofična, suva, naborana sa naglašenim krvnim sudovima, kvalitetom transparentnosti i gubitkom elastičnosti i potkožnog masnog tkiva. Prisutna je izrazita atrofija derma sa destrukcijom kolagenskih i elastičnih vlakana uz poremećaj proliferacijske homeostaze brojnih ćelija i posledične pojave benignih i malignih lezija. Promene u epidermu ostarele kože nisu naročito upadljive. Epidermis postaje vremenom tanji zbog smanjenja broja keranocita i njihove zapremine. Međutim, rožnati sloj uglavnom ostaje neizmenjen u pogledu širine i kompaktnosti tako da su njegove osnovne funkcije u celini očuvane – transepidermalni gubitak vode manji je u ostareloj koži a prijanjanje keratinocita se sa godinama smanjuje. Međutim, detaljnijom analizom rožnatog sloja, zapaža se gubitak i nepravilnost diskretnih površinskih brazda što je verovatno posledica poremećaja arhitekture dermalnih papila. Keratinocite koje produkuje stratum bazale zadržavaju približno 10% epidermalne vode, sa starenjem ovaj sloj postaje tanji i gubi sposobnost da zadržava vodu.

Prosečna površina i zapremina korneocita linearno se povećavaju sa godinama starosti. Povećanje površine korneocita znači istovremeno smanjenje međučelijskih prostora po jedinici zapremine rožnatog sloja što bi moglo da objasni smanjenje transepidermalnog gubitka vode kod starijih osoba. Deskvamacija korneocita takođe je smanjena uz povećanu krutost i smanjenu rastegljivost rožnatog sloja. Kada se ovim osobinama pridoda smanjeni sadržaj vode, lako je objasniti izmenjena mehanička svojstva ostarele kože. Apsorpcija hidrofobnih supstancija uglavnom je neizmenjena, dok je apsorpcija hidrofilnih supstancija smanjena. Verovatno objašnjenje leži u manjem relativnom sadržaju vode i pomenutom smanjenju međučelijskih prostora po jedinici zapremine. U ćelijama granuloznog i spinoznog sloja, najčešće ne mogu da se zapaze znatnije ultrastrukturne promene. Međutim, bazalni keratinociti pokazuju morfološke promene koje mogu da se opišu kao difuzna epidermna displazija – heterogenost u veličini, obliku i prihvatanju histoloških boja. Brzina obnavljanja epidermalnih ćelija značajno je smanjena tako da je vreme zamene rožnatog sloja dvostruko brže kod mlađih osoba. Uz promene u dermisu, opisane izmene fiziologije keratinocita odgovorne su za usporeno zarastanje rana kod starijih ljudi.

Naj upadljivije i naj stalnije promene uočavaju se u predelu dermo-epidermalnog spoja u smislu njegovog zaravnjenja, tj. smanjenja broja dermni papila, odnosno epidermalnih prečki za preko 50% u odnosu na jedinicu površine kože i zadebljanje lamine denze. Dok bazalni keratinociti mladih osoba poseduju brojne citoplazmatične produžetke kojima prodiru u derm, ostarelim bazalnim epidermalnim ćelijama ovi produžetci upadljivo nedostaju. Opisane promene odgovorne su za smanjenje epidermalno-dermne adhezije i naglašeniju sklonost ovako izmenjene kože ka razvoju bula posle manjih povreda ili u sklopu dermatosa kao što su lichen planus ili lichen sklerosus. U epidermisu starijih osoba očigledno je smanjenje broja melanocita i Langerhancovih ćelija. Broj melanocita se smanjuje za 8-20% svakih deset godina posle 30 godina života. Posledica toga je smanjena sposobnost pigmentacije posle izlaganja sunčevoj svetlosti, što sa svoje strane povećava

izloženost bazalnih keratinocita ultravioletnim zracima i verovatnoću nastanka karcinoma bazalnih ćelija. Istovremeno je zabeleženo smanjenje broja melanocitnih nevusa. Paradoksalno u ostareloj koži prisutna je tendencija preostalih melanocita ka fokalnoj proliferaciji i obrazovanju lentiginoznih makula-lentigo senile. Pojedinačni melanociti veći su i morfološki heterogeniji nego u koži mlađih osoba. Smanjenje broja Langerhansovih ćelija jedan je od uzroka oslabljenog imunog odgovora u koži i između ostalog, povećanog rizika od maligne transformacije keratinocita.

Starenjem se sinteza D vitamina u epidermisu smanjuje, a osnovni razlog je, po svemu sudeći, smanjenje količine prekursora, 7-dehidroholesterolola. (Karadaglić 2000 g.)

Derm je najvećim delom sačinjen od vanćelijskog matriksa uređenog u vidu organizovane mreže vlakana i osnovne supstancije. Komponente vanćelijskog matriksa su kolagen, proteini koji čine elastinska vlakna, proteoglikani i glikozaminoglikani. Proteini i ugljeni hidrati vanćelijskog matriksa utiču na rast ćelija i njihovu migraciju u koži, a sami regulišu sopstvenu produkciju. Najvećim delom, komponente vanćelijskog matriksa sintetizuju fibroblasti kao odgovor na raznovrsne stimuluse iz okoline, kao što su faktori rasta koje proizvode keratinociti, inflamacijske ćelije i sami dermni fibroblasti.

Za razliku od epiderma derm, trpi znatno izrazitije promene u procesu starenja kože. Najupadljivije promene su starenje derma, dezorganizacija dermnog matriksa, smanjena vaskularizovanost i hipocelularnost. Posebno je značajno smanjenje broja fibroblasta i mastocita, ćelije koje su odgovorne za produkciju citokina i komponenti vanćelijskog matriksa. Primetan je gubitak fascikularnih kolagenih fibrila koje zamenjuju vlakna dezorganizovanog i granularnog izgleda. Sadržaj kolagena smanjuje se približno za 1% godišnje posle puberteta. Pored smanjenje ekspresije gena za kolagen u dermnim fibroblastima, ustanovljeno je i smanjenje ekspresije gena koji kodira kolagenazu u koži starijih osoba. Istovremeno, ovi geni u fibroblastima znatno

slabije reaguju na egzogeno dodate citokine. Imajući u vidu da se sinteza prokolagena ustaljuje na određenom nivou posle 30. do 40. godine života, logično je pretpostaviti da je smanjenje njegovog sadržaja u toku daljeg života posledica pojačane proteolize. Pojačana ekspresija proteazne aktivnosti mogla bi da objasni ne samo globalno smanjenje sadržaja kolagena u ostareloj koži već i opsežnu destrukciju arhitekture vanćelijskog matriksa koja je upadljiva prilikom mikroskopskog pregleda. Pošto kolagen koži daje čvrstinu, gubitak integriteta kolagenskih vlakana objašnjava sklonost ostarele kože cepanju i pri umerenoj fizičkoj sili.

Hijaluronska kiselina i dermatan sulfat najzastupljeniji su glikozaminoglikani u koži. Hijaluronska kiselina učestvuje u izgradnji i organizaciji vanćelijskog matriksa, pospešuje adheziju i migraciju ćelija i zadržava veliku količinu vode u vanćelijskom prostoru pospešujući transport jona i hranljivih materija u koži. Hijaluronska kiselina postoji u slobodnom obliku i vezana je za tkivo pomoću proteina koji vezuju hijaluronsku kiselinu hijaloadherini (fibrinogen, kolagen, CD44, albumin, hijaluronidaza itd). U dermu je hijaluronska kiselina uglavnom vezana za mikrofibrile kolagena i leži između kolagenskih i elastinskih vlakana. U procesu starenja ukupna količina hijaluronske kiseline značajno se ne menja, ali je ustanovljena promena njene distribucije unutar kože, povećanje tkivno-vezane frakcije i promena molekulske mase. Verovatno je da se u procesu starenja kože primarno odigravaju značajne izmene u sastavu i koncentraciji hijaloadherina i da su one odgovorne za izmenjenu funkciju i distribuciju hijaluronske kiseline.

Lokalizacija hijaluronske kiseline u epidermisu i dermu odraslih osoba: u epidermisu opada u srednjem delu spinoznog sloja kao i u bazalnom sloju, u dermalnom sloju se uvećava koncentracija u papilarnom dermu dok opada u periferiji kolagenskih mikrofibrila i prostoru između kolagenskih i elastinskih vlakana.

Iako čini svega 2% ukupnih proteina kože, elastin je od presudnog značaja za elastičnost kože. U toku starenja postoji upadljiva i progresivna

dezintegracija elastinskih vlakana u papilarnom dermu tako da je posle 70. godine života ovim procesom zahvaćena većina vlakana. Smanjen je broj i prečnik elastinskih vlakana koja izgledaju fragmentovana, posebno u dermo-epidermalnom regionu, sa "čupavim" krajevima koji upućuju na delovanje elastoznih enzima. Postoje takođe naglašene fokalne nepravilnosti u rasporedu elastinskih vlakana. Slični, ali daleko izrazitiji poremećaji nalaze se kod solarnog oštećenja kože. Dakle, karakteristika hronološkog starenja kože je progresivna autodestrukcija elastinskih vlakana koja započinje posle 30. godine života i postaje izražena posle 70. godine. (Karadaglić 2000 g.)

Naj upadljivije su promene zabeležene u sadržaju i kvalitetu elastinskih vlakana – smanjenje izodezmozina i intaktnih elastinskih molekula sa povećanjem koncentracije elastinskih fragmenata. Proces starenja u koži posledica je smanjenja sadržaja elastina, njegove pojačane degradacije i lakog smanjenja sadržaja kolagena. U koži starijih osoba registruje se smanjen broj kapilarnih petlji u papilarnom dermu dok je površina poprečnog preseka dermnih venula smanjena za 35% što se klinički manifestuje u vidu bledila kože i sniženju temperature. Broj mastocita praktično je prepolovljen, što je verovatan razlog smanjenog prisustva angiogenih činilaca u dermu. Adventicijska potpora zidova krvnih sudova oslabljena je, što uz degeneneraciju elastinske komponente, objašnjava povećanu sklonost krvarenju u koži (modrice) kod starih osoba. Broj i sekrecijska funkcija ekrinih žlezda smanjuju se sa godinama života. Gubitak organizacije žlezdanog tkiva i gomilanje lipofuscina u epitelnim ćelijama prate ove promene u funkciji. Kod starijih osoba postoji hiperplazija lojnih žlezda uz istovremeno smanjenje produkcije loja, približno za 20-30% svakih 10 godina života posle puberteta. Lojne žlezde uvećane su sa mnogim hiperplazijskim lobulusima. Dlaka takođe trpi značajne promene u procesu starenja. Broj termalnih dlaka i dlakinih folikula smanjuje se i kod muškaraca i kod žena. Dlake sede zbog smanjenog odlaganja melanina. Sede dlake sadrže vaskuolizovane, slabo pigmentovane melanocyte, dok ih u potpuno belim dlakama nema ni u papili ni u stablu dlake. Kosa je posebno sklona gubitku pigmenata, odnosno smanjenju broja melanocita, zbog značajno

većeg broja dlaka u anagenu nego u telogenu – dužom proliferacijom u anagenu dolazi do iscrpljivanja melanocita. Čulna percepcija u ostareloj koži je smanjena. Smanjen osećaj uz naglašeniju reakciju na štetne stimulse verovatno ima za posledicu iritaciju i lakše povređivanje ostarele kože.

Prethodno pomenute strukturne i funkcionalne promene u dermu ostarele kože uzrokuje rigidnost i ne elastičnost tkiva sa smanjenom sposobnošću remodelovanja u odgovoru na stres. Prema tome promene nastale kao posledica hronološkog starenja klinički su prilično neupadljive – stanje kože sa finim borama i gubitak elastičnosti. Histološke promene takođe su nespecifične i predstavljene progresivnim istanjenjem i gubitkom elastinske mreže u dermu, povremeno uz fokalno zadebljanje i dezorijentaciju kolagenskih vlakana. Sa starenjem se smanjuju funkcije kože: proliferacija ćelija, odgovor na oštećenje tkiva, barijerna funkcija, uklanjanje hemijskih materija, čulna percepcija, mehanička zaštita, imunski odgovor, vaskularna reaktivnost, termoregulacija, produkcija znoja, produkcija loja i sinteza vitamina D. (Karadaglić 2000 g.)

U morfogenezi i dinamičkom preuređivanju derma i drugih vezivnih tkiva središnju ulogu imaju fibroblasti. Proces preuređivanja (remodelovanja) podrazumeva klazijsku ili destruktivnu fazu u kojoj ćelije razaraju vanćelijski matriks i blastni stadijum u kojem sintetizuju nove proteine i glikozaminoglikane. Fibroblasti, poput drugih ćelija, iskazuju najmanje dva fenotipa, u zavisnosti od prirode signala koje primaju iz okoline. U stanju mirovanja fibroblasti se samo povremeno dele i sintetišu male količine proteoliznih enzima. U odgovoru na brojne stimulse, uključujući povredu i zapaljenje, fibroblasti menjaju svoj fenotip (faza aktivacije) ulaze u ćelijski ciklus i povećavaju produkciju proteolitičkih enzima u vidu proenzimske forme. Proenzimi metaloproteinaza lokalno se aktiviraju i započinje destrukcija vanćelijskog matriksa. Aktivnost kolagenaze dramatično raste već prvog postoperativnog dana na mestu sature. Porodica matriksnih metaloproteinaza ima središnju ulogu u proteolizi dermnog matriksa. Kolagenaza je ključni enzim u degradaciji kolagena koji započinje njegovu digestiju tako da molekul

kolagena, "odmotan" njenim delovanjem, dalje razara enzim gelatinaza. Stromelizini 1 i 2 poseduju širu specifičnost za supstrat i deluju na fibronektin protein jezgra proteoglikana, ne heliksni deo elastina, kolagen II, IV, i VI, laminin, prokolagene I i III i gelatin. U aktivaciji kolagenaze i stromelizina najvažniju ulogu verovatno ima plazmin. Poput kolagena I elastin podleže neprestanom procesu remodelovanja ali je ovaj proces znatno sporiji – ključni enzim u njegovoj degradaciji je elastaza. Imajući u vidu centralnu ulogu fibroblasta u održavanju integriteta derma i činjenicu da se u toku procesa starenja najvažnije promene odigravaju upravo u ovom segmentu kože, logično je pretpostaviti da je starenje na neki način povezano sa funkcijom ovih ćelija. Fibroblasti vezivnog tkiva imaju ograničenu sposobnost ćelijske deobe, približno 50-100 deoba u zavisnosti od starosti. Prilikom dostizanja ovog broja deoba, proliferacija ćelija se usporava i one postaju refraktorne na indukciju proliferacije faktorima rasta. Zatim je uočeno da somatske ćelije sa povećanjem broja deoba progresivno gube telomerne sekvence na krajevima svojih hromozoma. Na taj način, svakom deobom ćelije gube približno 50-200 baznih parova telomernih sekvenci pošto somatske ćelije, za razliku od germinativnih i tumorskih, ne iskazuju enzim telomerazu koja je sposobna da oporavi telomerne sekvence. Dakle, progresivni gubitak genetskog materijala je, po svemu sudeći, glavni ograničavajući činilac u deobi somatskih ćelija i fenomenu starenja.

Mirujući fibroblasti u dermu dele se na svakih 1-5 godina ali, kako je prethodno naglašeno uz adekvatne stimulse brzo ulaze u ćelijski ciklus i menjaju ekspresiju brojnih gena. Kad se uporede fibroblasti stare i mlade osobe, zapaža se da su ostale ćelije ne samo izgubile moć proliferacijskog odgovora u prisustvu serumskih faktora rasta, već i sposobnost modulacije funkcije fibroblasta u modelovanju vanćelijskog matriksa. Međutim ostareli fibroblasti nisu blokirani u pravom stanju mirovanja već se nalaze u stadijumu neprestane delimične aktivacije. Telomerna hipoteza nudi moguće objašnjenje ovog stanja - kritični gubitak telomernih sekvencija DNK izaziva aktivaciju kontrolnih mehanizama koji blokiraju ćelijski ciklus. (West 1994 g.)

Istraživana su svojstva slojeva ljudske kože za dva različita tipa vode za piće: N-normalna flaširana voda i Z- Zrenjaninska česmenska voda, koja sadrži više puta povećanu koncentraciju arsena (99,4 µg/l dozvoljeno 10 µg/l), četiri puta više ortofosfata (0,64 mg/l dozvoljeno 0,15 mg/l), potrošnju KMnO₄ (35,47 mg/l dozvoljeno 8 mg/l) (što predstavlja prisustvo organskih, huminskih, kiselina) od MDK, povećanu koncentraciju amonijaka (1,22 mg/l dozvoljeno 1 mg/l), duplo više rezidualnog (slobodnog) hlora (1 mg/l dozvoljeno 0,5 mg/l), gvožđa (0,53 mg/l dozvoljeno 0,3 mg/l) i nitrita (0,06 mg/l dozvoljeno 0,03 mg/l) od MDK, veću elektro-provodljivost (1217 µS/cm² dozvoljeno 1000 µS/cm²). Istraživanjem je obuhvaćeno 20 dobrovoljaca koji su pili pretežno Z-vodu, od kojih su 15 dobrovoljaca prešli na N flaširani tip voda a 5 dobrovoljaca nastavili da piju Z vodu. Za sve njih je karakterisana površina kože (podlaktica sa unutrašnje strane) sa OMF i bioimpedancom, onda je uklonjena sva nečistoća sa površine kože (prašina, površinske masnoće, površinska voda itd.) sa flasterom i karakterisan prvi sloj stratum corneum sa oba metoda, kao i ostatke rožnog sloja OMF metodom sa samog flastera. Onda je korišćen flaster i karakterisan je prvi sloj stratum granulosum zatim su karakterisani ostatci stratum granulosum na samom flasteru, potom je uklonjena prva polovina stratum granulosum i karakterisana je koža OMF metodom i bioimpedancom, karakterisani su i ostaci stratum granulosum na samom flasteru, i na kraju je uklonjena druga polovina stratum granulosum i karakterisana je voda u lipid-voda slojevima na samoj koži OMF metodom i bioimpedancom i potom su karakterisani ostaci stratum granulosum na samom flasteru. Od dana eksperimenta tokom sledećih devet nedelja, petnaest dobrovoljaca su pili uglavnom Z vodu, počeli su da piju N vodu. Posle devet nedelja karakterisali smo epidermis istom procedurom kao ranije. Ostalih pet dobrovoljaca su nastavili da piju Z vodu (kontrolna grupa) i takođe su karakterisani procedurom kao ranije. Eksperiment je nastavljen još 16 nedelja i ponovljena je ista procedura. U eksperimentu, su učestvovali dobrovoljci različitih godina (od 23 do 78), pola (šest muškaraca i devet žena) i tipa kože dva i tri. U kontrolnoj grupi je bilo svih pet učesnica ženskog pola (43 do 97 godina) Učesnici su dali

pristanak pre eksperimenta. Relativna vlažnost i sobna temperatura su 48 ± 0.2 % i 22 ± 0.3 °C.

OMF tehnika je zasnovana na svojstvima elektrona materije (kovalentne veze, vodonične veze, jon-elektron interakcije, van der Waals interakcije) i njihove interakcije sa svetlošću. OMF je metoda u čijoj osnovi je interakcija elektromagnetnog zračenja sa materijom u opsegu vidljive svetlosti, koja stepen interakcije prenosi sa tankih površinskih slojeva na pristupnost većim dubinskim regijama u tkivu koje mogu varirati od nekoliko desetina mikrometara sve do nekoliko stotina mikrometara. Stepenn dubine ispitivanja interakcije zavisi kako od optičkih osobina tkiva tako i od talasne dužine primenjene svetlosti koja je u slučaju metode OMF polihromatska (difuzna bela svetlost). Na ovaj način odabrana pobuda sadrži komponente svih talasnih dužina, unutar opsega od 400-800 nm, i u kožu prodire približno do slojeva papilarnog derma. Prednosti metode OMF u odnosu na ostale optičke metode su:

1. Jednostavna aparatura i rukovanje, brz postupak snimanja uz istovremenu digitalizaciju svih prikupljenih informacija.
2. Dobijanje selektivnih informacija o magnetnim osobinama materijala na bazi optičkih svojstava (interakcija).
3. Brza obrada velikog broja uzoraka.
4. Površina koju je moguće istražiti je velika u poređenju sa ostalim metodama.

Metod je originalno razvijen za rani kancer kože i otkrivanje melanoma od MySkin, Inc., USA. (Koruga Tomic 2008. Bandic Koruga Mehendale Marinkovich 2008.) OMF metod je korišćen za karakterizaciju plazme krvi, kontaktna sočiva i vode. Algoritam za analizu podataka je zasnovan na hromatskom dijagramu zvanom „Maksvelov trougao” i skup operacija za odnos prema (R-B)&(W-P). Skraćene oznake znače da crvene minus plave talasne dužine bele svetlosti i reflektovana polarizovana svetlost (zasnovana na

Brevsterovom uglu) su korišćene za algoritam spektralnog skupa za izračunavanje podataka za optomagneti fingerprint materije. (Koruga 2008.)

Merenje bioimpedance je urađen sa BIA-1 (NanoLab, Serbia) analizator na 9, 30, 47 i 100 KHz, sa ulazom napona od 1.5 V do 5.0 V (pik prema pik), sa dve elektrode (nerđajući čelik dijametra 10 mm, razdaljina između centara elektroda je 30 mm).

Urađena je biopsija kože četiri ispitanika u ORS Hospital Beograd. Skinut je sloj kože do dermisa sa svim stratumima epidermisa, kod tri dobrovoljca nakon unošenja N vode tokom 9 nedelja i jednog dobrovoljca koji je nastavio da pije Z vodu. Uklonjeni slojevi Kože su istraživani AFM Mikroskop Atomske Sila (NanoProbe JEOL, Japan).

5. SADRŽAJ, METODE I TEHNIKE ISTRAŽIVANJA

5.1. Sadržaj istraživanja

U ovom poglavlju opisane su metode i tehnike koje se upotrebljavaju kao i definisanje biološke vrednosti vode, razmatranje sa raznih aspekata. Data je formula i obrazloženi su detaljno svi elementi koji ulaze u sastav formule za biološku vrednost vode: $BVV = MB + HS + \text{odnos H-O-H/X-H...Y-H} + \text{veličina i tip klastera (veličina i vrsta jonsko-vodenog kompleksa)} + \text{paramagnetizam/diamagnetizam vode (dinamike kompleksa jona i vode)}$.

Nečistoće u vodi čine: gasovi: ugljen dioksid, azot, kiseonik, amonijak. Suspendovane i koloidne čestice: glina pesak skeleti biljaka. Rastvorene soli: soli koje čine tvrdoću, soli koje ne čine tvrdoću. Organski sastojci: organske kiseline, šećer, alkoholi, humus, treset, mikroorganizmi. Mnogi od sastojaka vode za piće su prirodne materije, koje se unose u vodu iz tla i vazduha. Neki su prirodni proizvodi otpad ljudi i životinja. Ostali su veštačke ili sintetičke materije koje nalaze svoj put do vode.

Voda za piće mora da zadovolji određene higijensko-zdravstvene kriterijume. Ti kriterijumi podrazumevaju mikrobiološku, fizičko-hemijsku i organoleptičku ispravnost vode. Tu su još i zahtevi vezani za radioaktivnost, pesticide, teške metale i ostale specijalne supstance. Dozvoljeno je da 5% uzoraka vode godišnje (17 dana godišnje) bude mikrobiološki neispravno, budući da to ne ostavlja posledice po zdravlje. Kada je reč o hemijskoj ispravnosti vode, dopušteno je konzumiranje hemijski neispravne vode do 20% uzoraka, praktično 72 dana u toku godine. Međutim, treba naglasiti da tzv. toksične supstance imaju tačno ograničenje kada se prevedu u maksimalno dozvoljene koncentracije, voda se označava kao neispravna za piće, odnosno ako se radi o toksičnim supstancama, zabranjuje se za humanu upotrebu. Voda u procesu dezinfekcije, od proizvođača do potrošača na česmi, mora da sadrži određenu količinu preparata, zbog sekundarnog zagađenja, u

ovom slučaju hlora, to su vrednosti od 0,3 do 0,5 mg po litru vode koja se permanentno unosi. U zavisnosti od sadržaja organskih materija, proizvodi dezinfekcije su bromidi, organski ugljenik i drugi, može doći do specifičnih reakcija između hlornih preparata i organskih materija u vodi i stvaranja jedne grupe jedinjenja, tzv. trihalometana, koji su mutageni, odnosno karcinogeni, bromata, izvesnih kiselina i ostalih. Mikrobiološke zagađivače čine bakterije, virusi i protozoe. Voda je značajan izvor transmisije različitih infektivnih agenasa (bakterija, virusa, gljiva i helminata) pa se mikrobiološke karakteristike javljaju kao značajan parametar kvaliteta vode. Mikroorganizmi mogu inficirati čoveka konzumiranjem kontaminirane vode za piće. Mikrobiološke osobine su: ukupne koliformne bakterije (gram negativni štapići koji fermentišu glukozu uz proizvodnju kiseline i gasa na $t = 37\text{ C}^\circ$ tokom 48 h), koliformne bakterije fekalnog porekla (fermentišu glukozu na $t = 44\text{ C}^\circ$ u roku od 24 h), ukupan broj mezofilnih bakterija, *Pseudomonas aeruginosa*, streptokoke fekalnog porekla, sulfitoredukujuće klostridije, *Proteus* vrste, ukazuju na ne samo fekalno zagađenje nego i na prisustvo organskih materija u procesu raspadanja. Sulfitoredukujuće bakterije su pokazatelji fekalnog zagađenja jer redukuju sulfite i sulfide u crevnom traktu ljudi i životinja. Najveći značaj za mikrobiološki kvalitet vode imaju patogene koliformne bakterije *E. coli*, *Salmonella typhi* i druge salmonеле, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Najčešći uzrok mikrobiološke neispravnosti su: povećan broj aerobnih, mezofilnih i ukupnih koliformnih bakterija, *E. coli* i *Streptococcus faecalis*. Najrasprostranjenije bolesti koje se prenose vodom, prouzrokovane su unosom vode, koja je kontaminirana fekalijama koje sadrže patogene bakterije ili viruse su: kolera, tifus, amebna i bacilna dizenterija. Svojstva mikrobioloških agenasa u vodi za piće je da nisu rastvoreni u vodi već su izdvojeni. Često su u vidu suspendovanih čestica, tako da se infektivna doza ne može odrediti iz njihove prosečne koncentracije. Verovatnoća za nastanak infekcije zavisi od invazivnosti i virulencije patogenog agensa, kao i od imuniteta pojedinca. Ako infekcija nastane patogeni se razmnožavaju u domaćinu tako da ne poseduju kumulativno dejstvo voda za piće ne sme sadržati patogene agense, indikatore fekalnog zagađenja, niti enteroviruse. Sve pijaće vode ne smeju sadržati *E. coli*

ili termostabilne koliformne bakterije ni u jednom uzorku u 100 ml, kao ni u jednom uzorku prečišćene i dezinfikovane vode od 100 ml vode. Bakteriološki parametri od kojih zavisi upotrebna vrednost vode je: ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija u 1cm^3 , najverovatniji broj ukupno prisutnih koliformnih bakterija u 1dm^3 , broj sulfitoredukujućih klostridija u 1dm^3 vode, kao i konačne identifikacije svih izolovanih bakterija. Na kvalitet vode u zavisnosti da li se koristi površinska ili podzemna voda, utiču fiziološke grupe bakterija: razgrađivači organskih materija, heterotrofne i oligotrofne bakterija, kao i broj proteolitičkih, saharolitičkih, amilolitičkih i lipolitičkih bakterija. Čestice zagađenja fino rastvorene, mineralnog i organskog sastava se mogu naći suspendovane u vodi za piće i proizvode negativne efekte na ljude. Mnoge vrste čestica posredno, putem adsorpcije olakšavaju transport toksičnih supstanci i patogenih organizama i utiču na efikasnost dezinfekcije. Čestice organskog sastava mogu indirektno omogućiti stvaranje hlornih jedinjenja reakcijom sa hlorom u vodi. Potrošnja KMnO_4 ukazuje na povećanje sadržaja organskih materija koje troše KMnO_4 i redukuju kiseonik, maksimalno dozvoljena koncentracija utrošenog KMnO_4 je do 12 mg/l.

Neorganski sastojci vode su rastvorljivi gasovi (kiseonik, ugljen dioksid, azot, radon, metan, vodonik sulfid.). Pozitivni joni metala i metaloida (Al, As, K, Mg, Na, Ca, Zn, Cu, Mn, Se, Pb, Hg, Cd, Cr, Sn, Mo, Ni...) Neki su i pri vrlo niskim koncentracijama štetni za ljudski organizam (Pb, Hg, As i Se) drugi su u određenim koncentracijama esencijalni za ljudski organizam (Ca, Mg, K, Na). Negativni joni su: fluoridi, hloridi, nitrati, fosfati, sulfati i karbonati. Sintetske organske materije (pesticidi, benzen, aromatični ugljovodonici, ugljen-tetrahlorid u vodu dolaze preko zagađenja, uglavnom su toksični po ljude a mnogi i karcinogeni. Osnovni fizičko-hemijski i hemijski parametri, koji utiču na kvalitet vode za piće su: temperatura, ukus, miris, boja, mutnoća, providnost, prisustvo plivajućih štetnih i opasnih materija, Ph vrednost, rastvoreni kiseonik, procenat zasićenja kiseonikom, petodnevna biohemijska potrošnja kiseonika, količina kiseonika u mg/ml potrebna za oksidaciju biorazgrađivih organskih materija (BPK), utrošak kalijum permanganata, hemijska potrošnja kiseonika

(HPK), totalni organski ugljenik, suspendovane materije, ukupni fosfati, ortofosfati, elekroprovodljivost, suvi ostatak, alkalitet, ukupna tvrdoća, gvožđe, amonijačni azot, nitriti i nitrati. Dopunski hemijski parametri su sadržaj: hlorida, fenola, anjonskih deterdženata, bakra, cinka, olova, nikla, kadmijuma, arsena, žive i mineralnih ulja. Periodično ispitivani parametri su: organohlorni insekticidi (DDT, HCH i Lindan), triazinski herbicidi (atrazin, simazin, propazin), derivati hlor fenoksi karbonskih kiselina, policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) i polihlorovani bifenili (PCB). (Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće 1999.) Parametri vode značajni za zdravlje, koji se rutinski ispituju predstavljaju: organoleptički (ukus, miris, boja prozirnost) izmjenjena ukazuju na prisustvo nečistoća i fizičko-hemijski.

Miris, faktor koji utiče na kvalitet vode za piće, većina organskih materija i neke neorganske utiču na ukus ili miris i zamućenost.

Boja u vodi može biti zbog neorganskih jona, kao što su gvožđe i mangan ili humusa i treseta.

Mutnoća vode je smanjenje transparentnosti zbog prisustva praškastih materija, kao što su glina i mulj, fino raspršenih organskih materija, planktona ili drugih mikroorganizama. Svi oni uzrokuju da se svetlost raspršava i apsorbuje. Koloidne materije obezbeđuju mesta za apsorpciju hemikalija koje mogu biti štetne za zdravlje ili uzrokuju neželjenu promenu mirisa i ukusa. Maksimalna dozvoljena vrednost je 1NTU.

Temperatura utiče na ukus vode i osnovni je fizički pokazatelj stanja vode (zavisi od mesta nalaženja i godišnjeg doba za podzemne vode je 10°C). Ph u vodenom rastvoru je u prirodnim vodama generalno između Ph 4 i Ph 9 obično je regulisan ravnotežom između CO₂ i karbonata. Većina voda je neznatno bazna, (veća od Ph 7), zbog prisustva bikarbonata i karbonata. Varijacije u Ph nastaju uglavnom zbog hidrolize soli jakih baza i slabih kiselina ili obrnuto. Rastvoreni gasovi kao ugljen dioksid, vodonik sulfid i amonijak

takođe utiču na Ph vrednost. Ph ispod 6 omogućuje koroziju oslobađajući Zn, Pb, Cd, Cu. Prihvatljive vrednosti Ph su: 6,5-9.

Tvrdoća vode je uzrokovana prisustvom u vodi polivalentnih metalnih katjona i uglavnom je zbog Ca^{++} i Mg^{++} jona. Tvrdoća je mera sposobnosti vode da reaguje sa sapunom. Apsolutno meke vode su neukusne, korozivne su i rastvaraju metale, u vezi su sa kardiovaskularnim bolestima. Tvrdoća vode se izražava kao ekvivalent u količini kalcijum karbonata. U zavisnosti od interakcije drugih faktora kao Ph i alkalitet nivo tvrdoće između 80 i 100 mg/l se smatra da poseduje prihvatljiv odnos između korozije i taloženja. Smatra se da je prihvatljiva tvrdoća od 800 mg/l.

Specifična provodljivost je kapacitet vode da provodi električnu struju. Ova osobina zavisi od prisustva jona i stoga je pokazatelj prisustva jona. Ovo svojstvo se odnosi na ukupnu količinu jonizovanih materija u vodi i temperature na kojoj se vrši merenje. Priroda raznih rastvorenih materija, njihove stvarne i relativne koncentracije i jonske jačine suštinski utiču na provodljivost vode. Maksimalno dozvoljena koncentracija jona je 1000 mg/l što odgovara provodljivosti od 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$.

Gvožđe može biti u količini od nekoliko miligrama po litri bez promene boje ukusa i zamućenosti. Ukus se ne menja pri koncentraciji ispod 0,3 mg/l. Zamućenost i boja mogu da se razvijaju u cevima na koncentraciji 0,05 do 0,1mg/l. Potreba za unos gvožđa u organizam je 10-50 mg/danu. Gvožđe ima mali rizik za zdravlje ali je smetnja u preteranim količinama. Dugo konzumiranje vode sa povećanim sadržajem gvožđa može dovesti do Kronove bolesti, oboljenja jetre (hemosiderosa). Gvožđe potstiče rast gvoždevitih bakterije i daje rđast izgled, kolonije ovih bakterija mogu formirati sluz koja izaziva probleme u vodi. Povećana koncentracija izaziva neprijatan miris i sjaj na površini vode.

Hloridi su jedan od glavnih neorganskih anjona u vodi. U vodi slan ukus proizvodi jon hlorida čija je koncentracija promenljiva i zavisi od hemijskog

sastava vode, ukus slanoće je promenljiv u zavisnosti od hemijskog sastava vode. Nema podaka da su hloridi povezani sa zdravljem ljudi. Ograničenje koncentracija vode je 250 mg/l. Visok sadržaj hlorida dovodi do korozije metalnih cevi i metalnih delova. Nema dokaza da je unošenje hlorida štetno za ljude.

Ukupno rastvorene čvrste materije su suvi ostatak nakon zagrevanja na 103-105 °C. Mnoge rastvorene materije u vodi su nepoželjne. Rastvoreni minerali, gasovi, organski sastojci mogu da dovedu do pojave neugodne boje mirisa i ukusa. Neke od organskih materija koje su rastvorene u vodi mogu trošiti rastvoren kiseonik, druge su inertne tokom biološke oksidacije, dok su neke kancerogene. Vode visoke koncentracije su laksativi i često mogu biti izvori zdravstvenih problema. Mera je koncentracije mineralnih materija u vodi i predstavlja opšti pokazatelj kvaliteta vode.

Sulfat se prirodno nalazi u vodi, visoke koncentracije, naročito u kombinaciji sa magnezijom, imaju veliki fiziološki efekat čišćenje, dehidrataciju, iritaciju gastrointestinalnog trakta. Prisustvo sulfata u vodi za piće dovode do primetne promene ukusa, sulfati doprinose koroziji cevovoda. U prirodnim vodama mogu biti prisutni u koncentraciji od nekoliko mg/l do nekoliko hiljada mg/l. Maksimalno prihvatljiva koncentracija je 500 mg/l.

Nitrati, obično se javljaju u tragovima ali mogu biti visokih nivoa u nekim podzemnim vodama. Pojavljuju se zbog oksidacije amonijum jedinjenja ili usled oksidacije nitrita i mogu biti toksični u koncentraciji od 1mg/l, dovodi do bolesti methemoglobinemije kod beba. Maksimalno dozvoljena koncentracija nitrata je 45 mg/l. Izvori su raspadanje organskih materija i geoloških formacija koje sadrže rastvorljiva jedinjenja azota. Veće koncentracije predstavljaju zdravstveni rizik.

Alkalitet je kvantitativna sposobnost vode da reaguje sa jakim kiselinama i označava se sa Ph. To jest kapacitet vode da neutrališe kiseline. Funkcija je karbonata, bikarbonata i sadržaja hidroksidnih jona. Visoka koncentracija

dovodi do neprijatnog ukusa, poremećaja sistema organa za varenje i formiranja kamenca. Maksimalna poželjna koncentracija je 500 mg/l.

Magnezijum je opšti konstituent prirodnih voda. Magnezijumove soli bitno doprinose tvrdoći vode koje se talože i daje glavni doprinos tvrdoći vode. Koncentracija magnezijuma može da varira od 0 do nekoliko stotina mg/l, pri visokim koncentracijama nije rizičan za zdravlje. Poreklom je iz stena koje sadrže magnezijum. Može da doprinese neželjenom ukusu, iz estetskih razloga je maksimalno dozvoljena koncentracija 200 mg/l.

Kalcijum je jedan od važnijih sastavnih molekula u stenama. Jedan je od najvažnijih sastojaka prisutan u vodama od 0 do nekoliko stotina mg/l u zavisnosti od izvora i tretmana. Jedan je od glavnih razloga za tvrdoću i nije rizičan za zdravlje u povećanim koncentracijama. Prisustvo kalcijuma je usled prolazka vode kroz i preko krečnjaka, dolomita i drugih sedimenata koja sadrže kalcijum. Ne postoje maksimalno prihvatljive granice za kalcijum.

Bakar se nalazi kao sulfid, oksid, karbonat ili mineral u stenama, široko je rasprostranjen u prirodi. Bakar prirodno ulazi u vodu raspadom minerala, kao industrijski, kao insekticid i iz bakarnih cevi za distribuciju. Može da se javi u obliku jona ili u kompleksnim grupama kao što su cijanidi, hloridi, amonijak ili organski ligandi. Rastvorene soli bakra u malim koncentracijama su otrovne. Važan je i koristan element u organizmu čoveka i smatra se netoksičnim osim u velikim koncentracijama. Učestvuje u koroziji aluminijuma i cinka i daje vodi nepoželjan gorak ukus. Poželjna granica za bakar je 0,05mg/l.

Mangan, unos može biti visok do 20 mg/danu bez očiglednih loših efekata. Može biti neprijatan ako je deponovan u vodovodu i dovodi do promene boje i ukusa vode. Koncentracije ispod 0,1 mg/l su prihvatljive, koncentracija mangana može da varira sa lokalnim okolnostima. Izaziva nagomilavanje bakterija u vodovodnim cevima. Maksimalno prihvatljiva koncentracija je 0,05mg/l.

Fluoridi su u tragovima prisutni u mnogim vodama. U većim su koncentracijama u podzemnim vodama. Koncentracija fluorida se razlikuje od vrste stena kroz koje protiču i obično ne prelazi 10 mg/l. Povećana koncentracija fluorida je povezana sa stomatološkim i skeletnim fluorozama (1,5 mg/l) ili sa karijesom <1mg/l. Maksimalno dozvoljena koncentracija je fluorida u vodi za piće je 1,5 mg/l.

Cink, bitan je i koristan element u telu. Smatra se da nije toksičan. Voda koja sadrži više od 0,5 mg/l cinka poseduje tendenciju da se prelijeva, na površini, a kad se kuva razvija masni film i poseduje nepoželjnu osobinu da skuplja usta. Koncentracija iznad 5 mg/l može dovesti do gorkog ukusa i promenu boje vode pa predstavlja maksimalnu dozvoljenu koncentraciju.

Fosfat, javlja se u tragovima u mnogim prirodnim vodama. Povećana koncentracija omogućuje rast algi u vodenim rezervoarima. Nisu primećene štetne pojave kod ljudi.

Karbonati mogu postojati kad Ph vode prelazi 8,3 što se retko dešava u prirodnim vodama, maksimalno prihvatljiva koncentracija ne postoji.

Bikarbonati su glavni oblik alkalnosti. Prekomerne količine bikarbonata u kombinaciji sa kalcijumom dovodi do taloženja tokom zagrevanja.

Hidroksid doprinosi ukupnom alkalitetu vode, skoro nikad nije prirodno prisutan u vodi. Natrijum dospeva u vodu raspadanjem soli sedimenata i kontaktom sa magmatskim stenama. Maksimalna dopuštena koncentracija je 300 mg/l.

Kalijum, koncentracija u vodi za piće dostiže jedva 20 mg/l iako je sedmi po zastupljenosti na zemlji. Ne postoji maksimalno dozvoljena koncentracija u vodi.

Bor široko rasprostranjen u prirodi, nivoi u vodi su široko promenljivi i viši u podzemnim nego u površinskim vodama. Dospeva erozijom iz prirodnih

izvora. Maksimalna prihvatljiva koncentracija je 5 mg/l, vrednosti iznad imaju zdravstvene efekte.

Selen, sadržaj u vodi za piće je 0,01 mg/l i izvor je samo 10% od dnevne potrebne doze selena.

Aluminijum, ne postoji maksimalno dozvoljena koncentracija aluminijuma u vodi za piće. U velikim količinama izaziva oštećenje nervnog sistema, bubrega i srca.

Arsen, prirodni izvori kao što je tlo je čest uzrok pojave arsena u vodi. Broj poremećaja kod ljudi je povezan sa unosom arsena preko vode za piće. Nema dokaza o bilo kojoj specifičnoj bolesti povezanoj sa arsenom, maksimalno dozvoljena koncentracija arsena je 10µg/l.

Barijum, prisutan je u magmatskim i sedimentnim stenama. U vodi se javlja samo u tragovima uprkos izobilju u prirodi. Može izazvati ozbiljne defekte na srcu, krvnim sudovima i nervnim ćelijama. Maksimalna dozvoljena koncentracija je 1 mg/l.

Kadmijum, glavni izvor je hrana, pa unos vodom treba da bude što manji. Prihvatljiva maksimalna količina u vodi je 0,005 mg/l.

Hrom, prirodno je najčešće u trovalentnom stanju, ne smatra se otrovnim, u sirovoj vodi se može oksidovati do šestovalentnog stanja tokom hlorisanja, u ovom stanju je toksičan za ljude.

Olovo, prirodne vode retko sadrže više od 0,005 mg/l. Olovo može biti prisutno u vodi iz prirodnih izvora ili samog domaćinstva. Olovo je opšte metabolički otrov koji izaziva različite poremećaje kod ljudi, posebno nervnog sistema. Deca su najosetljivija na trovanje olovom. Maksimalna prihvatljiva doza za ljude je 0,01mg/l.

Uranijum dospeva u vodu iz prirodnih sedimenata i iz fosfatnih đubriva koja poseduju uranijum prosečno 150 ppm i mogu doprineti sadržaju uranijuma

u podzemnoj vodi. Konzumiranje većih količina uranijuma doprinosi oštećenju bubrega. Maksimalno dozvoljena koncentracija iznosi 100 µg/l.

Cijanidi su otrovi za čoveka, koriste se u mnogim industrijskim procesima. maksimalna prihvatljiva koncentracija je 200 µg/ml

Živa je toksični element, sa posebno štetnim dejstvom na centralni nervni sistem. Nema fiziološki korisnih funkcija u organizmu. Maksimalna koncentracija prihvatljiva za živu je 1µg/l, vode sadrže daleko manje žive od tog nivoa.

Primarne elemente koji utiču na zdravlje, u vodi za piće čine maksimalne koncentracije, za šest metala: barijum, kadmijum, hrom, olovo, živa i srebro. Dodatni metali su berilijum, kobalt bakar, magnezijum, mangan, molidben, nikal, kalaj, vanadijum i cink. Natrijum je naročito interesantan zbog njegove asocijacije sa drugim metalima. Drugi neorganski sastojci vode koji poseduju značaj za čoveka čine: arsen, selen, fluor, nitrat, sulfat, živa i olovo.

Voda za piće treba da bude: bistra, bezbojna, bez mirisa i ukusa, organskih primesa, ne suviše tvrda i mikrobiološki ispravna.

Opasnost od unošenja hemijskih materija u vodi za piće se ocenjuje laboratorijskim studijama toksičnosti i epidemiološkim istraživanjima, koje imaju za cilj da pruže informacije o zdravlju čoveka. Rizik je samo deo jednačine za biološku ispravnost vode, drugi deo je korist za izloženo stanovništvo. Nemoguće je garantovati vodu bez rizika. Većina eksperimentalnih rezultata na kojima počiva sadašnje znanje o toksičnosti su zasnovani na proučavanju posledica doza na čoveka i životinje i većih doza od onih koje su mnogo veće od uobičajenih koncentracija u vodi. Velika je neizvesnost u proceni rizika po zdravlje koji unošenje neke materije može imati na čoveka jer postoji kombinovani efekt dva ili više zagađivača.

Biološki pokazatelj kvaliteta, određivanje vrste i količine bakterija u vodi, zavisi od fizičkih i hemijskih karakteristika, prirodno voda sadrži ne patogenu mikrobiološku populaciju

Najčešći uzroci fizičko-hemijske neispravnosti vode su: povećana mutnoća i boja, povišene koncentracije amonijaka, nitrata, nitrita, gvožđa, mangana, arsena kao i povećan utrošak KMnO_4 .

Higijenski ispravna voda za piće je voda koja odgovara u pogledu: mikrobioloških osobina, fizičkih, fizičko-hemijskih i hemijskih osobina, neorganskih, organskih supstancija i pesticida, ostataka dezinfekcionih sredstava i sporednih proizvoda dezinfekcije, radioloških osobina. Maksimalno dopuštene koncentracije neorganskih materija u vodi za piće u ppm su: NH_3 , As, Cu, Ba, B, CN, Zn, F, Cr, Cl, Cd, Ca, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, NO_3 , NO_2 , Pb, Se, Hg. Maksimalno dopuštene koncentracije organskih supstanci u vodi za piće u ppm su: aromatični ugljovodonici, policiklični aromatični ugljovodonici, hlorovani alkani, hlorovani benzoli, hlorovani eteni, pesticidi, koagulaciona i flokulaciona sredstava, dezinfekciona sredstava i sporedni proizvodi dezinfekcije.

Pošto voda nije prost rastvarač i inertan medijum za biohemijske reakcije, tj. odvijanje životnih funkcija, BVV nije samo MB+HS, kako se doskora tvrdilo i ugrađivalo u normativna akta o higijenskoj ispravnosti vode za piće, već i strukturisana zbog njenog polarnog karaktera i stoga obrazovanja mreže vodoničnih veza. Treba u opštu formulu za BVV uključiti i odnos vodoničnih veza koje se formiraju između molekula vode i vodoničnih veza koje molekuli vode formiraju sa drugim atomima koji su prisutni u vodi, što čini kapacitet vode da brzo i efikasno hidratiše biološke strukture, od čega isto zavisi BVV. Druga komponenta vode od koje zavisi njen hidratacioni potencijal tj. biološka vrednost je veličina i tip klastera vode, koji su spontani oblici samoorganizovanja molekula vode, što je posledica veličine i vrste vodenog jonskog kompleksa. Dinamika obrazovanja i razgradnje ovih vodenih kristala je praćena promenom odnosa dijamagnetizma i paramagnetizma što je posledica

promene spina valentnih elektrona molekula vode, a time i svojstava vodonične veze, od čega zavisi formiranje molekularnih struktura vode.

Biološka vrednost vode je određena, pored njene mikrobiološke vrednosti i hemijskog sastava i njenom prostorno vremenskom samo-organizacijom na koju utiču sve materije rastvorene u njoj. Sve hemijske i fizičke osobine vode zavise od vodoničnih veza, lokalno menja svoju gustinu kako vodonične veze postaju pravije i jače ili iskrivljene i slabije. Tečna voda se sastoji od mešavine kratkih, pravih i jakih vodoničnih veza i dugačkih slabih i izvijenih vodoničnih veza sa mnogo prelaza između ovih ekstremnih stanja, ova rastojanja i njihove varijacije rastu sa povećanjem temperature.

Vodonična veza je entalpijski povoljan, kvazi linearan vodonični most između dva negativno polarizovana nevodonična atoma, koji dovode jezgra nevodoničnih atoma na rastojanje manje od zbira hemijske veze donora i vodonika i odgovarajućih van der Waalsovih radijusa. Sa formiranjem vodonične veze između dva molekula vode, redistribucija elektrona menja sposobnost za dalje vodonično vezivanje. Svaki molekul vode na sobnoj temperaturi učestvuje prosečno u 3.59 vodonične veze. Molekul vode koji daje atom vodonika ima povećanu gustinu elektrona i to je region "usamljenog para", koji potstiče obrazovanje vodonične veze i prihvatanjem molekule vode joj se smanjuje gustina elektronskog oblaka u kiseonikovom atomu i njegovom preostalom regionu "usamljenog" para, koji potstiče dalje davanje ali sprečava dalje primanje, obrazovanje vodonične veze. Vodonične veze se račvaju, kad su oba vodonikova atoma jedne molekule vode povezani vodoničnim vezama, ili jedan vodonikov atom istovremeno formira vodoničnu vezu sa druga dva molekula vode, kad poseduju manje od pola snage normalne vodonične veze (veza se popola razdvaja) i poseduje malu energiju za preuređenje vodonične veze. Bilo kakva nužna rotacija može takođe izazvati savijanje ili istežanje drugih vodoničnih veza. Račvanje vodoničnih veza ne uzrokuje raskidanje mreže molekula vode i jedino se dešava kad se prekinuta vodonična veza oslobađa a usamljen par prihvata dolazeću vodoničnu vezu donora. Grananje na tri dela vodonične veze, kada jedan vodonikov atom formira istovremeno

vodoničnu vezu sa tri molekula vode formirajući lik tetraedra, ima samo jednu šestinu snage normalne vodonične veze po svakoj trećini račvaste vodonične veze. Energija vodonične veze zavisi od pritiska, temperature i trenutne okoline molekula vode od oprjentacije i pozicije ostalih atoma koji su sa ili bez vodoničnih veza i u opsegu vrednosti je od 4.5 do 10 kcal/mol ili 20 KJ/mol. Što je jača vodonična veze to je slabija kovalentna, što utiče na daljinu vodonične veze a time i na njenu jačinu. Energija linearne vodonične veze zavisi od relativne orjentacije molekula vode zbog vodonične veze. Ove vodonične veze mogu brzo da se rearanžiraju kao odgovor na promenu uslova i okruženja. Eksponecijalno vodonična veza slabi sa dužinom, prekida se kad je dužina veze veća od 0.31 nm ili ugao veze manji od 146° , mada najveći deo energije vezivanja preostaje i uzrokuje mnogo savijanja, ali kraće veze mogu biti relativno jake. Različite komponente doprinose energiji vodonične veze: elektrostatičke interakcije između usamljenog para elektrona i protona susednog molekula vode doprinose najviše oko 7 kcal/mol, razmena elektrona koja je praćena polarizacijom orbitale i vrednosti se menjaju u okviru jednog reda veličine, kvantno mehničkim efektima elektrona i jezgara atoma, odbijanje je rezultat preklapanja elektronskih orbitala usled rastojanja manjeg od zbira van der Waals radijusa. Energija vodonične veze je veoma osetljiva na nelokalne efekte stanja najbližeg susednog molekula vode. Obrazovanje ili raskidanje vodonične veze može uvećati ili smanjiti obrazovanje ili raskidanje vodonične veze u okolini. Kooperativni efekt, uticaj okolnih molekula vode na formiranje vodonične veze, se ogleda u skraćivanju O-O razdaljine, izduživanju donorske O-H veze, uvećanju 1.5 KJ mol^{-1} energije vodonične veze, menjanje moda rastezanja O-H donorske veze. Ovo utiče na smanjenje ili uvećanje vodonične veze. Vodonična veza između molekula vode traje 1 - 20 ps dok je vreme raskidanja oko 0.1 ps sa "klimanjem". Dužina H-O kovalentne veze u molekulu vode je 0.1 nm dok je dužina O...H vodonične veze 0.18 nm. Vodonična veza povezuje atome X i Y koji poseduju veću elektronegativnost nego atom vodonika tako da je X-H, kovalentnom vezom vezan atom sa atomom vodonika, pretstavlja donor vodonične veze dok je Y akceptor vodonične veze. Termodinamička stabilnost jonskog kompleksa u rastvoru je jako zavisna od

ovakvih vodoničnih veza. Među atomske razdaljine u X-H...Y sistemu su različite, X je u vodi kiseonik i njegova razdaljina od atoma vodonika je 95-110 pm vezan kovalentnom vezom za atom, dok je rastojanje vodonične veze u zavisnosti od drugog atoma ~160 do 200 pm (u slučaju vodonične veze između molekula vode dužina veze je prosečno 195 pm) gde je X: O, N C, halogen a Y: O, N, S, halid, halogen itd. Različite vrste voda se razlikuju po svojim odnosima između vodoničnih veza među molekulima vode, gde je atom kiseonika akceptor i drugih oblika vodoničnih veza gde je neki drugi elektronegativniji atom sa usamljenim parom elektrona akceptor. Odnos vodoničnih veza različitih karakteristika: dužine, energije, trajanja i ugla vodonične veze u vodi određuje brzinu i efikasnosti hidratacije, biološke vrednosti vode, koja zavisi od interakcija molekula vode sa raznim elektromagnetnim poljima. Dužina vodonične veze koja je najpovoljnija za njenu organizaciju a time i za svojstva hidratacije je 162 pm što je u skladu sa pravilom zlatnog preseka. Vodonična veza poseduje dualnu prirodu, klasičnu, elektrostatičku i kvantnomehaničku prirodu, električne i magnetne sile valentnih elektrona molekula vode su određene Plankovom konstantom. Vodonične veze mogu biti jake da liče na kovalentne i poseduju mnoge od njenih osobina dok druge mogu biti toliko slabe da se teško mogu razlikovati od van der Waals interakcija. Da bi neka X-H grupa formirala vodoničnu vezu X ne mora biti izrazito elektronegativna nego je potrebno da X-H grupa bude neznetno polarna, ovaj uslov ispunjavaju grupe kao C-H, P-H i neki hidridi. X-H grupa reverzne polarnosti može formirati direkcionalnu interakciju koja je paralelna sa vodoničnom vezom. Suprotni deo Y ne mora biti delimično elektronegativni atom ili anjon nego može biti snabdevan sterički dostupnom koncentracijom negativnog naelektrisanja. Opseg energija disocijacije vodoničnih veza može biti od 0,2 do 40 Kcal/mol⁻¹. Moguće funkcije i delimično tip vodonične veze zavisi od hemijskog sastava vode. Veoma jake vodonične veze se formiraju ako se Pk_a vrednosti podudaraju dok ako se veoma razlikuju vodonične veze nisu previše jake. Vodonične veze u rastvorima mogu biti: jonske, kvazi kovalentne, jake, umerene, slabe. Jake vodonične veze mogu biti grupisane u nekoliko klasa, vodonične veze asocirane sa negativnim i pozitivnim jonima. Jača vodonična veza je više linearna, ugao X-

H...Y veze je bliži vrednosti 180° i kraća je H...Y razdaljina. Slabe nekonvencionalne vodonične veze C-H...X, X-H...C i C-H...C nisu uvek paralelne i razlikuju se od van der Waals interakcije po karakteristikama zavisnim od rastojanja, lakše se raskidaju, duže su sa uglom bližem 90° , radije bifurkiraju, vodonikov atom učestvuje u dve vodonične veze. Mreža vodoničnih veza može da se karakteriše u odnosu na X i Y atome, zbog njihovih različitih fizičkih i hemijskih svojstava, korisnije je da se razvrstaju na intra i inter molekularne.

Glavni faktor u dinamici i trajanju vodoničnih veza između molekula vode je interakcija jona sa molekulima vode usled čega i određuju strukturu i dinamiku mreže vodoničnih veza, delimično razgrađuju mrežu vodoničnih veza i njihove razdaljine. Joni menjaju mrežu vodoničnih veza u vodi. Molekuli vode teže da interreaguju sa različitim materijama koji su u njoj rastvorene, od kojih su mnoge naelektrisane, zbog svoje polarnosti. Hidratacioni broj je broj molekula vode koji je vezan za rastvorak tako da čine njihov sastavni deo. Hidratacioni broj varira sa različitim molekulima rastvorka. Na^+ 3.9 ± 0.5 , Ca^{2+} 12 ± 2 , Al^{3+} 22 ± 2 , Fe^{3+} 18 ± 2 molekula. Molekuli vode formiraju hidratacioni omotač oko molekula rastvorka. Oko rastvoraka se formira i sekundarni visoko uređeni omotač. Kooperativno ponašanje molekula vode igra suštinsku ulogu u različitoj dinamici molekula vode u različitim okruženjima. Ultra brza dinamika vode i voda jon interakcije je od velikog značaja za razumevanje interakcije u bulk vodi i mnogo kompleksnije voda rastvorak interakcije. Dinamika molekula vode se odvija u opsegu 1 do 100 fs. Hidratacioni omotač vode oko jona formira relativno postojanu dobro definisanu strukturu. Razlike između hidratacionih omotača i bulk vode su rezultat velike razlike u vremenskoj razmeri fluktuacija koje utiču na dužinu vodonične veze. U hidratacionom omotaču fluktuacije su rezultat veoma sporih deformacija hidratacionog omotača koje uključuju reorganizaciju velikih delova lokalne strukture vode. U bulk vodi fluktuacije utiču na dužinu vodonične veze, ovaj proces je lokalne prirode što ga čini znatno bržim. Priroda ovih fluktuacija vode sa elektronskim stanjem rastvorenih materija je od ključnog značaja za hemijsku reaktivnost vode, odgovor različitih vodenih rastvora na različite vrste elektronskih

poremećaja uključujući poremećaje dipolnih momenata ili naelektrisanja rastvorka uzrokuje promenu dinamike i organizaciju mreže vodoničnih veza. Dinamika vodoničnih veza između hidratacionog omotača i molekula bulk vode je mnogo sporija nego dinamika vodoničnih veza u bulk vodi. Za izmenu molekula vode između hidratacionog omotača i bulk vode je potrebno vreme od 1 ps do nekoliko stotina ps. Vodonične veze između para- H_2O , ne poseduju osnovno stanje spina, jače su i traju duže od vodoničnih veza između orto- H_2O molekula vode. Monovalentni jon u vodenom medijumu se sastoji od centralnog naelektrisanja okruženog slojem molekula vode u termalnom kretanju. U prvom hidratacionom omotaču ili koordinisanom omotaču molekuli vode su jako povezani sa centrom jona, dok su ostali slojevi vode više ili manje pokretni. Pojedinačan monovalentan jon poseduje sferički hidratacioni omotač orjentisanih molekula vode dok je voda oko ovog omotača kontinualni dielektrični medijum. Molekularna konfiguracija vode unutar hidratacionog omotača je električna i kratkog dometa interakcija između jona i ovih molekula vode. Unutrašnji omotač je sferična šuplina sa niskom dielektričnom konstantom na račun dielektričnog zasićenja zbog veoma jakog električnog polja. Za par jona situacija je mnogo komplikovanija. Razmak između jona nije manji od 90% pojedinačnog jonskog kompleksa. Suprotan jon igra ulogu u definisanju strukture i dinamike vode. Priroda anjona determiniše stepen reda u rešetki i postojanje hidratacije.

U vodi lanci vodoničnih veza su kooperativni dok su molekuli vode dezorganizovani i u stalnom pokretu. Karakterizacija i vizuelizacija vodenih struktura, njenih dinamičkih svojstava i njene distorzije je zbog prisustva rastvoraka moguća. Vodeni rastvor elektrolita omogućuje funkcionisanje hemijskih mehanizama prirodnih i bioloških sistema, koji značajno zavise od vrste jona prisutnih u rastvoru. Na strukturu i dinamiku molekula vode izvan prvog hidratacionog omotača jona u rastvoru utiču molekuli jona. Voda i jon poseduju kratkodometne jon dipol interakcije. Rastvor vode se može smatrati kao rastvor dve vrste voda jedan je u prvom hidratacionom omotaču i ostalih skupova vode na koje naizgled ne utiče prisustvo jona u vodi. U kojoj meri se ovi

strukturni efekti mogu zanemariti u odnosu na dinamiku jonskih rastvora je i dalje nejasno. Da bi se razumeli jonski rastvori kao i organizacija vode, potrebno je ne samo detaljno razumevanje dinamike i strukture ova dva tipa voda, nego i potpuno razumevanje mehanizma konverzije ove dve vrste populacija vode. U vodenom okruženju rastvoreni joni funkcionišu kao polarizabilan medijum koji favorizuje razdvajanje jona koji se privlače. Molekuli vode su orjentisani u hidratacionom omotaču. Molekularna priroda vode daje udeo u budućim efektima hidratacije. Međusobni uticaj između energetike vodoničnih veza i efekta pakovanja molekula vode u velike gustine ima uticaja u kompleksnoj dinamici u kojoj kooperativna hidrataciona kretanja mogu biti važna za prelazno stanje. Disocijacija jonskih parova može obuhvatiti barijeru prelaza u pravcu kolektivnih koordinata koje nisu jednostavne da se lociraju i karakterišu. Karakteristika hidratacije jona u vodi je esencijalna za razumevanje uloge ovih jona u hemijskim i biološkim procesima. Kad voda intereaguje sa supstancom koja je rastvorena ona ne može učestvovati u drugim procesima hidratacije. Drugi efekat jona je promena lokalne organizacije molekula vode izvan hidratacione sfere. Polarizacija i transfer naelektrisanja poseduje kooperativni efekat. Adsorpcija i deadsorpcija vode je pokrenuta kompeticijom između površine jona i jon/voda energije vezivanja i kontinuirano se odvija u zavisnosti od termalnih efekata. Oko jona se stvara hidratacioni omotači, koji u zavisnosti od stepena hidratacije može biti delimično popunjen. Manji joni sa većom površinskom gustinom naelektrisanja su bolje hidratizani za razliku od većih jona sa manjom gustinom površinskog naelektrisanja. Hofmaisterova serija klasifikacije jona po njihovoj sposobnosti da menjaju strukturu vode tj. da stvaraju hidratacioni omotač koji je više ili manje labavo vezan za jon ukazuju na gustinu površinskog naelektrisanja. Jako hidratizani $Mg^{2+} < Li^+ < Na^+ < Cs^+$ slabo hidratizani za katjone i ne usporavaju reorijentaciju molekula vode dok su kod anjona jako hidratizani $SO_4^{2-} > Cl^- > I^- > ClO_4^-$ slabo hidratizani i usporavaju dinamiku reorijentacije molekula vode u hidratacionom omotaču. Mreža vodoničnih veza molekula vode je sposobna da omogući brzu rekonfiguraciju, da primi i olakša hidrataciju jona ili omogući hemijsku reakciju. Uticaj naelektrisanih čestica na dinamiku vodoničnih veza je izuzetno važan.

Hidratacioni omotači služe kao primarni hladnjaci za višak energije za različite hemijske transformacije, fluktuacije vode u tečnom stanju definišu koordinate reakcija, određuje reakcije sa slobodnom energijom i određuju dinamiku reakcija vode. U prelaznom stanju skupa prvi hidratacioni omotač stvara prostor za molekule vode koje dolaze i gustina vode raste u drugom hidratacionom omotaču. Molekularna praznina između drugog i trećeg hidratacionog omotača ubrzava ovo rearanžiranje. Smanjuje se trend hidratacije sa povećanjem veličine anjona i katjona. Za male hidratizane jone kraće je vreme za reorganizaciju molekula vode u odnosu na veće jone. U hidrataciji jona postoji kooperativnost. Rigidna hidratacija se odvija u kombinaciji jakog katjona i jakog anjona kod koje je voda fiksirana u svim pravcima. Polu rigidna hidratacija se odvija u slučaju kombinacije jakog jona sa slabo hidratizanim suprotno naelektrizanim slabim jonom kod kojeg voda nije fiksirana u svim pravcima. Sa porastom koncentracije jona se usporava dinamika mreže vodoničnih veza. Naj veći efekt na dinamiku hidratacionih veza dolazi od hidrofilnih grupa koje usporavaju dinamiku mnogo više od hidrofobnih grupa koje stvaraju jače vodonične veze i ispoljavaju umeren efekt na kinetiku prekida mreže vodoničnih veza. (Harvey Lodish 2004.)

Ultrabrza dinamika između molekula vode i voda jon interakcije se znatno razlikuju što je od velikog značaja kako za razumevanje teorijskih aspekata tako i za razumevanja interakcija u bulk vodi i složenih interakcija između vode i makromolekula. Biološka vrednost vode je određena i dinamikom ovih raskida vodoničnih veza, kao i veza jon voda koji trajanjem u bulk vodi i hidratacionom omotaču oko jona, utiču na raspoloživost, efikasnost i brzinu vodoničnih veza za hidrataciju bioloških struktura. Ovaj proces je izazov, jer se dinamika vode odvija u opsegu od nekoliko desetina do nekoliko stotina femtosekundi dok su kod jona od stotinak femtosekundi do nekoliko pikosekundi. Ova dinamika ukazuje da je vibraciona eksitacija molekula vezane vode odvojena od vibracione ekscitacije bulk sistema vode. Dinamika, trajanje i ponovno formiranje vodoničnih veza sa raznim jonima se razlikuje i zavisi od veličine jona, površinske gustine naelektrisanja i osobina samog jona. Trajanje

voda voda vodonične veze sa kalcijumovim jonom je duže nego ta interakcija sa natrijumovim ili amonijumovim jonom. Vodonična veza između polarne grupe i molekula vode se raskida i ponovo formira brže kod kalcijumovog jona, indukujući da postoji jako nadmetanje između jona i molekula vode na površini kompleksa. Uvođenjem jona se raskida postojeća mreža vodoničnih veza, molekuli vode se rearanžiraju da bi se smestio jon. Molekuli vode su sa raskinutim vodoničnim vezama što je energetski nepovoljno, međutim sam jon može da formira vodonične veze sa molekulima vode, što kompenzuje gubitak vodoničnih veza između molekula vode, što rezultuje u ukupnoj negativnoj slobodnoj energiji hidratacije. Doprinos ovih favorizovanih jon voda interakcija zavisi od jačine i od broja vodoničnih veza koji se formiraju tokom hidratacije jona. Veće naelektrisanje uzrokuje jače vodonične veze, dok manje naelektrisanje uzrokuje slabije vodonične veze. Pored toga znak naelektrisanja je od važnosti za energiju hidratacije. Hidratacija anjona je povoljnija od hidratacije katjona zbog rasporeda molekula vode u prvom hidratacionom omotaču oko anjona koji je mnogo kompatibilniji sa prirodnom strukturom vode. Veliki jon remeti lokalnu mrežu vodoničnih veza u većoj meri, što je energetski nepovoljno. Naelektrisanje je kod velikih jona više delokalizovano što uzrokuje slabljenje vodoničnih veza sa vodom. Veći jon poseduje veći hidratacioni omotač i zato formira vodonične veze sa više molekula vode što je povoljnije. Ukupan efekt na mrežu vodoničnih veza jako zavisi od specifičnosti jona, od geometrije i veličine hidratacionog omotača. Veći joni poseduju manju energiju hidratacije od malih jona. Voda jon vodonična veza je jača od voda voda vodonične veze jer uticaj spoljnog polja mnogo više uznemirava molekule vode. U sistemu voda joni postoji kompeticija između voda jon kompleksa i voda voda molekula. Vezivanje molekula vode oko jona različitih veličina je u vezi sa lokalizacijom naelektrisanja. Sasvim je različita hidratacija kod delokalizovanog naelektrisanja. Vezivanje jon voda je ekstramno jako, jer mali joni poseduju veće naelektrisanje. Različiti joni poseduju različite energije vezivanja i uznemiravanje lokalne strukture vode. Kolektivna dinamika molekula vode je uslovljena ekvilibrijumom voda rastvorak interakcije elektrostatičke energije i imaju iznenađujuću sličnosti sa bulk svojstvima. Joni koji razbijaju strukturu

vode imaju u blizini površine veći uticaj. Ovo utiče na dinamiku reorijentacije molekula vode i mobilnost jona. Veoma mali joni teže da se suprotstave otvorenoj strukturi vode, zato što pokušavaju da reorijentišu okolne molekule vode sa koncentracijom naelektrisanja molekula vode ka naelektrisanju jona i guraju reorijentisane molekule unutra težeći da zatvore strukturu. Veći jon (odgovarajuće veličine zavisne od gustine sistema) mogu stabilizovati otvorenu strukturu, jer veći joni mogu puniti praznine lakšim guranjem molekula vode. Hidratacioni omotač oko većih jona je sličan hidratacionom omotaču oko gasa. Joni su grupisani u dve grupe kosmotropi i haotropi prema tome da li stvaraju red ili nered u vodi. Oba tipa jona su okružena molekulima vode koji formiraju hidratacioni omotač koji ih razdvaja od ostalih jona. Kosmotropi snažno vezuju okolnu vodu i stoga poseduju veću pozitivnu aktivacionu energiju za razliku od haotropa koji slabije vezuju molekule vode. Hidratacioni omotač se sastoji od jednog sloja molekula vode, jaki kosmotropi mogu posedovati 5-6 molekula vode u svom hidratacionom omotaču za razliku od jakog haotropa koji može vezati jedan ili nijedan molekul vode i molekuli vode mogu formirati međusobno vodonične veze, zatvaraju jon u strukturu nalik kavezu, klatrat, manje je krut hidratacioni omotač i vodonične veze brže menjaju ili reorijentišu partnere. Geometrija jona je limit broja molekula vode koja je asociirana u neposrednom susedstvu sa hidratisanim jonom. Mali broj molekula vode u neposrednom susedstvu sa jonom, koordinacioni broj može imati vrednost od 4 do 9 za katjon u zavisnosti od njegove veličine. Primarne hidratacione sfere katjona treće periode Na^+ Mg^{2+} i Al^{3+} se sastoje od šest molekula vode oktaedralno raspoređeni, i verovatno koriste 3s 3p i dve od tri d atomskih struktura oko katjona. Fe^{2+} poseduje sedam molekula vode u prvom hidratacionom omotaču. Sekundarni hidratacioni omotač se sastoji od molekula vode koje su vodoničnim vezama vezani za molekule vode primarnog omotača i ispoljavaju elektrostatičke interakcije sa centralnim jonom. Sekundarni omotač se graniči sa bulk vodom. Veoma je brza izmena molekula vode između različitih pozicija oko jona i bulk vode. Hidratacija anjona je elektrostatička sa dodatnim povezivanjem vodoničnim vezama. Broj molekula vode zavisi od veličine naelektrisanja i prirode jona. Monoatomske anjoni kao halidni joni poseduju

primarni hidratacioni omotač sličan hidratacionom omotaču monoatomskog katjona.

Magnetska svojstva vode mogu se objasniti ponašanjem elektrona. Elektron poseduje naelektrisanje i kako se kreće proizvodi magnetno polje. Njegovo orbitalno i spinsko kretanje doprinose magnetnim svojstvima. Svaki elektron u atomu ima orbitalni i spinski dipolni moment koji se vektorski zbrajaju i daju rezultatni magnetski dipolni moment elektrona. Rezultatni dipolni momenti pojedinih elektrona u atomu daju vektorsku rezultantu magnetskog dipolnog momenta atoma. Rezultatni magnetski dioplni moment pojedinih atoma daje rezultatni magnetski dipolni moment vode. Voda sa dijamagnetskim svojstvima poseduje malu negativnu susceptibilnost, dok voda sa paramagnetskim svojstvima poseduje malu pozitivnu susceptibilnost. Susceptibilnosti paramagnetskih i dijamagnetskih stanja vode su reda veličine 10^{-6} . Voda sa dijamagnetskim svojstvima u spoljnjem magnetskom polju stvara slab dipolni magnetski moment sa smerom suprotnim spoljašnjem magnetskom polju. Ovi dipoli, tj. vrtložne struje, stvaraju se na atomskom nivou i to nezavisno od tipa atoma. Ako je spoljašnje polje neuniformno, na dijamagnetski materijal vodu djeluje sila koja ga odvlači od područja s većim magnetskim poljem u područje s manjim poljem. Kad se valentni elektron nađe u magnetskom polju indukuje se električno polje koje djeluje tako da ubrzava ili usporava ugaonu brzinu kretanja elektrona. Ovaj efekat se javlja usled kvantno mehaničkog spina kao i ugaonog momenta elektronske orbitale. Kod vode koja se nalazi u paramagnetnom stanju u spoljašnjem magnetskom polju svaki atom ima permanentni (stalni) magnetski dipolni moment, ali su dipolni momenti nasumično orijentirani i voda kao celina nije namagnetisana. Međutim, spoljašnje magnetsko polje može delimično da izravna atomske dipolne momente tako da voda može posedovati relativno mali dipolni moment u smeru spoljašnjeg polja. Ako je spoljašnje polje ne uniformno, na molekule vode deluje sila koja ga privlači u područja s većim magnetskim poljem. Ovi diopli imaju vrlo slabu međusobnu interakciju tako da su slučajno orijentirani kad nema spoljašnjeg magnetskog polja. Ove magnetske osobine vode potiču od

trodimenzionalne mreže vodoničnih veza koje stvaraju molekuli. Magnetno polje jača vodonične veze preko spina elektrona atoma koji učestvuju u obrazovanju vodoničnih veza. Pošto se voda smatra da je dijamagnetik ne bi trebala biti pod uticajem magnetnog polja. Toplotno kretanje delimično naelektrisanih molekula vode, delom učestvuju u Lorencovoj sili kad deluje magnetno polje. Suzbijanjem termalnih sila Lorencova sila čini vodonične veze jačim što uslovljava porast tačke topljenja.

Magnetsko/dijamagnetske osobine vode zavise od razlike u prostornoj gustini spina elektrona, magnetne sukceptibilnosti, vremena opuštanja, molekularne difuzije, broja jonskih koordinacionih mesta, koncentracije i vrste jona, paramagnetskih helata, kvantnog broja spina, magnetnog momenta, jon proton rastojanja, karakteristike hemijske i molekularne strukture. Koherentno uređen domen unutar vode pokazuje skoro perfektan dijamagnetizam koji je slab. Paramagnetska/dijamagnetska svojstva ukazuju kako električni i magnetni momenti dipola nose informaciju u vodenom elektrolitu. Memorisanje informacija omogućava da biološka svojstva vode zavise od prošlosti električnih i magnetskih dipola unutar vodenog rastvora. Energija magnetskog polja je mnogo redova veličine manja od energije vodonične veze. Energija ekscitacije elektrona molekula vode je reda veličine 10^{-12} a energija magnetskih svojstava vode iznosi 10^{-20} . Energija raskidanja prve vodonične veze molekula vode je 0.7 eV veća od raskidanja druge, što je rezultat kooperativnog karaktera obrazovanja vodoničnih veza što je uslovljeno redistribucijom (polarizacijom) elektronskog oblaka molekule vode koja učestvuje u obrazovanju vodonične veze. Redistribucija znači da sistem elektrona i protona međusobno interreaguju zadovoljavajući zakon o očuvanju kretanja ili momenta kretanja (kompletan spin) i energije.

Biološki sistemi generišu svoje sopstveno magnetno polje kroz proces prelaza dijamagnetizam/paramagnetizam. Živa bića su poluprovodničke organske strukture koje se sastoje od dijamagnetske tečnosti sa distribuiranim paramagnetskim komponentama. Oni formiraju paramagnetni koloid u dijamagnetskom medijumu koji može da pređe u paramagnetsko stanje. Priroda

paramagnetizma bi mogla biti porast (dinamika) donor akceptor auto kompleksa između molekula i porast broja delokalizacija π elektrona. Vodonične veze su uzrok paramagnetske promene. Vodonična veza vezuje paramagnetni proton za dijamagnetni atom kiseonika, Slična situacija se odvija kod drugih tipova vodoničnih veza kao H-N, H-S. U svim slučajevima je proton vezan za jako dijamagnetska jezgra atoma. Vodonik je paramagnetičan, kao kiseonik u atomskom stanju. Paramagnetizam se javlja sa porastom broja neuparenih spinova elektrona. Voda poseduje koherentne polarizovane domene radiusa 10^{-5} cm, neki domeni sadrže jone. Joni u vodi nisu u statičnom stanju, već osciluju upravo zato što se kidaju veze između molekula vode i jona. Kad se pokida veza sa pozitivnim jonima oni osciluju ka gore, što dovodi do paramagnetizma, a kad se pokida sa negativnim jonom osciluje ka dole što uzrokuje dijamagnetizam.

Tečna voda je sastavljena od treperavih klastera pentagonalno i heksagonalno kordinisanih molekula u kojima su O-H veze i dva usamljena para elektrona atoma kiseonika raspoređena na tetraedralno simetričan način. U rastvoru molekuli vode teže da formiraju pentagonalne i heksagonalne klastere gde preovlađuje pentagonalna struktura čiji klasteri teže da stvore zatvorene površine moguće sa magičnim brojem, koje su posebno stabilne. Molekuli H_2O , zahvaljujući neravnomernom rasporedu električnog naelektrisanja po svom obimu, su sposobni da se međusobno privlače i obrazuju haotične rojevite strukture i uređene klastere "vodene kristale". Veze u takvim asocijacijama su vodonične. Ona je jako slaba, lako razrušiva, za razliku od kovalentne veze. Slobodni nevezani u asocijaciji molekuli H_2O su prisutni samo u vrlo maloj količini. U osnovi voda je skup neuređenih rojeva i "vodenih kristala" u kojima količina molekula koji su povezani vodoničnim vezama dostiže stotine jedinica. Klasteri mogu imati najraznovrsnije oblike, u osnovi građe je tetraedar, a baš takav oblik poseduje raspored pozitivnih i negativnih naelektrisanja u molekuli vode. Grupišući se tetraedri molekula vode obrazuju razne trodimenzionalne strukture. Voda je više nalik na "gel" sastavljen od pojedinačnih ogromnih klastera vezanih vodoničnim vezama. Njihovo postojanje je u vremenskom

rasponu 10^{-12} - 10^{-9} sec, rotacija i druga termalna kretanja uzrokuju raskidanje pojedinačnih vodoničnih veza i ponovno formiranje nove konfiguracije koje su uvek promenljive. Klasteri su u stvari lokalni diskontinuiteti čiji veličina i uticaj zavise od faktora koji su zavisni od temperature i pritiska. Trajanje klastera i vodonične veze su nezavisni jedan od drugog, neke kombinacije su stabilnije od drugih. Struktura klastera može trepereti između statističkog i topografskog ekvivalenta klastera ali obuhvata različite molekule pomerajući centar klastera. Sa porastom temperature prosečna veličina klastera ali i integritet i veličina klastera manje gustine se smanjuje. Struktura i osobine klastera vode utiču na energetiku i dinamiku molekularnih procesa u koje su uključeni klasteri vode. Klasteri molekula vode utiču na proces hidratacije, puteve hemijske reakcije, energetike i dinamike hidratiranih molekula u rastvoru. Kako raste veličina klastera potencijal za višestruke interakcije voda voda raste. Molekule u vodenom rastvoru reaguju jedna sa drugom, reakcija zavisi od relativnog položaja i orijentacije molekula a ne samo od njegove brzine. Mali klasteri vode koji sadrže $\text{N}^+\text{-Cl}^-$ jonske parove u prisustvu molekula vode pokazuju suštinsku redukciju među jonskog privlačenja i stabilizuju vodom razdvojene jonske parove, što zavisi od veličine klastera. Slično se dešava i kod $\text{Na}^+\text{-Na}^+$ i $\text{Cl}^-\text{-Cl}^-$ parova jona u vodenom klasteru. Ovo je primećeno i za druge elektronske parove. Za velika međujonska razdvajanja, sile hidratacije poseduju kohezivnu ulogu sprečavajući jone da napuste klaster. U kompleksu sistema jonskih parova dolazi do reorganizacije molekula vode tako da klaster sadrži jedan jon. Jonski parovi stvaraju komplekse u kom su hidratirani, molekuli vode razdvajaju parove jona a dehidratacijom se ponovo obrazuju jonski parovi. Joni Cl^- razdvojeni molekulima vode mogu da borave u blizini Na^+ jona u poziciji razdvojenoj vodom. Vreme disocijacije je u vremenskom intervalu reda veličine 10 ps. Fluktuacija promene oblika klastera u difuznom kretanju molekula vode doprinose procesu opuštanja zavisno od vremena. Dinamika hidratacije u vodi sa klasterima srednje veličine je različita od one u bulk vodi. Klasteri traju mnogo duže vremena nego vodonična veza, efekat vodonične veze je sinergičan, direktivan i ekstenzivan. Efekt je pojačan dodatnim efektom polarizacije i rezonantnim intermolekularnim transferom O-H rezonantne energije

posredstvom dipol dipol interakcije i vodoničnih veza, reorijentacija jednog molekula indukuje odgovarajuće kretanje susednog. Kompleksnost klastera vode je zbog velikog broja različitih aranžmana vodoničnih veza koji utiču na njegova svojstva. Relativna proporcija različitih polimera vode je specifičan ekvilibrijum specifičnih geometrijskih konfiguracija. Dinamika geometrijskih konfiguracija klastera vode u interakciji sa rastvorcima se ispoljavaju kroz dinamiku dijamagnetizma/paramagnetizma. Veličina klastera vode utiče na efekt i stepen hidratacije. Ukupan broj mogućih konfiguracija molekula vode (klastera) prelazi 3 miliona. Utvrđena je linearna korelacija između energije klastera i prosečnog naelektrisanja vodonikovog atoma, donora koji učestvuje u vodoničnoj vezi i usled izazvane polarizacije je izvor kooperativnosti. Klasteri molekula vode postaju sve dominantniji kako se smanjuje količina supstanci u vodi. Hidratirani joni poseduju veliki efekat polarizacije kojom privlače molekule vode oko sebe. Stabilni klasteri koji se slobodno okupljaju su prisutni u vodenim rastvorima niskih koncentracija jona. Veći stepen polarizacije naelektrisanja jona dovodi do velike promene dipolnog momenta i gustine medijuma oko jona, menjaju se lokalne gustine i lokalni dipolni momenti naglo u funkciji rastojanja od jona i veće su na kraćem rastojanju od jona. Fragmentacija klastera u energičnom pomeranju će omogućiti formiranje zona tečnosti u kojima su u jednom trenutku poravnati domeni što izaziva promenu dijamagnetskih/paramagnetskih svojstava vode koja prati formiranje i razrušavanje klastera. Sjedinjavanje ovih domena i nastajanje ovih regiona dovodi do obrazovanja polimorfno stanja tečnosti koje su metastabilna konfiguracija tečnosti. Klasteri vode se periodično razgrađuju i stvaraju ponovo, vreme tranzicije je 10^{12} sekundi.

Trimeri, tetrameri, pentameri i heksameri vode su najdominantnije strukture indentifikovane u vodi, poseduju cikličnu strukturu minimalne energije. Veći klasteri poseduju trodimenzionalnu strukturu. Heksamer prelazi od ciklične u trodimenzionalnu strukturu. Ovi agregati molekula vode povezani slabim vezama variraju u veličini od malih oligomera do klastera od nekoliko hiljada molekula čija je unutrašnjost amorfnu. U klasterima postoje različiti

koordinacioni obrasci molekula vode. Obično klasteri u čistoj vodi sadrže 10-100 molekula. Klasteri vode pokazuju veliku raznovrsnost struktura i prelaza između familija struktura koji se menjaju i veličini klastera. Familija linearnih lanaca je stabilna jedino kod malih klastera $n=2$. Prstenaste strukture koje obezbeđuju ekstra vodoničnu vezu u grupi od 3-6 prstena su stabilni i mogu da obezbede dve vodonične veze po molekulu vode. Dimenzija klastera vode su obično od nekoliko desetina nanometara do razmera mikrona. Ispod određene koncentracije jona kad su interakcije između jona sve manja, dok interakcija između dipola molekula vode postaju dominantne molekuli vode se privlače između sebe i formiraju klaster koji poseduje stalni električni dipolni moment, kao mali magneti koji se zajedno udružuju da bi formirali veći magnet. Polarizabilnost je prenosiva između molekula vode i pokazuje istu shemu vodoničnih veza u klasterima različitih veličina i geometrija, doprinos delokalizacije naelektrisanja takođe zavisi od veličine klastera. (Chaplin 2004.)

Klasteri vode se dele na bulk klasterne koji su u kontaktu sa mestima koji su zauzeti vodom, omotačima, u kontaktu su sa mestima zauzetim monomerima i vicinalne klasterne koji su u kontaktu sa nekom površinom. Simetrija klastera može biti pentagonalna i heksagonalna, čije vodonične veze poseduju karakteristike zlatnog preseka. U vodi su ciklične strukture stabilnije trimeri, tetrameri i pentameri, heksameri nalik na kavez strukture su najstabilnije. Klasteri mogu sadržati sedam osam i devet molekula koji su nešto manje stabilni. Mnogo izomernih oblika heksamera postoje od oblika prstena, knjige, torbe, kaveza, do oblika prizme sa približno istom energijom. Takođe postoje izomeri heptamera i oktamera nalik na kavez, zajedno su nađeni ciklični i oblika kocke. U vodi se mogu naći klasteri sa otvorenom strukturom, manje gustine, koja može da širi mrežu vodoničnih veza sa okolnim molekulima vode i zatvorenu strukturu, veće gustine sa zatvorenom strukturom. Sa porastom veličine klastera se smanjuje rastojanje između molekula kiseonika susedih molekula vode što dovodi do promene u rasporedu naelektrisanja, molekul akceptor vodonične veze postaje bolji donator vodonične veze U vodi prisutni klatrati se sastoje od dve komponente kaveza koje čine molekuli vode i u njemu

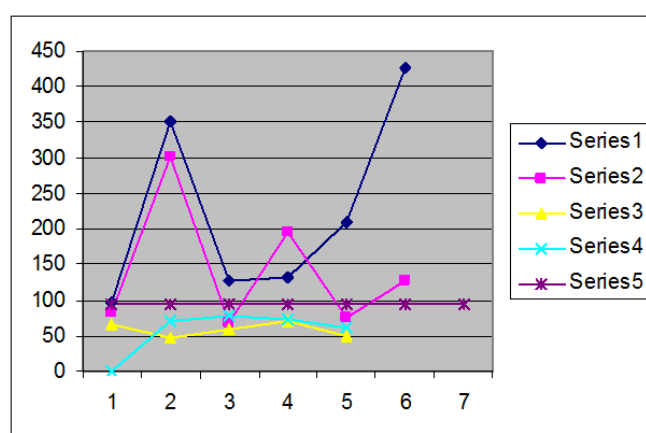
zarobljenog nekog gasa. Po veličini i obliku klasteri se jako razlikuju, mogu biti mali do nekoliko desetina molekula vode, sa jednakim dimenzijama veličine 1nm koji su pogodni za hidratisanje, srednje veličine do par stotina molekula različitih dimenzija zbog raznih interakcija i termalnih efekata i velike po nekoliko hiljada molekula klatrati veličine 1.5 mikrona, koji su različitih promenljivih dimenzija i manje povoljni za razne interakcije. Strukturisano stanje vode je senzitivni detektor različitih polja pod čijim uticajem se menja struktura vode. Odnos raznih tipova klastera vode, njihova dinamika i različita svojstva i raspored vodoničnih veza u njima su važna karakteristika vode koja sa mineralnim sastavom određuje biološku vrednost vode.

5.2. Uzgoj pacova i njihova biohemijska analiza posle žrtvovanja

Mušjaci stari 95 dana su gajeni zajedno sa ženkama 18 dana i odvojeni su od njih još 34 dana tokom kojih su pili isti tip vode, potom su žrtvovani nakon ukupno 52 dana konzumiranja istog tipa vode i uzeti su im: krv, deo bedrene kosti, nadbubrežna žlezda, mozak i deo kože. Ženke su pile zajedno sa mužjacima, posebno same do koćenja, sa mladuncima i nakon odvajanja od njih ukupno 87 dana i pile su isti tip vode. Mladunci su pili isti tip vode kao i roditelji tokom zajedničkog života sa majkom i nakon odvajanja ukupno 61 dan i nakon toga su žrtvovani i uzeti su im isti organi kao i mužjacima.

Na uzetim organima životinja koje su pile sve tipove voda nisu nađene patološke promene. Biohemijski nalazi krvi ukazuju na povećane koncentracije glukoze kod svih grupa što bi mogla biti posledica unosa hrane neposredno pre žrtvovanja u kombinaciji sa stresom tokom žrtvovanja, usled povećane koncentracije glukokortikosteroidnih hormona i adrenalina nadbubrežne žlezde. Pacovi poseduju brži metabolizam od ljudskog zbog čega im brže opada koncentracija glukoze u krvi pa češće konzumiraju hranu. U nivoima glukoze u krvi se ne može uočiti povezanost između mužjaka i ženki kao ni između životinja koje su pile različite vode. Kod svih grupa životinja koje su pile različite

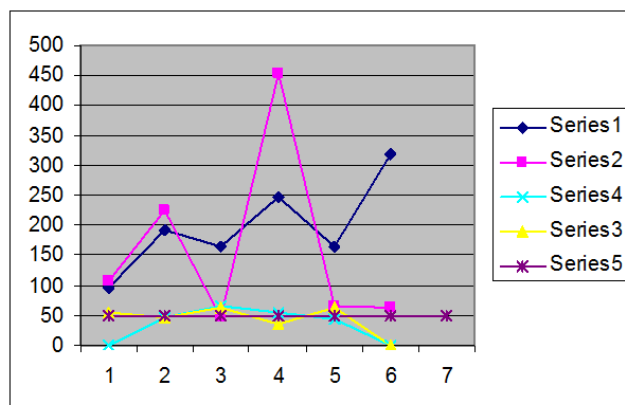
tipove voda je uočeno odstupanje u asparagin aminotransferazi (AST) i alanin aminotransferazi (ALT) koje su pokazatelji zdravstvenog stanja jetre. Umereno povećanje ovih aminotrasferaza može nastati kao posledica prolazne hipoksije ili povećane metaboličke aktivnosti hepatocita, što može biti posledica unosa kontaminirane hrane, sve grupe su jele briketiranu, industrijsku hranu istog proizvođača. Veliko povećanje i AST i ALT ukazuje na hepatocelularnu nekrozu, što bi moglo biti posledica kontaminacije hrane gljivicama. Na dijagramu (1) su prikazane vrednosti AST u IU/lit za mušjake, ženke i njihovo potomstvo.



Dijagram 1. Vrednosti AST za mušjake, ženke i njihovo potomstvo u zavisnosti od tipa vode koji su pili. 1 vrednosti za mušjake. 2 vrednosti za ženke 3 vrednosti za muško potomstvo. 4 vrednosti za žensko potomstvo i 5 gornja granična vrednost za AST. Na apscisi su pretstavljani tipovi voda a na ordinati su vrednosti za AST u IU/lit.

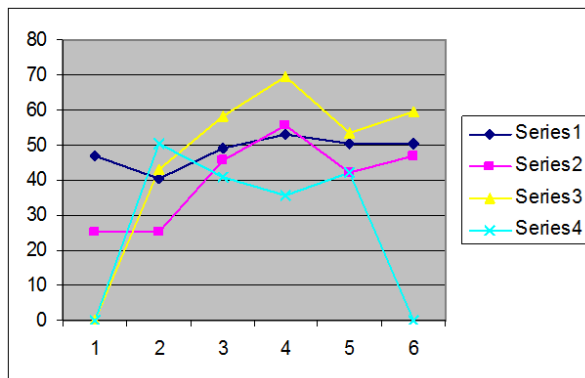
Uočljivo je da su vrednosti za AST nešto više kod mušjaka nego kod ženki što je posledica veće osetljivosti njihovog metabolizma što ih čini osetljivijim na stresne uslove života. Samo za 4. tip vode su kod ženki vrednosti za AST nešto povećane u odnosu za mušjake. Od oplemenjenih voda vrednosti i za mušjake i za ženke su veće za drugi tip voda što je posledica dodanog NaCl koji je uticao na strukturisanost molekula vode. Pacovi koji su pili 6. tip vode koja je zabranjena za ljudsku upotrebu imaju najveće odstupanje AST naročito mušjaci. Potomci pokazuju uočljivo niže vrednosti AST i ako tek neznatno odstupaju od normalnih vrednosti, ne pokazuju razlike u vrednosti između različitih životinja koje su pile različite vode i nalaze se u normalnim vrednostima za dati parametar. Životinje koje su pile oplemenje vode 1 i 3 i vodu 5 iz Beogradskog vodovoda ne

pokazuju odstupanje u koncentraciji AST. Ženka koja je pila vodu broj 6 ima manje odstupanje od mužjaka koji je pio tu istu vodu, zbog manje osetljivosti ženkinog metabolizma. Na dijagramu (2) su prikazane vrednosti ALT u IU/lit za mužjake, ženke i njihovo potomstvo.



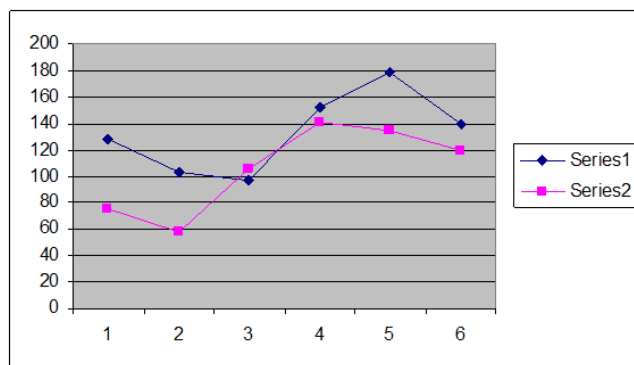
Dijagram 2. Vrednosti ALT za mužjake, ženke i njihovo potomstvo u zavisnosti od tipa vode koji su pili. 1 vrednosti za mužjake. 2 vrednosti za ženke 3 vrednosti za muško potomstvo. 4 vrednosti za žensko potomstvo i 5 pretstavlja maksimalno dozvoljenu vrednost za ALT. Na apscisi su pretstavljeni tipovi voda, a na ordinati su vrednosti za AST u IU/lit.

Slično dijagramu za AST uočljiva je razlika nivoa ALT između roditelja i potomaka, koji ma koju vodu pili ne odstupaju od maksimalno dopuštenih koncentracija za ALT. Vrednosti ALT mnogo više odstupaju kod ženke koja je pila 4. tip vode u odnosu na druge ženke i mužjake a u slučaju 3. i 5. tipa voda je u normalnim vrednostima. U slučaju pića 6 tipa voda neznatno je odstupanje kod ženke dok je kod mužjaka značajno, najveće odstupanje je među mužjacima. Životinje koje su pile oplemenjene vode pokazuju nešto manje povećanje vrednosti za ALT u odnosu na normalne vrednosti. Vrednosti za mužjake su kompaktnije dok vrednosti za ženke više variraju u zavisnosti od vode koju su pile. Na dijagramu (3) je pretstavljeno odstupanje vrednosti uree od minimalne vrednosti u zavisnosti od tipa vode koji su životinje pile. Životinje koje su pile prvi tip vode nisu imale potomstvo, kao i roditelji koji su pili 6 tip vode koji nisu imali žensko potomstvo.



Dijagram 3. Odstupanje od minimalne normalne vrednosti uree za mužjake, ženke i njihovo potomstvo u zavisnosti od tipa vode koji su pili. 1 vrednosti za mužjake. 2 vrednosti za ženke. 3 vrednosti za muško potomstvo. 4 vrednosti za žensko potomstvo. Na apscisi su pretstavljeni tipovi voda, a na ordinati su vrednosti za AST u IU/lit.

Vrednosti za ureu odstupaju od minimalnih normalnih vrednosti kod svih jedinki. Ženke koje su pile 1. i 2. tip vode imaju najmanje odstupanje od normalne vrednosti dok je najveće odstupanje za sve grupe životinja koje su pile 4 tip vode. Odstupanje među mužjacima su manja, jedinke koje su pile 1 i 2 tip vode imaju nešto manje odstupanje vrednosti u odnosu na ostale mužjake koji su pili druge tipove voda mada su sve vrednosti uree daleko ispod normalnih vrednosti. Parametri: kreatinin, trigliceridi, totalni proteini, albumini, globulini totalni bilirubin, kalcijum, fosfor, natrijum i hlor su bili kod životinja viši niži ili u granicama normalnih vrednosti u zavisnosti od tipa vode koju su pili i pola pretstavljani su na dijagramu. (4 i tabeli 12).



Dijagram 4. Odstupanje vrednosti parametara od minimuma normalne vrednosti za mužjake, ženke u zavisnosti od tipa vode koji su pili. 1 vrednosti za mužjake. 2 vrednosti za ženke. Na apscisi su pretstavljeni tipovi voda, a na ordinati su vrednosti odstupanja parametara u procentima.

Kod mužjaka su odstupanja ispod normalnih vrednosti veća nego kod ženki, izuzev u slučaju trećeg tipa voda gde su skoro ista. Kod ženki su odstupanja primetno manja nego u slučaju mužjaka i pokazuju zavisnost od unetog tipa vode. Manje odstupanje ispod normalnih vrednosti je u slučaju oplemenjenih tipova voda nego u odnosu na vode iz izvora i vodovoda 4, 5 i 6 grupa. U tabeli (12) su pretstavljeni parametri čije su vrednosti prosečne, iznad ili ispod normalnih vrednosti u zavisnosti od tipa vode koju su roditelji pili i pokazuju da je različit odgovor na konzumirane vode kod životinja u zavisnosti od pola i tipa unete vode.

tip vode	I	II	III	IV	V	VI		I	II	III	IV	V	VI
mužjaci							ženke						
kreatinini	P	P	P	P	P	P		P	P	N	N	N	N
holesterol ukupni	P	P	P	P	P	P		P	P	P	P	P	P
trigliceridi	N	N	N	P	N	N		P	N	P	P	P	N
proteini totalni	P	P	P	P	P	P		P	P	P	P	P	N
albumini	N	N	N	N	N	N		P	N	N	P	P	P
globulini	V	V	P	P	P	P		P	P	P	P	P	P
bilirubin totalni	P	N	P	P	P	V		V	V	V	V	V	P
alkalnafosfataza	P	P	P	P	P	P		P	P	P	P	P	P
kalcijum	N	N	N	N	N	N		P	N	N	P	N	N
kalijum	N	P	N	N	N	P		P	P	N	N	N	P
natrijum	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	N
hlor	P	P	P	P	P	P		P	N	P	P	N	N

Tabela 12. parametri koji u zavisnosti od tipa vode i pola životinje pokazuju više, niže ili u granicama normale vrednosti. P je skraćena za normalne vrednosti, N označava niže vrednosti ispod normalnih vrednosti, V je skraćena za vrednosti iznad normalnih vrednosti.

Vrednosti za kalcijum, kalijum, natrijum i hlor su snižene skoro kod svih životinja koje su pile različite tipove voda što ukazuje da su neke hormonalne žlezde narušile svoju funkciju usled prisustva toksina u hrani i tipa vode koju su pili. U zavisnosti od unete vode i pola životinje stepen odstupanja za jone varira.

5.3. Biopendanca kao klasična metoda karakterizacije kože in vivo

Bioimpedanca se bavi nekim pasivnim svojstvima kože, sposobnošću da se zaustavi tok električne struje. Ljudski koža kad se na nju dovede naizmenična struja poseduje impedancu, njenu termogenu i pasivnu komponentu: znatnu kapacitivnu otpornost i zanemarljivu induktivnu, i njenim merenjem mogu se dobiti podaci o dielektričnim svojstvima kože odnosno o sadržaju vode u njoj. Induktivni otpor se javlja zbog samoindukcije čija su struja i napon uvek u suprotnom smeru od primenjene struje a manifestuje se time da struja u kolu ne može trenutno da poraste ili da opadne, ovaj otpor opada sa smanjenjem frekvencije struje. Kapacitativni otpor nastaje zbog punjenja elektronima kondenzatora usled čega struja prednjači ispred napona i fazno je pomeren za $\pi/2$. Elektromagnetna svojstva ljudske kože su: električna permitivnost, magnetska permeabilnost i električna provodljivost. Rezistanca zavisi od korišćenog materijala i od korišćene frekvence.

Posmatranje električne impedance je alat za biološka i biomedicinska istraživanja. Sastoji se od dijagnostičkog metoda koji je baziran na pasivnim električnim osobinama bioloških tkiva. Praktično korišćenje električnih pasivnih svojstava je počelo sredinom XX veka. Bioimpedanca je veličina koja se koristi da opiše odgovor tkiva živog bića na spoljašnji izvor struje. To je mera suprotstavljanja protoku električne struje koja protiče kroz tkiva i suprotna je od električne provodljivosti. Bioimpedanca opisuje pasivna električna svojstva biološkog materijala i služi kao indirektni transdukcioni mehanizam za fiziološke događaje, često u slučajevima kad odgovarajući transducer postoji. To je jednostavna elegantna tehnika koja zahteva jedino primenu dve ili više elektroda. Impedanca Z (om, Ω) je opšti termin povezan sa sposobnošću suprotstavljanja strujnom toku, izražena u odnosu između naizmenične sinusoidne voltaže i naizmenične sinusoidne struje. Impedanca je kompleksni kvantitet zato što je biomaterijal u zavisnosti od suprotnog toka struje, fazna promena napona s obzirom na struju u domenu vremena. Admitansa Y (simens

S) je inverzna impedanca ($Y=1/Z$) Zajednički naziv za impedancu i admitancu je imitanca. Tkivo je sastavljeno od ćelija sa slabom provodljivošću, tanke ćelijske membrane, stoga tkivo poseduje kapacitativna svojstva veća frekfencija manja impedanca. Bioimpedanca je zavisna od frekfencije, i impedanca je spektroskopska, otuda daje važne informacije o tkivu i strukturi membrana kao i o distribuciji intra i ekstracelularne tečnosti.

Impedanca je odnos amplitude napona i amplitude struje dok je faza kompleksa impedanse, fazna promena usled koje je struja ispred napona. Ona predstavlja kompleksnu količinu u kojoj je obuhvaćena magnituda i fazna karakteristika u polarnom obliku je: $Z = |Z|e^{j\theta}$ gde magnituda Z predstavlja odnos razlike amplitude napona u odnosu na amplitudu struje dok vrednost θ daje faznu razliku između napona i struje i j je imaginarna jedinica. Impedanca se može predstaviti kao $Z = R + jX$ gde je R realni deo impedance, rezistanca dok X predstavlja imaginarni deo reaktancu. Magnituda nam ukazuje na promenu amplitude napona za datu trenutnu struju kroz impedancu dok eksponencijalni faktor ukazuje na odnos faza. Otpor je realni deo impedance, objekt sa čisto otpornom impedancom ne pokazuje fazne razlike između napona i struje. Induktivna reaktanca je proporcionalna frekfenciji signala i induktivnosti i imaginarni je deo impedance. Efekat rasipanja energije prilikom prolaska struje kroz tkivo je rezistanca. Efekat povezan sa skladištenjem energije se zove reaktanca zajedno su impedanca a jedinica za njihovo merenje je $\text{ohm } \Omega$. Fazni ugao je vreme kašnjenja između stimulisane struje i napona generisanog naizmeničnom strujom u provodnom medijumu. Voda je provodnik u koži i determiniše otpor.

Instrument za merenje bioimpedance koristi električno kolo koje predstavljaju izvor struje i žice koje su povezane sa elektrodom. Nosioci naelektrisanja koji protiču kroz bakarnu žicu su elektroni dok su nosioci naelektrisanja u tkivima joni. Elektrode su pravo mesto za konverziju nosioca naelektrisanja od jona u elektrone i obrnuto. Praktično problem može da se подели na problem kola i problem polja. Problem kola je oko žice kondenzatora

otpornika poluprovodnika izvora struje itd. Tok struje je zatvoren žicama, i na primer, razlika napona (volt) se meri između dve tačke u kolu. Problem polja je povezan sa zapreminom provođenja i količine struje koja je u funkciji pozicije u toj zapremini.

Impedanca kože je dominantna u stratum corneum na niskim frekvencijama. Postoji dualnost u električnim svojstvima tkiva koje se može smatrati kao zapremina provodnika ili dielektrika. U oblasti frekvencija u opsegu >100 KHz mnoga tkiva su dominantni provodnici. Sa tehnikom velike rezolucije moguće je izdvojiti važna kapacitativna svojstva, ovo je dielektrične prirode, čak i na niskim frekvencijama (10 Hz). Na većoj frekvenciji 50 KHz dielektrična svojstva tkiva dominiraju. Na većim frekvencijama svojstva tkiva postaju sve više jednaka onoj kod vode koja poseduje karakteristično opuštanje frekvencije od približno 18 GHz. U živim ćelijama postoji nerazdvojna povezanost između elektriciteta i hemije.

Električna svojstva kože mogu biti predstavljena električnim modelom koji je predstavljen otpornikom sa paralelnim kondenzatorom i serijom otpornika. Ove komponente pokazuju sposobnost da skladište i oslobode električnu energiju (kapacitativna komponenta) i da raspu električnu energiju (rezistivna komponenta). Obično se impedanca kože meri sinusnim signalom na više frekvencija dobijajući modulus impedance i fazni ugao za svaku frekvenciju. Generalno je prihvaćeno da je impedanca kože određena uglavnom svojstvima stratum corneuma na frekvencijama ispod 10 KHz i živim delovima kože na većim frekvencijama. Impedanca je zavisna od faktora kao što je hidratacija kože, veličina i oblik elektrode a ponekad može da služi kao gruba smernica. Impedanca stratum corneuma je zavisna od njenog sadržaja vode. Merenjem susceptance kože moguće je izbeći disturbancu paralelne konduktance znojnih žlezda. Bioimpedanca je zavisna od frekvencije kao i od mnogih fizioloških parametara i fenomena. U električnoj komponenti električna impedanca na specifičnoj frekvenciji definiše matematički odnos između primenjene naizmenične struje i rezultujućeg napona između krajnjih komponenti. Pored odnosa veličine između napona i struje, relativno vreme

kašnjenja oba signala se može posmatrati (fazni ugao). Za svaku frekvencu impedanca može biti predstavljena sa dve numeričke vrednosti. Takvi podaci mogu biti dragocen materijal naročito u onim slučajevima gde je promena impedance u domenu frekvence. Ovo se obično nalazi u složenim materijalima koji obuhvataju različite čestice i među površine, što je slučaj sa kožom. Električna impedanca kože zavisi ne samo od suštinski električnih svojstava konstitutivnih materija već i od geometrije objekta i njihovih delova. Zahvaljujući kapacitativnim i induktivnim osobinama kože ukupan kompleksan otpor, impedanca zavisi od frekvencije izvora, termogenog otpora i električnih i magnetnih svojstava provodnika. Pored toga, trenutna vrednost struje i napona nisu u fazi. Osobine tkiva kože uglavnom se sastoje iz termogene i kapacitativne komponente. Što se tiče magnetne komponente impedance ona je zanemarljivo mala, odnosno ispod granice je merljivosti instrumenta koji je korišćen za merenje.

Impedanca je relacija između napona i struje u komponenti sistema, definiše se kao otpor toku naizmjenične električne struje kroz provodnik u ovom slučaju kožu. Međutim impedanca je širok koncept i obuhvata fazni prelaz između napona i struje. Napon je električna sila koja uzrokuje protok struje u kolu. Otpor zavisi od različitih parametara i fizičkih činjenica. Količine naelektrisanja u materijalu, mobilnosti nosioca naelektrisanja za jonski rastvor, viskoznost rastvarača se smanjuje kako temperatura raste uvećavajući mobilnost jona i smanjujući otpornost dok je kod metala obrnuto. Otpor je obrnuto povezan sa presekom provodnika i direktno povezan sa dužinom provodnika.

U biološkom tkivu svaka ploča ekstracelularnog prostora može biti modelovana kao otpornik i čitav ekstracelularni prostor može biti modelovan kao otpornik. Nažalost biološko tkivo je kompleksno, uključuje dielektrike i pokazuje odgovor zavisian od vremena. Varijacije u heterogenim tkivima kao što je koža uzrokuju regioni različitih svojstava, skladište ili oslobađaju naelektrisanje kako se potencijal stimulusa menja. Koža je anizotropna jer poseduje različita fizička svojstva u različitim pravcima. Vreme kašnjenja

između potencijala stimulusa i promene u naelektrisanju površina stvaraju frekvenciju zavisnu od disperzije.

Cole jednačina je jednostavan model za električna merenja bioloških tkiva uključujući kožu. Uticaj hidratacije kože po slojevima na biološka svojstva kože nije dovoljno istražen. U istraživanjima na bazi ovog tipa eksperimenata je uopštena Cole jednačina. Frakcionalni model pretstavlja uopšten kontinuirani Cole model koji može predvideti strukturalno-funkcionalne karakteristike slojeva kože. Neke od tih odlika su dielektrična svojstva, fraktalnost strukture, sadržaja vode u koži itd. Ova istraživanja primenom klasične neinvazivne tehnike može doprineti boljoj karakterizaciji bilo kojeg tkiva odgovarajućeg tipa. Ovo pretstavlja dobru osnovu za razvoj nove metode za grubo određivanje biološke vrednosti vode.

$$Z = R_{\infty} + \frac{\Delta R}{1 + (j\omega\tau)^{\alpha}}, \Delta R = R_0 - R_{\infty}$$

Gde je Z vrednost impedance na frekvenciji ω , j je kompleksni broj $(-1)^{1/2}$, R_{∞} je frekvencija na beskonačnoj frekvenciji, R_0 je impedanca na nultoj frekvenciji, τ je karakteristična vremenska konstanta, α je dimenzioni parametar sa vrednošću između 0 i 1. Dimenzioni parametar α je blisko povezan sa spektralnom širinom disperzije; minimum spektralne širine odgovara za $\alpha = 1$ i disperzija se širi kako α teži manjim vrednostima. (Ivorra At all 2005.)

Princip merenje je zasnovan na uvećanju kapaciteta kondenzatora što zavisi od materijala. Mnogi materijali uvećavaju kapacitet u poređenju sa vakuumom za faktor veći od sedam (dielektrična konstanta) voda međutim uvećava kapacitet za faktor veličine 81. Ovo znači da mešavina raznih supstanci, koje su nađene u koži u kojoj promena u sadržaju vode dovodi do promene u kapacitetu kondenzatora za merenje. Varijacije u koncentraciji jona utiču na provodljivost, ovaj fenomen je povezan sa sadržajem vode. Specijalan sastav i distribucija tkiva produkuje promenu permitivnosti sa frekvencijom ulazne struje. Kad se električno polje primeni na provodni medijum dipolni elementi se

polarizuju u pravcu polja, ako je polje naizmjenično, molekuli se polarizuju i depolarizuju u skladu sa frekvencijom oscilovanja. Međutim ako je frekvencija dovoljno visoka neki molekuli nemaju vremena da se vrate u depolarizovano stanje ostajući stalno u polarizovanoj poziciji. Vreme potrebno da se depolariše molekul je vreme opuštanja i zavisi od njegovog oblika i sastava, veliki kompleks molekula kao protein poseduju manje vreme relaksacije, a jednostavni molekuli kao što je voda poseduju veće. Ovaj i drugi fenomeni menjaju permeativnost materijala što zavisi od frekvencije. U provodniku je mešavina molekula raznih veličina i efekat polarizacije se otkriva na raznim frekvencijama, razna stanja kože kao i bolesti mogu biti diferencirane korišćenjem spektra električne impedance i promene barijere kože ili dubljim delovima kože. Hidratacija stratum corneuma je dominantan faktor za svojstva provodljivosti. Cole jednačina opisuje ponašanje sistema u prostoru impedance. U suštini sve što se nalazi ispod i između elektroda doprinosi merenju impedance bioloških tkiva. Sa dodatkom ekstracelularnog matriksa otpor i kapacitansa rastvora raste. Kad se dodaju ćelije, lipidni dvoslojevi služe kao dodatni kondenzator da skladište i otpuste naelektrisanje sa strujom reverznog toka, intracelularna komponenta doprinosi ovom. Tkivo se pojednostavljeno opisuje kao dva otpornika ekstracelularnog, intracelularnog i kondenzator koji se sastoji od lipida koji čine ćelijsku membranu. Za takvo kolo bi se očekivalo da se ponaša sasvim drugačije u zavisnosti od tipa i frekvencije ubačene struje. Sa direktnom primenom struje ona će prvo proticati kroz sva tri elementa dok se kondenzator potpuno ne napuni na toj tački struja će kontinuirano teći samo kroz ekstracelularni otpornik. Primenom naizmjenične struje na većim frekvencijama struja će kontinuirano teći kroz intracelularne otporničke komponente koje se ne mogu propustiti na nižim frekvencama, jer kondenzator postaje nevidljiv za protok struje. Novi koncept se zasniva na kolu sa pet elemenata u kom su dodatni otpornik i kondenzator paralelno vezani i dodatni delovi predstavljaju struje koje teku kroz ćelijske organele.

U funkciji frekvencije ili ugaone frekvencije izlazna struja je kompleksni broj i označava impedancu tkiva. Model kože predstavlja kolo sastavljeno od dva

otpornika i kondenzatora i mogu se interpretirati kao ekstracelularni provodni putevi, unutarćelijski provodni putevi i kapacitance ćelijske membrane koju limitira opseg frekvencija (takozvana disperzija). Električnom impedancom se može videti odstupanje provodljivosti unutar i izvan barijere kože. Postoje brojni mehanizmi zavisni od provođenja različitih frekvencija struje u živim sistemima. Pasivna električna svojstva bioloških živih bića nisu konstantna u celom opsegu frekvencijskog spektra. Osmotreni su neki tranzicioni regioni poznati kao disperzioni regioni. Definisana su tri različita regiona za dielektrična svojstva biološkog materijala. Veća dielektrična disperzija se javlja između 10 Hz i nekoliko desetina MHz (α i β disperzioni region) i oni su povezani sa procesom difuzije jona (α region) i dielektričnim svojstvima ćelijskih membrana i njihovom interakcijom sa ekstra i intercelularnim elektrolitima (β disperzija). Dielektrična svojstva γ regiona (>100 MHz) nastaje zbog sadržaja vode u biološkim vrstama kao i prisustva malih molekula. Pronađen je i četvrti region δ region između regiona β i γ disperzije oko 100 MHz koji je uzrokovan dipolnim momentom velikih molekula, kao što su proteini. Disperzioni regioni α i β su povezani sa tkivnim i ćelijskim strukturama i čine ih posebno privlačnim za detekciju. Struja male frekvencije ne može prodrati u ćeliju, dok struje velike frekvencije će slobodno proticati kroz nju. Otuda će impedanca struje biti veća na nižim frekvencijama nego na višim frekvencijama zato što je put struje na manjim frekvencijama uži. Za srednje frekvencije se manifestuje prelazno ponašanje i za većinu tkiva prelaz između ponašanja frekvencija niže i više frekvencije je od oko 10 KHz do oko 1MHz.

Svojstva živih tkiva daju udela u višestrukim disperzijama različitog biološkog porekla. U veoma heterogenim tkivima kao što je koža disperzije se preklapaju u različitom stepenu. Svaka disperzija se sastoji od pod disperzija. Disperzije mogu biti previdene ako je opseg istraživanih frekvencija suviše širok. Svaka velika disperzija je takođe skup pod disperzija koje mogu biti previdene ako je mala gustina frekvencijnih tačaka, zato što su heterogeni neki tipovi tkiva. U veoma heterogenim tkivima kao koži disperzije se preklapaju u različitom stepenu. jer svaki skup podataka impedance poseduje dve dimenzije: veličinu i

fazu ili ekvivalentno realni i imaginarni deo za svaku frekvenciju. Sa fizičke tačke gledišta, merenje impedance će dati dva broja za svaku frekvenciju, veličina i faza ili matematički ekvivalent realni i imaginarni broj impedance.

Ako su dielektrična svojstva svake zapremine poznate jednostavno je utvrditi frekvenciju odgovora za dati sistem elektroda. Na osnovu frekvencija odgovora je nemoguće da se izračunaju dielektrična svojstva elemenata malih obima u tkivu kože zbog velikog stepena heterogenosti i anizotropije. Broj odgovora različitih slojeva kože se superponira. Istražuju se glavne fizičke komponente kože (slabo provodni je površinski deo, dok su dobro provodni dublji slojevi, koristeći dielektrična svojstva za opšte ponašanje kože u domenima frekvencije se može utvrditi opšta provodljivost kože. Direktno se može izračunati zavisnost od frekvencije raznih dubina jednostavnog modela dva sloja (neprovodnog i provodnog) koristeći realne veličine i oblike sistema elektroda. Veoma niske frekvencije oko 10Hz u stratum corneum teško će otkriti osetljive informacije, dok frekvencije iznad oko 1MHz mogu utvrditi većinu osetljivih informacija žive kože. Prelaz između dominantnih slojeva nije linearan i može biti dalje modulisan detaljno grubom prvom aproksimacijom. U zavisnosti od veličine i oblika elektrode se pomera prelaz duž ose frekvencija. S obzirom na frekvenciju odgovora praktično je nemoguće da se izračunaju dielektrična svojstva elemenata malih zapremina u istraživanom tkivu i delimično koži bez obzira na veliku heterogenost i anizotropiju. Broj odgovora različitih slojeva se superponira. Istraživanjem glavnih fizičkih konstituenata kože (spoljnog sloja koji slabo provodi i dobro provodnog dubljeg sloja korišćenjem njihovih poznatih dielektričnih osobina) opšte ponašanje u frekventnim domenima može biti utvrđeno.

Čisto fizički provodljivost je vreme mobilnosti nosioca naelektrisanja gde doprinos svih nosilaca naelektrisanja treba da se sumira. Ovo je dominantni mehanizam za vodeni rastvor na niskim frekvencijama. Svaka nametnuta strukturna barijera, rastvoru bilo koje vrste će uvesti unutar i izvan kožne barijere, kao što se može uočiti na osnovu električne impedance, fenomen polarizacije naelektrisanja koje će se nakupljati prazniti i ponovo obnavljati sa

obrnutom polarnošću i prolaziće kroz cikluse naizmeničnih struja. Na višim frekvencijama, polarni molekuli će interreagovati sa poljem i to može biti prilično specifično, posebno u oblasti frekvencija radio i mikrotalasa. Veličina i oblik elektroda i delimično distanca između njih je još jedan faktor koji utiče na rezultate merenja. U homogenom sistemu, efektivna dubina prodora je po pravilu oko polovina distance između elektroda dok je u heterogenom sistemu nejednake provodljivosti, kao što je koža, manja. U slojevitom sistemu kože provodljivost će biti modulirana. Faktor veličina elektroda će uticati, bliže postavljene elektrode korneometra će meriti više površinske struje. Različite frekvence detektuju različite aspekte provodnih i dielektričnih osobina kože. Dubina penetracije struje kroz kožu varira sa debljinom i dielektričnim svojstvima kože, zavisna je od frekvencija, dimenzije elektroda i njihovog geometrijskog oblika. Temperatura moduliše transepidermalni gubitak vode kao posledicu mobilnosti jona. Broj biohemijskih supstanci koji se nakupljaju na površini kože mogu uticati na rezultat merenja. Voda poseduje različita svojstva u raznim slojevima kože i različite karakteristike vode će biti utvrđene u zavisnosti od različitih principa merenja. Molekuli vode mogu biti direktno određeni preko njihovih dielektričnih osobina na većim frekvencijama. Voda u bulk delu će predstavljati osnovu za naelektrisane entitete, na nižim frekvencijama davaće mobilnost jonima. Hidratacija kože ne može biti odvojena od svojstava barijere kože, koja je multifaktorijalna i time zahteva multifrekventni pristup kako je procenjeno električnim metodom. Multifrekventni pristup neće rešiti teškoće, nemoguće je dizajnirati sistem elektroda pogodnih za frekvencije od 0 do mikrotalasnih opsega. Na niskim do srednje visokim talasnim dužinama elektromagnetno polje prodire u tkivo, njegov oblik zavisi od veličine, oblika i mesta gde je postavljena elektroda primenjene frekvencije. Elektroda, tkivo međupovršina, poseduje jedinstvena svojstva po sebi koja su u biti nametnuti svojstvima tkiva. Metod impedance je veoma osetljiv metod za detektovanje bilo koje promene kožne barijere lepljivom trakom. Veličina impedance će opadati sa porastom oštećenja, što je manja prepreka za nosioca naelektrisanja, delimično na nižoj frekvenciji, to će biti karakterističnije promene u obliku spektra impedance. Merenje električne

provodljivosti kože se ne odvijaju uvek pod sličnim uslovima. Dva faktora veoma utiču na uslove za merenje impedance: na tkivu uvek nije moguće garantovati isto mesto potrebno da se maksimalizuje signal impedance i prisustvo plazme ili krvi oko tkiva mogu stvarati kratak spoj i time ometati ispitivanje.

Ekstracelularni medijum može biti, prevashodno razmatran kao tečni elektrolit. Ovo podrazumeva da su nosioci naelektrisanja joni i da odgovarajući elektroni vezani za njih nisu sposobni da protiču. Za razliku od protoka struje u metalu kontinuirana struja u tkivima je jonska. Transformacija struje iz elektronske u jonsko provođenje se odvija u graničnoj površini između elektrode i elektrolita. Kroz hemijske reakcije (elektrolita) izmena elektrona između elektrode i elektrolita (jonizacija neutralnih supstanci ili neutralizacija jona) i moguće je da elektrode obezbeđuju jone za rastvor (reakcija oksidacije). Reakcija izmene elektrona su neželjeni fenomen i može da ošteti tkivo zbog suviše akumulacije jona kao što je Cl^- i čak degradiraju elektrodu. Kad se struja propušta kroz električni dvostruki sloj onda se formira elektroda elektrolit sloj pa se koristi za elektrodu materijal koji se ne polarizuje. Daleko najvažniji jon je Na^+ (1~140 mM) i Cl^- (~100 mM). Električna svojstva zavise od fizičkih ili hemijskih parametara koji determinišu njihovu koncentraciju i mobilnost. Temperatura poseduje važnu ulogu u provodljivosti jona. Koncentracija intracelularnog medijuma je slična koncentraciji ekstracelularnog medijuma. U ovom slučaju važan nosilac naelektrisanja je K^+ , proteini, HPO_4^{2-} + SO_4^{2-} + organske kiseline. Pored jona i nekih drugih naelektrisanih molekula, unutar ćelija je moguće naći brojne membranske strukture sa potpuno drugačijim električnim odgovorom. Ove membrane su formirane od dielektričkog materijala a njihova provodljivost je veoma mala. Stoga impedanca intracelularnog medijuma mora biti mešavina provodnih i kapacitativnih svojstava. Pojednostavljenjem je opšte prihvaćeno da se intracelularni medijum ponaša kao čist jonski provodnik. Ćelijska membrana poseduje pasivnu ulogu (razdvajaju ekstracelularni i intracelularni medijum) i poseduje aktivnu ulogu (kontrolise razmenu različitih hemijskih materija). Njena unutrašnja

provodljivost je niska i može biti smatrana za dielektrik. Struktura: ekstracelularni medijum, ćelijska membrana, intracelularni medijum može biti smatrana kao dielektrik provodnik.

Izlaz napona je sinusoida zavisna od vremena, oblik sinusoide je u zavisnosti od frekvencije i amplitude što je fazni ugao i izražava se u stepenima. Biološko tkivo obuhvata dielektričku otpornost i idealno je beskonačna što obuhvata drugi električni fenomen kapacitancu, kapacitet. Dielektrik nije sposoban da nosi naelektrisanje ali je sposoban da ih skladišti. Relativna permeativnost (dielektrična konstanta) zavisi od materijala između dve ploče. Ako se napon menja kroz vreme jedan deo struje (proporcionalno vremenskom izvodu napona) će ući i napustiti kapacitancu da je naelektriše ili razelektriše. Napon kondenzatora je sinusoidan sa istom frekvencijom kao i izvor napona. Jedina razlika je amplituda i faza. Isto važi za napon i za struju oko strujnog kola. Ovo je opšte svojstvo linearnog kola bilo koje kombinacije otpornika, kondenzatora i induktora. Ovo je kombinovano sa činjenicom da neki signal može biti pretstavljen kao kombinacija sinusoida. Kolo može biti karakterisano za svaku frekvenciju i moguće je izračunati izlazni signal za bilo koju vrstu ulaznog signala. Impedanca je element nekoliko frekvencija i definiše se kao odnos ulaznog napona i struje za tu frekvenciju. Linearni element dve relacije će postojati između napona i struje relacija amplituda (ili modula ili amplituda) i odnos faza (kašnjenje između struje i napona). Signal se obično pretstavlja kao kompleksni broj. Ova specijalna vrsta broja sadrži informacije modulusa i faze. Kompleksni broj je jedini način kojim se može pretstaviti istovremeno modulus i faza. Za datu frekvenciju napon V i jačina struje I su kompleksni brojevi koji pretstavljaju ulaz napona i struje (magnituda i faza). Električna impedanca Z je kompleksni broj jednake veličine sa odnosom magnituda i faze jednake za različite faze. Realni deo impedance se zove rezistanca (otpor) dok se imaginarni broj zove reaktanca (induktivni otpor). Rezistivni deo uzrokuje pad snage, impedanca otpornika je potpuno rezistivna bez reaktance (induktivni otpor) a ona uzrokuje kašnjenje između napona i struje. U kapacitanci struja velike frekvencije je slobodna da protiče i struja niske frekvencije je blokirana.

Kapacitancu se ponaša kao otpor u otvorenom kolu (bez konduktance) za veoma male frekvencije i kratka kola za visoke frekvencije. Električna bioimpedanca može da se definiše i kao mera električnog otpora biološkog uzorka. Električna bioimpedanca kože se može kontinuirano meriti u cilju determinisanja stanja i količine vode u slojevima kože i njenoj patofiziološkoj evoluciji. Patološke promene u koži podrazumevaju izmenu ćelija i međućelijskih membranskih sistema što se reflektuje promenom impedance. Merenja bioimpedance su relativno jednostavna i obezbeđuju neophodne informacije da prate promene u koži usled prisustva vode različitih bioloških karakteristika i baza su za kliničke parametre stanja slojeva kože. Tehnologija merenja bioimpedance ima široku primenu u mnogim biomedanckim aplikacijama kao što je karakterizacija kože, otkrivanje bolesti, biosenzori... Impedanca tkiva može da se menja sa promenom različitih frekvenci. Strukture tkiva i njihovi sadržaji mogu pokazati različite električne karakteristike. Merenje bioimpedance kože nudi mogućnost brzog tačnog i jeftinog registrovanja promena u ćelijskoj strukturi i ekstraćelijskim membranskim strukturama kože. Primena struja na površini kože može da indentifikuje promene u različitim slojevima kože koje nastaju tokom starenja, različitih sredinskih faktora i različitih vrsta voda kojim se organizam izlaže. Ako se ćelijska struktura ili ekstracelularni membranski sistem menjaju, bioimpedanca može da se koristi za otkrivanje promena na molekularnom nivou. Bioimpedanca se može primeniti na tkivo kože da determiniše stanje u kom se nalazi, za utvrđivanje funkcije kože kao barijere za prolazak vode. Ova tehnika može pratiti promene u ćelijama, ćelijskim membranama i međućelijskom prostoru za praćenje procesa koji se odvijaju tokom diferenciranja keratinocita tokom procesa sazrevanja. Skupljajući informacije zajedno može biti dijagnostikovana strukturalna svojstva vode koja obezbeđuju najbržu i najefektivniju hidrataciju kao i strukturu vode koja unošenjem u organizam obezbeđuje optimalnu strukturu i funkciju kože. (Grimnes, Martinsen 2008.) Upotreba bioimpedance predstavlja neinvazivnu, brzu metodu za određivanje električnih parametara kože. Biološka funkcija kože i posebno stratum corneuma kao barijernog sloja se ogleda u veličini impedance na način da u

slučajevima disfunkcije podleže padu vrednosti (u odnosu na fiziološka stanja karakterisana visokim vrednostima) usled smanjenja sposobnosti sprečavanja transporta jona. Analiza impedance može poslužiti kao parametar procene barijerne funkcije kože u zavisnosti od tipa vode koja se konzumira. Električno ponašanje osnovnih struktura kože je u odnosu na rastući stepen hidratacije koji zavisi od uzrasta pola i tipa vode koji ispitanici konzumiraju. Za promenljivu električnu pobudu su odgovorni: povećanje pokretljivosti keratinskih filamenata, kao nosioca polarnih grupa u polarnom rastvaraču kao što je voda, povećanje pokretljivosti pokretnih i polupokretnih jona u vanćelijskom prostoru, Povećanje protonske provodljivosti u okviru mreže vodoničnih veza koje formiraju molekuli vode. Frekvencija od 1kHz, približna granična vrednost ispod koje električnim svojstvima tkiva dominira stratum corneum, dok na višim frekvencijama dominantan doprinos daju dublji slojevi kože sa ćelijama koje se nalaze u stadijumu rane terminalne diferencijacije. Posmatrano iz ugla ponašanja dubljih slojeva, oni na frekvenciji od 1kHz u formiranju odziva kože učestvuju sa svega 10% vrednosti dok na frekvenciji od 100 kHz učestvuju sa 90% vrednosti. (Martinsen et al 1999). Jačina struje koja protiče kroz određeni presek tkiva kože i njoj odgovarajuća veličina impedance (kao i za većinu tkiva uopšte) menja svoju vrednost u zavisnosti od frekvencije primenjenog pobudnog napona i zbog promena u procentnom sastavu ćelijskih i vanćelijskih polarnih i nepolarnih molekularnih komponenti (grubo posmatrano proteinske i lipidne komponente) čije se ponašanje može opisati ponašanjem klasičnih (tehničkih) otpornika i kondenzatora. Analiza impedance predstavlja neinvazivnu, brzu i relativno jeftinu metodu za određivanje električnih parametara kože. Biološka funkcija kože i posebno stratum corneum-a kao barijernog sloja se ogleda u veličini impedance na način da u slučajevima disfunkcije podleže padu vrednosti (u odnosu na fiziološka stanja karakterisana visokim vrednostima) usled smanjenja sposobnosti sprečavanja transporta jona. Analiza impedance, u što je moguće širem frekventnom opsegu, može poslužiti kao parametar procene barijerne funkcije kože. Osim procene barijerne funkcije, predmet interesovanja je bio i karakter odziva dubljih slojeva epiderma i derma kao i uočavanje eventualnih pravilnosti u ponašanju u odnosu

na starosnu dob ispitanika. Do promene ponašanja osnovnih struktura kože u odzivu na rastući stepen hidratacije i promenljivu električnu pobudu, dovodi povećanje pokretljivosti keratinskih filamenata, kao nosilaca polarnih grupa, u polarnom rastvaraču kakav je voda, povećanje pokretljivosti pokretnih i polupokretnih jona u vanćelijskom prostoru. Povećanje protonske provodljivosti u okviru mreže vodoničnih veza koje formiraju molekuli vode. Literaturni podaci ukazuju na određene pravilnosti u ponašanju slojeva kože. (Grimnes 1999.) Tako je frekvencija od 1kHz istaknuta kao približna granična vrednost ispod koje električnim svojstvima tkiva dominira stratum corneum dok na višim frekvencijama dominantan doprinos daju dublji slojevi kože sa ćelijama koje se nalaze u stadijumu rane terminalne diferencijacije. Kao najčešće korišćena niskofrekventna pobuda u literaturi se ističe vrednost od 88 Hz, mada autori ističu njenu proizvoljnost u okviru šireg opsega vrednosti za koje je postignut povoljan odnos dovoljno visoke frekvencije radi izbegavanja kritičnih vrednosti vremenske konstante ali i dovoljno niskih vrednosti radi izbegavanja parazitnih kapacitivnosti i redne otpornosti u kontaktnoj oblasti elektroda. (Grimnes 1996.) Osim pomenutog, jačina struje koja protiče kroz određeni presek tkiva kože i njoj odgovarajuća veličina impedance (kao i za veličinu tkiva uopšte) menja svoju vrednost u zavisnosti od frekvencije primenjenog pobudnog napona i zbog promena u procentnom sastavu ćelijskih i vanćelijskih polarnih i nepolarnih molekularnih komponenti (grubo posmatrano proteinske i lipidne komponente) čije se ponašanje može opisati ponašanjem klasičnih otpornika i kondenzatora. Impedansna spektroskopija je sprovedena analizatorom impedance sa pobudnim naponom podešljivim u opsegu od 0-5 V i pobudnom frekvencijom ulaznog napona podešljivom u opsegu od 0.1 - 500 kHz. Ulazni parametar rada uređaja je pobudni (ulazni) napon V_{ul} , i pobudna (ulazna) frekvencija f_{ul} . Izlazni parametri su: izlazni napon V_{izl} i fazno kašnjenje φ . Vrednost pobudnog napona je u toku svih ispitivanja bila 5V dok je frekvencija varirana u odgovarajućim opsezima. Iz razloga stabilnosti merenja i dobijanja relevantnih podataka, pun merni opseg je smanjen na širi podopseg od 10 Hz - 50 kHz i uži podopseg od 50 Hz-10 kHz. U tim opsezima su sprovedene ispitivanja na tri grupe ispitanika.

5.4. Nanotehnološke metode: Opto-magnetni fingerprint (OMF) i Spektroskopija atomskih sila (AFM)

OMF je nova nanotehnološka metoda ispitivanja interakcije svetlost materija kod karakterizacije uzorka, a AFM je metoda topografske karakterizacije uzorka. Opto Magnetni Fingerprint (OMF), je nova metoda u istraživanju materije i optičkih i magnetskih svojstava tankih slojeva materijala i tkiva. (Bandic Koruga Mehendale Marinkovich 2008.) Metod je zasnovan na razlici između odgovora materijala kad je osvetljen belom svetlošću pod pravim uglom (reflektovana svetlost koja dolazi do detektora je difuzna) i sa istom belom svetlošću pod Brewsterovim uglom (reflektovana svetlost do detektora je polarizovana). Ova tehnika je zasnovana na svojstvima elektrona materije (kovalentne veze, vodonične veze, jon-elektron interakcije, van der Waals interakcije) i njihove interakcije sa svetlošću. Ako vodu osvetlimo polarizovanom svetlošću tada će doći do interakcije električne komponente svetlosti sa molekulima vode. Mogu se meriti reflektovane i/ili absorbovane osobine vode koja se ispituje na bazi ekscitacije elektrona molekula električnom komponentom svetlosti. Kako voda ili neki uzorak poseduje električna i magnetna svojstva reflektovana će svetlost, koja je elektromagnetne prirode, biti izazvana električnom komponentom ulazne svetlosti. Međutim, ako uzorak ekscitiramo svetlošću pod tačno određenim uglom tada će sam uzorak izvršiti polarizaciju svetlosti. Reflektovana svetlost imaće samo električnu komponentu, odnosno svojsva uzorka na bazi električnog stanja površine. Na taj način na bazi svetlosti možemo doći od električnih osobina materijala. Međutim, ako površinu uzorka izložimo dejstvu svetlosti pod pravim uglom tada će reflektovana svetlost sadržati informacije o elektromagnetnim osobinama uzorka. Ali, ako su površine iste u oba slučaja, tada se može od druge refleksije oduzeti prva refleksija i dobiti magnetne osobine površine uzorka (opto-magnetni fingerprint OMF). Imajući u vidu da je orbitalna brzina valentnih elektrona oko 10^6 m/s možemo reći da je odnos magnetnih i električnih sila materije oko $F_M/F_E \approx 10^{-4}$. Kako je sila neposredno povezana sa kvantnim dejstvom, izraženim Plankovim

izrazom, $h = F \cdot d \cdot t = 6.626 \times 10^{34} \text{ Js}$, gde je F sila, d pomeraj a t vreme, to znači da su promene magnetnih sila za četiri reda veličine bliže kvantnom dejstvu od električnih. Kako su kvantna stanja bioloških makromolekula primarno odgovorna za konformacione promene to znači da je otkrivanje razlike u tkivnim stanjima daleko verovatnije sa nivoa magnetnih sila nego sa nivoa električnih sila. Metod OMF je važan za nanotehnologiju jer je magnetna sila valentnih elektrona 10000 puta manja od električne tj. da magnetna komponenta bolje od električne opisuje kvantna stanja materije. U ovoj metodi se svetlost koristi kao merno sredstvo (sonda) kojom se ispituju osobine materijala iz razloga što je samo foton dovoljno mali senzorski modalitet, stvoren od strane prirode, kojime se može ostvariti garantovano dovoljna osetljivost i neinvazivnost interakcije sa materijom. U metodi se koristi bela difuzna svetlost čije se talasne dužine kreću u opsegu od $\approx 400 - 800 \text{ nm}$, što omogućava dobijanje informacija o višim nivoima organizacije bioloških makromolekula (tercijerna i kvarternarna struktura). Na ovaj način je moguće istraživati vodu u biološkim tkivima kao važan izvor informacija u biologiji. Svaki snimak rastvora vode ili biološkog sistema sadrži informacije na molekularnom nivou sa rezolucijom jedne vodonične veze. Posmatranjem bioloških sistema moguće je neinvazivno dobiti mnoge podatke o strukturi molekula vode posle raznih poremećaja.

Kako je promena kvantnih stanja površine uzorka obostrano jednoznačna („one-to-one”) korensponentna sa promenama molekula na površini uzorka (dubine od nekoliko nanometara do nekoliko milimetara u zavisnosti od prozirnosti uzorka), to je OMF koplementarna metoda AFM i MFM. Dok sa Nano Probe tehnikom može da se skenira površina od 10 nm do $100 \mu\text{m}$ i možemo dobiti stanja pojedinačnih molekula, to sa OMF tehnikom, možemo dobiti ukupnu (statistički relevantnu) informaciju o promenama molekula snimanog uzorka. Geometrijska optika je razumljiva pojava ako se posmatra kao interakcija između dva elektromagnetna polja – jednog u nepolarizovanom svetlosnom talasu i drugog koje proizvode elektroni u (pre svega tankom) površinskom sloju materijala.

Kombinovana "bela" i "polarizovana" svetlost upotrebljene na istom uzorku pokazuju malo različitu vizuelnu sliku. To se koristi u mikroskopiji velikih uvećanja, jer povećava kontrast. OMF je bitno različita metoda od mikroskopa sa običnom i polarizovanom svetlosti, jer umesto direktne polarizovane svetlosti koristi reflektovanu polarizovanu svetlost i umesto digitalne slike koristi njenu spektralnu raspodelu intenziteta u crvenom, zelenom i plavom delu spektra u nekom od sistema boja (u ovom slučaju u RGB). Dobijeni spektri predstavljaju pomeraj (shift) na levo i desno u odnosu na svetlost kojom se eksitira (u zavisnosti od odstupanja uređenosti sistema) pa ima sličnosti sa Ramanovim spektrom posmatranog uzorka. Dobijeni spektri pomoću OFM se mogu kombinovati međusobno, kao i sa poredbenim spektrima "ekrana" tj. referentnih površi. Kako se pojavljuje veliki broj mogućih kombinacija, konvolucioni spektri (convolution - smotan, zavijen), oni mogu izdvojiti različite osobine materijala koje su na određen način povezane sa prostornom raspodelom elektrona, elektronskih orbitala, kao i inenzitetom veze (kovalentna, vodonična, jon-dipol i dr.) Metod zapravo predstavlja optomagnetnu digitalnu spektroskopiju materijala, sa rezolucijom od 1 nm u plavoj i do 2 nm u crvenoj svetlosti. Algoritam za analizu podataka je zasnovan na hromatskom dijagramu zvanom „Maksvelov trougao" i skup operacija za odnos prema (R-B)&(W-P). Skraćene oznake znače da crvene minus plave talasne dužine bele svetlosti i reflektovana polarizovana svetlost (zasnovana na Brevsterovom uglu) se koriste za algoritam spektralnog skupa za izračunavanje podataka za optomagnetni fingerprint materije. Slike površine dobijene klasičnim svetlosnim mikroskopom je zasnovana na elektromagnetnim svojstvima svetlosti, dok je OMF zasnovana na razlici između difuzne bele svetlosti i reflektovane polarizovane svetlosti. Reflektovana polarizovana svetlost se produkuje kad izvor difuzne svetlosti obasjava površinu materije pod nekim uglom (Brevsterovim uglom). Svaki tip materije poseduje različitu veličinu ugla polarizacije svetlosti, ugao reflektovane polarizovane svetlosti vode je oko 53°. Dok reflektovana polarizovana svetlost sadrži električnu komponentu interakcije svetlosti i materije dok razlika između bele svetlosti (elektromagnetnog) i reflektovane polarizovane svetlosti (električnog) polja da

je magnetna svojstva materije (opto-magnetni fingerprint). Kako svetlost polarizovana pod Brewsterovim uglom gubi značajan deo intenziteta električne komponente, to znači da razlika odziva bele (ravnomerna električna i magnetna komponenta) i reflektovane polarizovane svetlosti (prigušena električna komponenta) daje nešto istaknutije magnetne oscilacije koje su potekle modifikacijom upadnog zračenja osobinama uzorka, optičkim putem. Kako su magnetne i optičke osobine materije najbliže konformacionim stanjima u tkivima i uslovljene su prigušenjem upadne svetlosti od strane materijala, to je metoda nazvana opto-magnetnom spektroskopijom. Ovaj odziv nazivamo i multi spektralni zato što pobuda i odziv (potencijalno) sadrže sve talasne dužine (monohromatske komponente) vidljive svetlosti. Koristimo digitalne slike u RGB (R-crvena, G-zelena, B-plava) sistemu da bi analizirali, odabiramo osnovne podatke piksela u crvenom i plavom kanalu za belu difuznu svetlost (W) i belu reflektovanu polarizovanu svetlost (P). Algoritam za analizu podataka je baziran na hromatskom dijagramu koji se zove Maksvelov trougao i operaciju spektralne konvolucije prema odnosu $(R-B)/(W-P)$. Polarizovana svetlost je korišćena za algoritam spektralne konvolucije za izračunavanje podataka za optomagnetni fingerprint materije. Zbog toga, metod i algoritam za stvaranje jedinstvenog spektralnog fingerprinta je zasnovan na konvoluciji kanala RGB boja spektralnih podataka generisanih od digitalnih slika koje su zarobile pojedinačne i višestruke talasne dužine interakcije svetlost materija. Za poređenje magnetskih i električnih svojstava vode (materije) korišćene su analize vrednosti R-B kanala za reflektovanu polarizovanu svetlost $P(R-B)$. Digitalna fotografija pruža nekoliko veoma značajnih prednosti kao što su brzina u radu, jednostavno arhiviranje i niski troškovi rada. Osim toga, ona omogućava analizu slike kroz njeno razlaganje na komponente boja koje formiraju vizuelnu percepciju: crvena, zelena i plava komponenta. Sam uređaj upotrebljen za realizaciju metode se sastoji iz standardnog digitalnog fotoaparata prilagođenog odgovarajućim sistemom za uveličavanje i svetlosnim izvorom prilagođenim za Brewsterovu spektroskopiju. Oblast na kojoj je moguće ostvariti snimanje je kružnog oblika prečnika oko 25 mm. Primenom digitalne obrade slike moguće je sliku transformisati u histogram zasićenja koji prikazuje

intenzitete piksela na skali od 0 do 255 tako da 0 odgovara nijansi minimalnog intenziteta dok 255 odgovara nijansi maksimalnog intenziteta. Histogramima se slika prikazuje kao spektar kod koga je raspodela svih intenziteta prikazana na skali od 0 do 255. Kako svaka od komponenti potiče iz odgovarajućeg opsega talasnih dužina vidljivog dela spektra na osnovu 256 nijansi svake od komponenti (zabeleženih CCD2 senzorom fotoaparata) možemo organizovati spektralni zapis većeg dela vidljive svetlosti u $256 \times 3 = 768$ nivoa. Na taj način digitalni zapis sadrži implicitnu informaciju o talasnim dužinama i intenzitetu difuzno i polarizovano reflektovane bele svetlosti.

Postupak snimanja se sastoji iz:

1. Osvetljavanja uzorka belom difuznom svetlošću.
2. Akvizicije prvog digitalnog snimka.
3. Osvetljavanja uzorka belom difuznom svetlošću pod Brevsterovim uglom.
4. Akvizicije drugog digitalnog snimka.

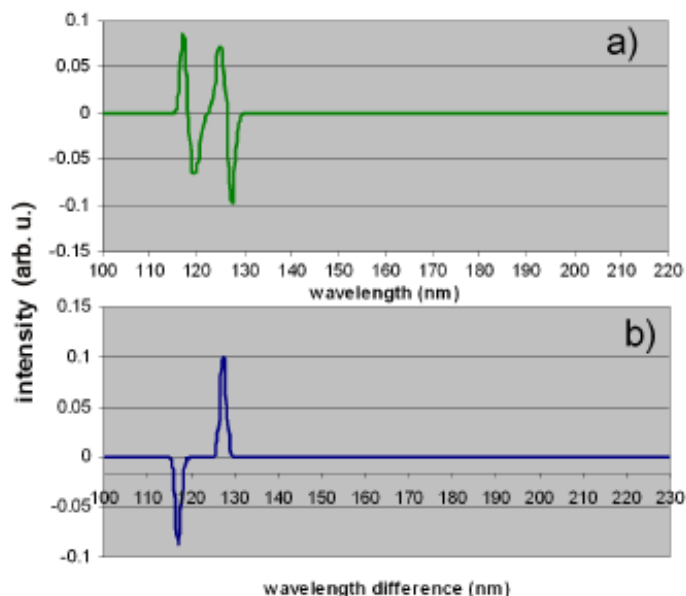
Nakon snimanja (koje traje 5-10 s po uzorku, sa oba digitalna snimka) sledi postupak spektralne obrade slike koji se odvija u tri faze:

1. U prvoj fazi se iz snimaka izdvaja (iseca) regija od interesa na kojoj se sprovode sve dalje operacije. Potom se izdvojena regija razlaže na komponentne kanale (crveni (R-red), zeleni (G-green) i plavi (B-blue)) iz kojih se dobijaju tri monohromatske slike koje predstavljaju raspodele intenziteta podoblasti vidljivog spektra koje se prikazuju u obliku histograma kod koga su nivoi intenziteta kodirani skalom talasnih dužina.

2. U drugoj fazi se sprovodi konvolucija spektara u oblasti plavog i crvenog kanala nakon čega se formira razlika između odziva dobijenog belom svetlošću i polarizovanom svetlošću.

3. U trećoj fazi se vrši analiza spektara tako što se uzorci klasifikuju po intenzitetima i talasnim dužinama. (Koruga Tomić Ratkaj Matija 2006.)

Na dijagramu OMF dema vode (5) se primećuju dva para pikova za magnetni domen dok za električni postoji samo jedan par što ukazuje da vodonična veza poseduje klasična i kvantna svojstva.



Dijagram 5. Optomagnetni dijagram za 18.2 MΩ vodu na 25° a) karakteristične tačke za magnetni domen [(R-B)&(W-P)]: (113.81 nm, 0), (116.69 nm, +0.0781), (117.95 nm, 0), (118.92 nm, -0.0627), (121.7 nm, 0), (124.79 nm, 0.0722), (126.19 nm, 0), (127.3 nm, 0.0978), (130.73, 0); (b) Karakteristične tačke za električni domen [P(R-B)]: (113.29 nm, 0), (116.67 nm, -0.0782), (118.71 nm, 0), (124.16 nm, 0), (127.33 nm, 0.1003), (129.07 nm, 0). Đ. Koruga 2010.

Vodonična veza poseduje dualna svojstva, klasična (elektrostatičke interakcije zasnovane na Kulonovom zakonu) i kvantna (talasna funkcija bazirana na Šredingerovoj jednačini). Dijagram (5). Dok je Plankova konstanta jedan od glavnih kriterijuma za opisivanje koji je proces kvantni ili koliko je blizak kvantnom za metod optomagnetnog fingerprinta materije kao polazna tačka su korištene električne i magnetne sile valentnih elektrona. U optomagnetnim spektrima se mogu otkriti fenomeni koji karakterišu materiju, kovalentne i nekovalentne veze (jon-jon, jon-dipol i dipol dipol interakcije). Ekscitacioni sistemi u nano razmerama vode poseduju uticaj na njena optička svojstva, prvenstveno na koeficijent apsorpcije koja je u obliku dielektrične permitivnosti i pokazuje veoma usku i diskretnu zavisnost od frekvencije spoljašnjeg elektromagnetnog polja. Vodonične veze između molekula vode nisu

samo klasično električno privlačenje između pozitivno naelektrisanog vodonikovog atoma i negativno naelektrisanog kiseonikovog atoma, nego je pod uticajem ostalih veza i stoga poseduje klasična i kvantna svojstva. Rastojanje između centra atoma vodonika i atoma kiseonika je u kovalentnoj vezi d (O–H) je između 95 pm i 120 pm, dok je rastojanje između centra vodonikovog i kiseonikovog atoma kod nekovalentne veze d (O...H) između 120 pm i 200 pm. Prosečna vrednost d (O–H) \times d (O...H) je oko 162 pm. Dužina veze O–H...O pokazuje da valentni parametri vodonične veze slede pravilo zlatnog preseka čija je vrednost oko 1.62. Od odnosa zlatnog preseka zavisi harmonizacija, vrednost prirodne mere je dva reda veće od 162 pm. Sa polazišta vodonične veze u molekularnom svetu, prirodna jedinica mere bi bila 1.61803×10^{-10} m. Razne elektromagnetne interakcije u živim bićima narušavaju ili teže da uspostave harmonizaciju parametara vodoničnih veza, što zavisi od njihovih svojstava. Vodonične veze (sa klasičnim i kvantnomehaničkim svojstvima) koje su organizovane u molekularnu mrežu ukazuju da voda preko njih ima ulogu u svim biološkim fenomenima i može se njena strukturisanost karakterisati optomagnetnim metodom. Ovim metodom baziranim na interakciji svetlost i odnosu električne i magnetske sile kovalentne veze i međumolekularnih interakcija vode je moguće skupiti podatke klasičnih i kvantnih dejstava molekula vode i interakcijama između njih kao i molekula vode i rastvoraka u rastvoru. Plankova konstanta je veza između energije (E) i oscilacije elektromagnetnih talasa (ν), kao $E = h\nu$. Plankova konstanta je po prirodi dejstvo proizvod sile (F), razdaljine (d) i vremena (t), dejstvo poseduje vrednost h ($6,626 \times 10^{-34}$ Js). Poređenjem električne i elektromagnetne interakcije između dva naelektrisanja elektrona susednih atoma u relativnom kretanju predstavljaju kvantnu osnovu za optomagnetni fingerprint. Postojanje polu klasičnih/kvantnih interakcija je u intervalu $6,626 \times 10^{-34} < h < 6,626 \times 10^{-30}$. U ovoj oblasti dejstva sa stanovišta energije klasični i kvantni fenomeni koegzistiraju zajedno. Veličina akcija je savršena za istraživanje interakcija vodoničnih veza ako je $h \leq 6,626 \times 10^{-30}$ Js onda je vodonična veza klasična, dok ako je $h \geq 6,626 \times 10^{-34}$ onda je kvantna. Električna sila je bliža klasičnim interakcijama (Kulonov zakon), dok je magnetna sila bliža za četiri reda veličine kvantnoj interakciji od električne. Za

aktivnost vodonične veze prosečna vrednost sile $\approx 2,5 \times 10^{-10}$ N, razdaljine $\approx 1,6 \times 10^{-10}$ m i vremena $\approx 50 \times 10^{-15}$ s za ove vrednosti je dejstvo $0,5 \times 10^{-33}$ Js što je polu kvantno dejstvo. Vodonična veza u vodi je četiri reda veličine bliža kvantnom ($6,626 \times 10^{-34}$ Js) nego klasičnom ($6,626 \times 10^{-29}$ Js) dejstvu. Prema odnosu $FM=FE \approx 10^{-4}$, znači da magnetski i električni fingerprint vodoničnih veza vode će biti različiti zato što se dejstvo magnetne sile razdvaja na dva dela: kvantni i klasični, dok je električna sila samo klasična zato što je domen dejstva 10^{-29} Js. Način da se razdvoje magnetno i električno dejstvo je interakcija svetlosti i vode. (Koruga 2010.) OMF metodom koji je veoma osetljiv na paramagnetne/dijamagnetne osobine tkiva kože kao kompleksne strukture, može se utvrditi da voda lipid strukture imaju veoma važnu ulogu u svojstvima kože kao i tip vode za piće koji ljudi koriste, što može predstavljati nano biološki pokazatelj vrednosti vode za piće.

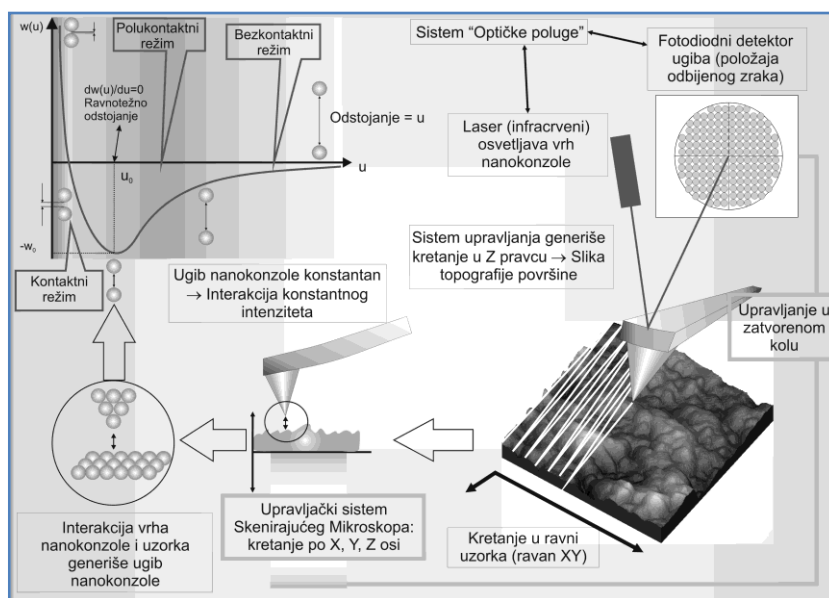
5.4.1. AFM - Spektroskopija atomskih sila

Skenirajuća mikroskopija atomskih sila (MAS, *eng.* Atomic Force Microscopy – AFM) je metoda karakterizacije materijala pomoću lokalnog merenja međuatomskih sila. Razvijena je da bi se prevazišlo osnovno ograničenje STM (skenirajuća tunelska mikroskopija) odnosno nemogućnost istraživanja električno neprovodnih biopolimera. (Matija 2010.) Metodu AFM su razvili (Binig, Kvejt i Gerber 1986.) godine radeći na unapređenju tehnike Skenirajuće Tunelske Mikroskopije (STM) koja interakciju sa uzorkom zasniva na gustini elektronskih stanja i primenljiva je samo na elektroprovodne uzorke. Sonda STM metode je platinska žica sa posebno zaoštrenim vrhom čiji radijus iznosi oko desetak nanometara. Sonda koja se koristi u metodi AFM ima vrh približno iste geometrije s tim što je sam vrh deo konusa postavljenog na konzolni nosač. Centralni element metode AMF je merni podsistem koji se sastoji iz tri ključne komponente: nanokonzole, optičke poluge i piezoelektričnog skenera. Slika 5. Skenirajuća tunelska mikroskopija (STM) zasnovana je na kvantnomehaničkom fenomenu tuneliranja elektrona između vrha probe i ispitivane površine ispitivanog biomaterijala, a može se primeniti samo u slučajevima električno provodnih biopolimera. Kada se uspostavi napon

između tipa i površine uzorka, dolazi do promene oblika energetske barijere i do tuneliranja elektrona kroz barijeru. Rezultat tunelovanja je struja I , koja zavisi od rastojanja z između površine uzorka i tipa. Struja tuneliranja eksponencijalno opada sa rastojanjem između tipa i površine biomaterijala, pa smanjenjem rastojanja za 0.1 nm povećava struju tuneliranja za jedan red veličine, što ukazuje na izuzetno veliku rezoluciju i primenjivost za strukturalna istraživanja na atomskom nivou. (Dejan Raković 2008.) Lokalno (sondirajuće) merenje se ostvaruje pomoću nanokonzolnog senzora izrađenog iz konzolnog dela dužine oko 50-500 μm i konusnog ili piramidalnog dela koji se nalazi na kraju konzolnog dela i koji je usmeren u vertikalnom pravcu ka uzorku kao što je predstavljeno na slici 5. Radijus vrha konusnog (piramidalnog) završetka se kreće od 7-90 nm i zavisi od namene senzora. Tip se montira na kraju lagane, veoma elastične i visoko-reflektujuće pločice (kantiliver) pod uglom od 90° . AFM prati promenu nagiba kantilivera koji se menja pri paranju tipa po površini biomaterijala, čime se menja i ugao reflektovanog laserskog snopa usmerenog na kantiliver, što se takođe softverski pretvara u 3D sliku ispitivanog uzorka. Na malim rastojanjima između tipa i površine biomaterijala, predominantan uticaj na vertikalno pomeranje tipa i savijanje kantilivera ima kratkodometna van der Waalsova sila zanemarljiv, dominantan uticaj imaju sile dužeg dometa, elektrostatična i kapilarna. U AFM uređaju se koriste kantiliveri izuzetno male mase čime je omogućena detekcija sile koja deluje na tip od $\sim 10^{-18}$ N. AFM se veoma mnogo koristi i za lokalizovana merenja elastičnosti i viskoznosti površine biopolimera, (slika 5) određivanjem zavisnosti sila rastojanje na izabranim mestima na površini biomaterijala. (Dejan Raković 2008.) Kod AFM osnova je interakcija vrha i površine uzorka. Kako sila interakcije na zavisi od električne provodnosti uzorka to se mogu ispitivati i neprovodni materijali. Princip rada AFM zasnovan je na merenju među molekularnih (među čestičnih) interakcija pomoću najosetljivijih senzora sile čiji fleksibilni geometrijski konstrukcioni parametri omogućavaju prilagođenje širokom opsegu vrednosti intenziteta međučestičnih interakcija. Konstrukcija nanokonzolnih senzora omogućava prilagođenje merne namene kako merenju sila ekstremno malih intenziteta (poput sila hemijskih veza), preko uticaja električnih i magnetnih

polja, pa sve do testiranja mikrotvrdoće i testova sa mikrorazaranjem površine materijala. Glavna osobina senzora predstavlja parametar krutosti konzolnog dela senzora, čije se vrednosti kreću od 0.01 - 10 Nm i obezbeđuju opseg merenja sila intenziteta od svega 10^{-10} nm pa naviše, što je dovoljno mala vrednost koja je omogućila neinvazivna snimanja kolagena i drugih biopolimera kao DNK itd. (Khijniak E, Pollack 2006.)

Skenirajuća mikroskopija je naziv za grupu metoda čiji se rad zasniva na ispitivanju snimanog područja od tačke do tačke, na osnovu koga se konačna slika rekonstruiše spajanjem tačaka u red (liniju) a potom susednih redova (linija) u dvodimenzionalni prikaz (površinu). Proces snimanja se sastoji iz kontinualnog kretanja sonde iznad površine uzorka, koja u toku svog kretanja interaguje sa uzorkom a rezultate te interakcije registruje fotodiodni senzor koji vrši prilagođenje signala i prosleduje ih na računarsku obradu. Linijska kretanja sonde su raspoređena tako da postepeno pokrivaju celu površinu snimane oblasti.

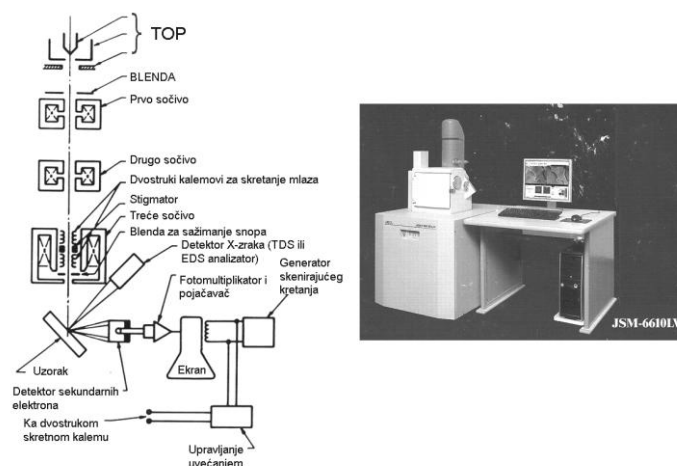


Slika 5. shematski prikaz principa rada mikroskopa međuatomskih (međumolekularnih) sila. (Matija 2010.)

Rezolucija skenirajućih sondirajućih mikroskopa se kreće i do 0.5-1.0 pm, ili 10^{-12} m, što omogućuje uvid u strukture kože u nanometarskim razmerama

koje omogućuju uvid u interakcije međumolekularnih sila. Rezolucija snimanja je ograničena uslovima kvaliteta pripreme uzorka. Interakcije na nano-bio skali pokazuju sličnosti sa koloidnim sistemima (Nel Mädler Velegol 2007) u kojima se, kao preovlađujuće vrste interakcija, tretiraju van der Waalsove, elektrostatičke i solvatacione interakcije. Van der Waalsove interakcije predstavljaju objedinjujući naziv za grupu elektrodinamičkih i nepolarnih interakcija u kojima molekulske i jonske vrste učestvuju preko svojih elektronskih omotača i to prvenstveno valentnim slojem. Solvatacione interakcije predstavljaju princip samo-uređenja solvatisanih vrsta koje na bazi stereohemijskih i elektrostatičkih interakcija formiraju sa molekulima rastvarača sisteme minimalne energije koji mogu imati tečnu ili tečno-kristalnu strukturu. Najnoviji rezultati istraživanja osobina vode govore u prilog ovakvom shvatanju, ukazujući na visok stepen organizacije molekula vode u prelaznim oblastima i postojanje znatno većih oblasti tečno-kristalnog uređenja čiste vode od onih koje pretpostavljaju klasične teorije ponašanja jonskih vrsta u rastvorima. (Echlin 1992. Slominski Wortsman 2000.) U skladu sa novootkrivenim kristalnim svojstvima vode, kao i savremenim shvatanjem ćelije kao tečno kristalnog sistema ograničenog membranom, uviđamo presudan značaj solvatacionih reakcija u istraživanjima nano-bioloških sistema.

U ovom istraživanju je korišćen sistem JSPM-5200, JEOL (Japan) (slika 6). Nanokonzolni senzori su proizvedeni od strane firme MicroMasch (Estonija) i Nanosensors (Švajcarska). Senzori za tehniku MMS pripadaju seriji NSC38-CoCr, sa dvoslojnim filmom magnetnog materijala koji se sastoji iz sloja kobalta od 20 nm koji služi za ostvarenje magnetne interakcije i sloja od 60 nm hroma koji služi kao mehanička zaštita i pokrovni sloj koji obezbeđuje magnetni materijal od oksidacije kiseonikom iz vazduha.



Slika 6. Slika skenirajući elektronski mikroskop JEOL-JSM-6610LV. (Dejan Raković 2008.)

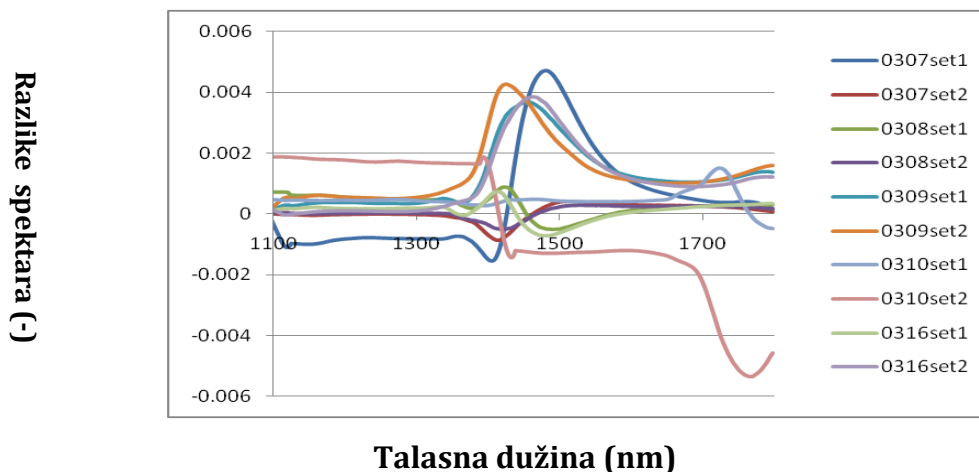
Osnovni mehanizam mikroskopskog ispitivanja mehaničkih osobina se sastoji u vertikalnom kretanju nanokonzole do ostvarivanja dodira sa materijalom uzorka i saopštavanju dodatnog kretanja kojime se istovremeno deformišu i nanokonzola i uzorak. Stepem deformacije nanokonzole se određuje iz signala na fotodiodnom senzoru dok se informacija o kretanju uzorka dobija iz zapisa kretanja nosača uzorka (piezoelektrični skener). Dijagram zavisnosti deformacije (ugiba) nanokonzole u zavisnosti od pomeraja uzorka se naziva dijagram "sila-rastojanje". Informacija o "sili" se obično u literaturi rekonstruiše na osnovu poznavanja konstante krutosti nanokonzole i upotrebe linearne zavisnosti deformacije, krutosti i sile koja deluje na konzolni uklješteni nosač. Opisan postupak predstavlja statičko merenje mehaničkih osobina. U metodi AFM postoji i metoda dinamičkog merenja mehaničkih osobina koje se sprovodi u polukontaktom režimu rada (dinamičkom režimu) kojim se ispituju i razdvajaju viskozna i elastična svojstva uzoraka. U statičkom režimu se vrši jedino relativno kretanje sonde u odnosu na uzorak. U dinamičkom režimu se osim pomenutog kretanja ostvaruje i oscilovanje sonde frekvencijom koja je bliska rezonantnoj frekvenciji i koja se u tom stanju dovodi u interakciju sa uzorkom što ima za posledicu višestruko povećanje osetljivosti na polje sila uzorka. (Zheng et al., Langmuir 2007.).

5.5. Aquaphotomics metoda

Voda nije jednostavan fizički objekt. Ona je osnovni konstituent svih životnih struktura. Za razumevanje vode sa systemske tačke gledišta neophodan je novi alat za monitoring u realnom vremenu i analizu neinvazivne dinamike bioloških i vodenih sistema. Near Infrared istraživanje strukture vode je obavljeno na vodi iz Beogradskog i Zrenjaninskog vodovoda. NIR spektrometrija je prozračna na talasnim dužinama 700 – 2500 nm dok je dužina puta svetlosti 1 mm tako da je ispitivani uzorak tanji od 1 mm.

Česmenska voda iz Beograda, strogo kontrolisana i obrađena, kvalitet se strogo nadgleda, veoma jasna, veoma čista prema organizaciji za javno zdravlje Beograd. Česmenska voda iz Zrenjanina, zabranjena za piće i kuvanje zbog prisustva arsena i drugih potencijalno veoma toksičnih supstanci, ne samo dodatih, hlorida zbog opasnosti produkcije toksičnih komponenti; boja je žućkasta, karakterističnog je mirisa, nije prethodno tretirana ili na bilo koji način obrađivana izuzev na prirodan način.

Praćene su promene u vodi zavisno od različitih uslova okoline: pritisak, vlažnost vazduha i temperature. Na slici (7) su prikazani spektri talasnih dužina česmenske Bg. vode, promene zavise od različitih uslova okoline, merenja su vršena na 10 uzoraka. Značajne talasne dužine prikazane u tabeli (13) nam daju podatke o dominantnim strukturama vode u uzorku i sumarne su za sve spektre uzoraka.



Slika 7. Promene u spektrima česmenske Bg. vode u zavise od različitih uslova okoline. Različiti spektri =(spektar svakog uzorka)-(spektar čiste vode)

NIR deo spektra između 700 i 2500 nm se široko koristi za identifikaciju, utvrđivanje koncentracije i praćenje promene molekula u vodenim sistemima. Istraživanjem infracrvenog opsega malog broja molekula vode indentifikovane su apsorpcione trake brojnih vrsta vode. Apsorpcija vode je relativno slaba i overtones različitih H-X veza gde je X po pravilu N, O ili C u rastvoru i rastvorci mogu biti otkriveni istovremeno. Opseg talasnih dužina je male energije i poseduje mali efekat na istraživani uzorak što čini NIR ne destruktivnom tehnikom. Ovo omogućava višestruko izlaganje, monitoring u realnom vremenu fluktuacije mreže vodoničnih veza i s njom povezana dinamika reasocijacije. Voda koja deluje kao matriks i može menjati svoje apsorpcione obrasce, koje su opisane matricom apsorpcionih obrazaca vode u vodenom sistemu. Ovo ima ulogu pojačivača pojedinačnih kompozicionalnih i strukturnih fluktuacija uzorka. Korišćenjem NIR spektroskopije moguće je pokazati kako merljive varijacije vibracionih frekvencija molekula vode mogu reflektovati veoma fine promene u sistemu. Ovo omogućuje opsežan uvid u produženo trajanje pristupa vodenog ogledala u reakcijama koje se odvijaju na molekularnom nivou. Poremećaji bioloških sistema u formi apsorbovanih fotona se koristi za istraživanje vode i različito ponašanje materija rastvorenih u vodi. Struktura vode još ostaje nepoznata ali sa spektroskopske tačke gledišta može biti opisana kao matrica tj molekularna mreža konformacija molekula

vode sa različitim populacijama vodoničnih veza i specijalnom distribucijom prilagođavanja i ubrzavanja različitih funkcija uključujući i same biološke. Kako jačina vodoničnih veza i njihova lokacija definiše funkcionalnost, voda bi se mogla opisati kao multifunkcionalno telo koje simultano poseduje mnoga lica tj. mnoge strukture. WAMACS pretstavlja koordinate matrice vode i čini je mreža vodoničnih veza u vodenom sistemu. Tabela 13 WAMAKS Beogradske vode sa karakterističnim apsorpcionim trakama. Vodena matrica je količina vodoničnih veza koja može biti viđena refleksijom NIR svetlosti bilo kog umetnutog molekula. Trodimenzionalno vodeno ogledalo (na molekularnom nivou) akvafotomiksom je moguće steći spektar piksela u 3D matrici.

Tabela 13. WAMACS značajne talasne dužine Beogradske vode

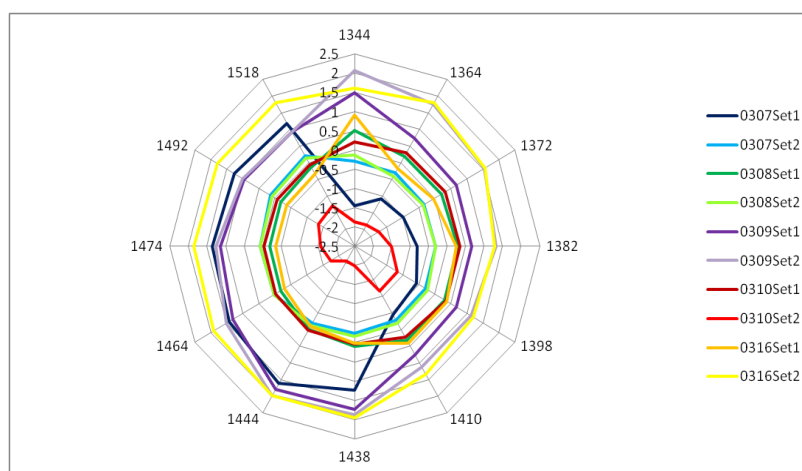
wamacs	C1 1336 1348	C2 1360 1366	C3 1370 1376	C4 1380 1388	C5 1398 1418	C6 1421 1430	C7 1432 1444	C8 1448 1454	C9 1458 1468	C10 1472 1482	C11 1482 1495	C12 1506 1516
p[hPa]					1414							1522
h[%]						1420						
t[°C]					1408						1484	

Akvagram česmenske Bg. vode nam daje sumarnu sliku molekula vode u interakciji sa različitim rastvorcima i pretstavljen je na slici (8). Molekularne strukture vode su istraživane sa vibracionom infracrvenom (IR) odnosno blisko infracrvenoj (NIR) spektroskopijom overtone (viših harmonika). Voda je jak apsorber IR zračenja i kao rezultat ovog metoda je istraživan i analiziran mali i veoma tanak uzorak. Koristeći NIR region se veoma lako dobijaju, u realnom vremenu, spektralni podaci za merenje i monitoring vodenih sistema. NIR spektroskopija dozvoljava dobijanje spektralnih podataka u realnom vremenu, podaci se dobijaju pod uznemiravanjem (perturbance), prate se promene u različitim hemijskim vezama u sistemu, obuhvataju se molekule vode kao medijum. Na vodu se veoma lako utiče različitim spoljašnjim faktorima, korišćenjem spektralnih promena istraživane vode i bioloških sistema, pod različitim poremećajima dobijaju se podaci o matrici vode i ostatku molekula

koje okružuje voda kroz promene obrazaca apsorpcije vode. Perturbacion – poremećaj se može definisati kao promena fizičkog sistema vode primenjujući male slučajne promene odabranih parametara i ponovne procene rezultujućeg sistema. (Tsenkova 2007.) Vis NIR spektroskopija je novi alat za posmatranje vode koji obezbeđuje enormne informacije o strukturi vode i funkcije na molekularnom nivou i boljeg razumevanja. Dodajući NIR svetlost vidljivoj svetlosti dobija se nova dimenzija efektu vodenog ogledala. Voda postaje 3D stereo ogledalo kao dodatak na refleksiju vidljive svetlosti, svaka frekvencija NIR svetlosti prodire u vodu i apsorbuje se od svake vodonične veze na jedinstven način da reflektuje ostale molekule u rastvoru i u okolini. Elektromagnetni spektar vode koja otiskava karakteristično spektralno lice vode u IR i NIR opsegu daje informacije o molekulima i jonima koji su rastvoreni u njoj. U različitom okruženju svaki molekul i jon poseduju jedinstvene apsorpcione obrasce vode koje opisuje spektar njihovog rastvora. Apсорpcione trake vode u NIR opsegu mogu poslužiti za indentifikaciju i merenje koncentracije raznih molekula i jona. Pod istim poremećajima različiti uzorci poseduju jedinstvene apсорpcione trake.

Vibracije molekula vode mogu biti otkrivene i analizirane u odnosu na druge molekularne vibracije i funkcionisanja celog sistema. Svaki spektar takvog sistema reflektuje apсорpciju svetlosti na različitim talasnim dužinama prema doprinosu (koncentraciji i strukturi) svakog molekularnog člana sistema). Blizak NIR spektar sadrži fizičke informacije kao rasejavanje i NIR spektar na koji jako utiče temperatura i Ph. U spektru vode u NIR opsegu 680-2500 nm prisutna su dva široka dominantna pika poznati kao prvi i drugi overtones i nekoliko drugih posebnih ali malih pikova, poznatih kao kombinacija traka pikova vode. Spektralni region overtons obično sadrži mnogo preklapajućih pojaseva. Osetljiv NIR spektar apсорpcije ne pokriva apсорpcionu traku kao gausova kriva. Overtoni karakterističnih pojaseva su računati i dalje korišćeni za određivanje kad se analizira spektralni obrazac vodenih sistema sa overtone spektroskopijom. Saopšteno je da IR spektroskopija meri apсорpciju pojedinačnog molekula vode ili broja molekula u vakumu. Intenzitet apсорpcije

u regionima overtonova su 100 do 1000 puta slabiji. Pikovi specifične apsorpcije vode u NIR spektru su pod uticajem drugih konstituenata u uzorku. (Tsenkova 2008.) Spektar vode je sredina koja zavisi od vibracionog moda otiska molekula rastvora. Molekularne vibracije vode tj. molekularne konformacije vode su pod uticajem interakcije sa drugim molekulima u rastvoru. Interakcija između NIR energije i molekula vode u njenim različitim molekularnim konformacijama su fundamentalne za razumevanje vodenog sistema.

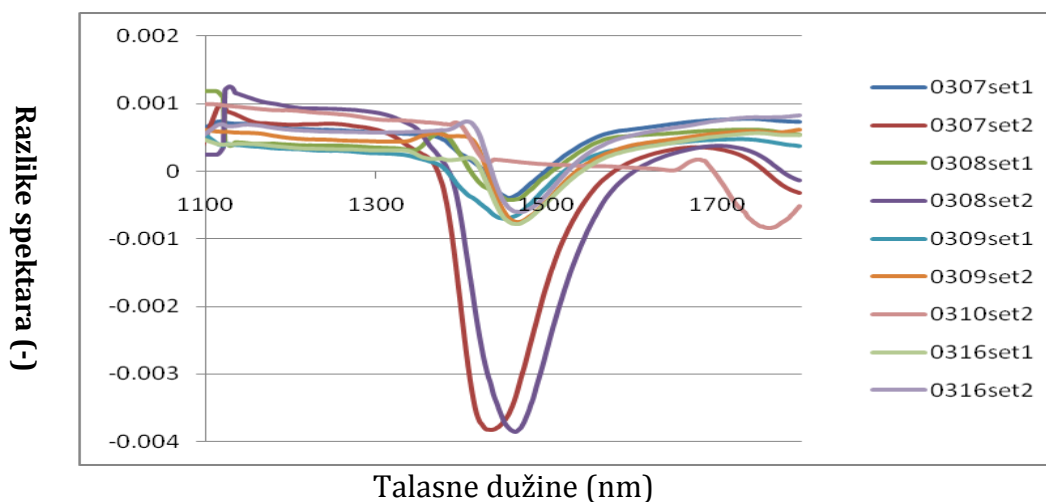


Slika 8. akvagram česemske Bg. vode. Različiti spektri =(spektar svakog uzorka)-(spektar čiste vode)

Na slici (9) je predstavljena razlika spektara česemske Zr vode koja je različita od česemske Bg vode slika (8) sa naročito izraženim negativnim pikovima dva uzorka, dok su ostali dosta homogeni.

NIR Spektroskopija vodenog sistema sa vodom kao zajedničkim imeniocem obezbeđuje dobijanje informacija na molekularnom nivou. Različite konfiguracije vode, na primer dimeri, trimeri, solvacioni omotači kako je poznato doprinose veoma specifično NIR spektru vode. Kako su ove konfiguracije veoma osjetljive na konfiguraciju i naelektrisanje rastvorenih molekula ili klastera. NIR spektar rastvarača je nađeno da sadrži značajne informacije o rastvoru. NIR vode spektralni obrazac opisuje matriks vode u veoma velikim detaljima i u odnosu na ostale molekule u rastvoru. Voda je

razmatrana kao zajednički spektralni imenilac vodenog sistema. Voda je zajednički prirodni imenilac čitavog biološkog sveta. Interakcija voda svetlost opisuje spektralni obrazac i reflektuje ostatak molekula u rastvoru kao vodeno ogledalo na molekularnom nivou.



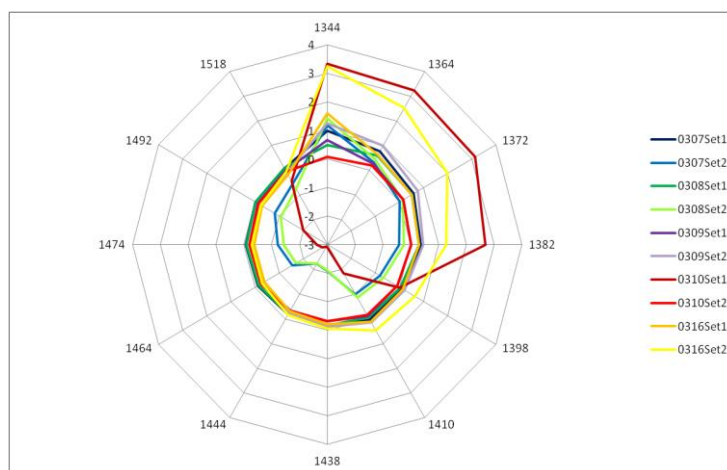
Slika 9. Različiti spektri = (Spektar svakog uzorka) - (Spektar čiste vode) Razlika spektara Zr vode.

Tabela značajnih talasnih dužina Zr česemske vode (14) je značajno različita od tabele Bg. vode (13) jer NIR spektar talasnih dužina pod različitim spoljašnjim uslovima odražava različit hemijski i jonski sastav vode preko različitih vodenih struktura i njihove dinamike.

Tabela 14. značajne talasne dužine Zr. česemske vode.

wamacs	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
	1336 1348	1360 1366	1370 1376	1380 1388	1398 1418	1421 1430	1432 1444	1448 1454	1458 1468	1472 1482	1482 1495	1506 1516
p[hPa]	1336			1382	1402 1404 1412	1424 1426 1428	1432 1442	1454				1522
h[%]			1376	1380	1408 1412	1422 1424	1432 1442	1448	1458 1467	1480	1482 1492	1510 1550
t[°C]	1336			1382	1404 1412	1422	1432	1450	1466	1472 1476	1490	1506 1558

Akvagram Zr. česmenske vode slika (10) kao i razlike u spektrima i značajnim talanim dužinama odražava razlike u hemijskom, sastavu strukturisanosti vode koje su posledica prirodnih i veštačkih posledica prečišćavanja ovih voda, takođe i interakcije sa različitim sredinskim uslovima i dužini boravka vode u vodonosnim slojevima ili vrsti izvora vode za vodosnabdevanje.



Slika 10. Različiti spektri = (Spektar svakog uzorka) - (Spektar čiste vode) akvagram Zr česmenske vode

Akvafotomiks je termin koji opisuje koncept vode kao multielementni sistem koji bi se mogao dobro opisati multi dimenzionalnim spektrom. Koncept akvafotomiksa je rezultat velike propustljivosti eksperimentalnih analiza i koristi informacije apsorpcionih traka vode i apsorpcionih obrazaca mogu da obezbede poznavanje vodenih struktura i suštinsku interakciju između vode i drugih komponenti vodenog sistema. Kroz razumevanje dinamike interakcije voda svetlost i njihov odnos prema funkcijama vodenog sistema akvafotomiks donosi poznavanje pojedinačnog elementa vodenog sistema i poboljšava sistemski nivo razumevanja ulazka vode u biološki ili vodeni sistem. Apsorpcione trake vode, sistema kad se nađe pod poremećajima definišu akvafotome karakteristične baze podataka apsorpcionih traka vode specifični za svaki poseban sistem. Unutar akvafotoma je kumulativna databaza svih akvafotoma koji su jedinstveni za svaki sistem. Akvafotom je unutrašnji komplement molekula vode apsorpcionih traka vodenih i bioloških sistema.

NIR spektroskopija vodenih sistema opisuje međusobni odnos između konformacije vode i njene funkcionalnosti. U matriksu vode postoji specifična molekularna konformacija i otkriva svoju dinamiku u realnim sistemima u realnom vremenu. Voda kao medijum je sistem različitih struktura koja je rezultat pravca simultane dinamike sa doprinosom drugih komponenti u vodenom sistemu. U vodi se nalaze brojne strukture koje se odvijaju u različitim vremenskim intervalima. Spektar vode otiskava spore promene kao odgovor na okolne ili druge poremećaje. Umesto analize komponenti vode jedne po jedne izgleda da je struktura vode rezultanta svih njenih komponenti, viđena kao spektralni obrazac mogla bi biti ogledalo svih molekula koji se nalaze u njoj. Voda je ogledalo na molekularnom nivou kad se koristi nevidljiva NIR. Rasplitanjem uloge vode u vodenim sistemima, akvafotomiks bi mogla biti alat za primenu na ogromnu količinu informacija o interakciji voda svetlost na diskretnim energetskim nivoima organizovanim u bazama podataka zvanim akvafotomi. U spektroskopiji se voda razmatra kao prepreka koja narušava proces otkrivanja drugih molekula u sistemu. NIR spektar obuhvata i fizičke i hemijske karakteristike vode. U tabeli (15) su predstavljene značajne talasne dužine čiste vode koje su znatno različite od oba ispitivana tipa voda, naročito od Zr. česemske vode. Opseg oko talasnih dužina 1. overtone 1450 nm je razmatran. Voda u rastvoru igra ulogu produženog vodenog ogledala dopuštajući blisko infracrvenom NIR svetlošću da se absorbuje reaktivnim vrstama vode da se odbije tj. indentifikuje rastvoreni molekul ili jon.

Tabela 15. značajne talasne dužine čiste vode.

wamacs	C1 1336 1348	C2 1360 1366	C3 1370 1376	C4 1380 1388	C5 1398 1418	C6 1421 1430	C7 1432 1444	C8 1448 1454	C9 1458 1468	C10 1472 1482	C11 1482 1495	C12 1506 1516
p[hPa]					1410							1516
h[%]			1374 1376								1492 1496	
t[°C]					1412						1484	

U tabelama (16-18) su prikazani sumarni podaci razlika talasnih dužina za ispitivane vode. Upoređivanjem vrednosti za ova dva tipa voda se može uočiti značaj ispitivanja NIR za određivanje organizacionih svojstava voda i određivanje njene biološke vrednosti.

Tabela 16. sumarne vrednosti za pritisak

Pritisak	C1 1336 1348	C2 1360 1366	C3 1370 1376	C4 1380 1388	C5 1398 1418	C6 1421 1430	C7 1432 1444	C8 1448 1454	C9 1458 1468	C10 1472 1482	C11 1482 1495	C12 1506 1516
Česmenska Bg					*							*
Česmenska Zr	*			*	*	*	*	*				*
Čista					*							*

Tabela 17. sumarne vrednosti za vlažnost

Vlažnost	C1 1336 1348	C2 1360 1366	C3 1370 1376	C4 1380 1388	C5 1398 1418	C6 1421 1430	C7 1432 1444	C8 1448 1454	C9 1458 1468	C10 1472 1482	C11 1482 1495	C12 1506 1516
Česmenska Bg					*							*
Česmenska Zr			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Čista					*						*	

Tabela 18. sumarne vrednosti za temperaturu

Temperatura	C1 1336 1348	C2 1360 1366	C3 1370 1376	C4 1380 1388	C5 1398 1418	C6 1421 1430	C7 1432 1444	C8 1448 1454	C9 1458 1468	C10 1472 1482	C11 1482 1495	C12 1506 1516
Česmenska Bg					*						*	
Česmenska Zr	*			*	*	*	*	*	*	*	*	*
Čista					*						*	

Prvi overtone vode je 1300 do 1550 nm sa 12 karakterističnih talasnih opsega od kojih je svaki 6-20 nm širok. Svaki od otkrivenih sistema otslikava tip poremećaja koji pokazuju predvidljive spektralne varijacije unutar ovih oblasti. Što znači da je njihov regresioni vektor ili glavna komponenta koja deli ove varijacije u ovih 12 opsega. Neki opsezi talasnih dužina kao oblasti oko C1 1344 nm H₂O-2*1/3, C2: 1364 nm 1. overton OH prostiranje [OH-[H₂O]₂], C7: 1438

[H₂O,S1] i C8 1450 nm 1 overton DDA simetričko rastezanje. [OH-[H₂O]₄] mnogi sistemi poseduju istu aktiviranu matricu. Ne postoji promena u matrici koordinata vode unutar ovih površina traka. Za razliku od ovoga C3: 1374 nm [H₂Ov₁-v₂], C4: 1383 nm [H₂O-2*v₁], C5: 1410 nm (slobodan molekul vode S₀) ukazuje na oblast gde su zaista karakteristične apsorpcije za posmatran sistem koji su dobro raspršeni unutar opsega. Ovo dokazuje postojanje specifičnih molekularnih konformacija vodenog matriksa i omogućuje rasvetljivanje njihove dinamike u realnom vremenu. Ovo može ubrzati interpretaciju spektara i dalje razumevanje uzajamnih odnosa između matrice vodenih molekularnih struktura i funkcionalnosti u realnom sistemu. Funkcionalnost struktura kao solvacioni omotači vode [OH-[H₂O]_n], super oksidi O₂-[H₂O]_n slobodni molekuli vode S₀. Slobodni molekuli vode [C5]. C10 traka matrice koordinata vode (1472-1482nm) je traka pod malim uticajem promena temperature, pritiska i vlažnosti tj. sredinskih faktora. Ova traka opisuje molekule vode sa tri vodonične veze tj. tetramere vode. Broj tetramera vode je najvažnija karakteristika svih tipova voda i naj važnije promena ove traka vode su veoma male sa promenom spoljašnjih uslova. (Tsenkova 2008.)

Apsorpcione trake Beogradske i Zrenjaninske vode se značajno razlikuju, što ukazuje da su njihove vodonične mreže pod uticajem različitih koncentracija raznih rastvoraka na šta ukazuju razlike u apsorpcionim trakama koje su karakteristične za hidratacione omotače. Zrenjaninska voda je karakteristična po složenoj spektralnoj apsorpciji koja ukazuje na prisustvo velike koncentracije pored mineralnih materija i organskih materija. Asocijacije molekula vode u Zrenjaninskoj vodi su veće i manje regularne nego kod Beogradske vode za piće, hidratacioni omotači su veći i stabilniji u Zrenjaninskoj vodi u odnosu na Beogradsku.

Voda je prirodna biološka matrica koja sadrži male molekule sa jakim potencijalom za obrazovanje vodoničnih veza, promene u obrascu apsorpcije se odvijaju uvek kad se adaptira na fizičke ili hemijske promene u biološkom sistemu ili okolini. Dodajući NIR svetlost vidljivoj svetlosti daje novu dimenziju efektu vodenog ogledala. Voda postaje stereo 3D vodeno ogledalo u dodatku

refleksije vidljive svetlosti, svaka frekvencija NIR svetlosti prodire u vodu i biva apsorbovana od svake vodonične veze na jedinstven način da reflektuje ostale molekule u rastvoru i okolini. Elektromagnetni spektar vode treba da otislika karakteristične spektralne osobine vode u IR i NIR opsegu. NIR svetlost prolazi 10 mm a za kraće talasne dužine NIR opseg dublje prodire. Apsorpcioni spektar vodenog rastvora ili biološkog sistema sadrže informacije na molekularnom nivou sa rezolucijom od jedne vodonične veze. Takvi brojni spektri su dobijeni ne invazivno tokom vremena i posle raznih poremećaja koji se odvijaju u vodenim sistemima. Vis NIR spektralna analiza apsorpcionih traka vode koja se zove koordinaciona matrica vode dozvoljava ne invazivno merenje struktura vode i sastav koji se zove pristup proširenog vodenog ogledala. (Tsenkova 2007.) Apsorpcioni obrazac proizveden apsorpcijom na svakom apsorpcionom pojasu vode se zove apsorpcioni obrazac vode. Može biti zamišljen kao tačka u koordinatnom vodenom matriksu multi dimenzionalnog prostora koja se kreće u različitim pravcima kroz vreme pod raznim poremećajima. Pozicija tačke je visoko povezana sa osobinama vode. Njena trajektorija će definisati promene u strukturi vode i njenoj funkciji uzorka koji je analiziran. Voda je prirodna biološka matrica koja sadrži male molekule i vodonične veze i menja svoj apsorpcioni obrazac kada se adaptira na fizičke i hemijske promene u biološkom sistemu. Postavlja se pitanje šta je struktura vode, koja je najpoželjnija a koja najštetnija za ljude i živa bića, možemo li kontrolisati te strukture. Voda je međutim, sistem raznih struktura koja može biti rezultanta vektora simultanih dinamičkih doprinosa drugih komponenti biološkog i vodenog sistema. U vodi postoje brojne strukturne promene koje se odvijaju u različitim vremenskim razmerama. Spektar vode otislikava spore promene kao odgovor na sredinske ili druge poremećaje.

6. TEORIJSKA ISTRAŽIVANJA

U ovom poglavlju prikazana je biološka vrednost vode sa aspekta funkcionisanja i aspekta starenja, doba, zašto dolazi do gubitka vode, telomere, deobno vreteno, slobodni radikali, slobodna energija, spoljni uticaji. Primenjen je Papića model i dr.

Voda je jedna od šest glavnih supstanci, građe živih bića, pored nukleinskih kiselina, proteina, lipida, ugljenih hidrata i jona. Fiziološko stanje čoveka i funkcionalnost zavise od zapremine, kvaliteta i stanja vode tj. njene biološke vrednosti. Zapremina vode u organizmu mlade osobe je od 65%-85% telesne težine. Od ukupne količine vode 62% je vezano za biomolekule i jone dok je 38% slobodna voda koja može da se kreće. Jonski sastav vode je značajniji za čoveka od količine jona u vodi zbog toga što čovek unosi 90-95% jona preko hrane a joni utiču na lokalnu organizaciju molekula vode stvarajući više ili manje uređenu strukturu vode oko sebe. Kvalitet i stanje vode koji određuju biološku vrednost vode uglavnom zavise od jonskog sastava, mreže vodoničnih veza molekula vode kao i njene dinamike. Molekuli vode su neophodni biološkim molekulima da bi njihovo energetsko i strukturno stanje bilo postignuto na naj bolji način. Mreža vodoničnih veza molekula vode osciluje jer je osetljiva na elektromagnetna polja molekula sa kojima je u dodiru što ima uticaj na vodonične veze biomolekula rezonancijom. Energetsko stanje vode može imati pozitivan ili negativan uticaj na biološke molekule u zavisnosti od njene organizovanosti odnosno od dinamike paramagnetskih i dijamagnetskih svojstava. Sa strukturne tačke gledišta molekuli vode se mogu povezati preko različitih razdaljina sa biomolekulima ili jonima od manje preko jednog molekula vode do velike sa nekoliko ili mnogo molekula vode. U slučaju umerenih i velikih razdaljina, stabilnost struktura vode je krucijalni faktor. Velike razdaljine se savladavaju linearnom organizacijom vode koja nije stabilna. Organizacija vode se sastoji od malih i srednje veličine klastera koji su potrebni za različite biomolekule da bi posedovali različite udaljenosti. Molekuli vode mogu biti organizovane u klasterne na različite načine što zavisi od fizičko

hemijskih uslova u ćeliji, tkivu i telu. Ukupno stanje vode je dinamička ravnoteža pojedinačnih molekula vode, dimera i trimera sa jedne strane, koje čine 62% vode i sa druge strane malih, srednjih i velikih klastera koji čine preostalih 38% molekula vode. Otsustvo broja klastera odgovarajuće veličine može smanjiti fiziološku funkcionalnost vode. Vibracije molekula vode su determinisane prostornom simetrijom pozicija atoma kiseonika i vodonika čiji vektori koji su pokazatelji nukleusa ukazuju na pravac i relativnu veličinu kretanja. Intermolekularne talasne vibracije su u funkciji vodonične veze, koje su prvenstveno određene električnim dipolnim momentom zbog asimetrije naelektrisanja molekula koji su uključeni u interakciju. Vodonične veze između molekula vode nisu rezultat samo električnog privlačenja između pozitivnog naelektrisanog atoma vodonika i negativnog naelektrisanja atoma kiseonika susednih molekula vode koje mogu biti određene elektrostatičkim interakcijama što objašnjava klasična fizika Kulonovim zakonom opisujući privlačenje i odbijanje između naelektrisanja, nego su i kvantne prirode zbog delimično kovalentne prirode vodonične veze. Elektroni atoma vodonika i kiseonika teže stanju najmanje energije kroz smanjivanje ukupne energije što uključuje i njihovu energiju kretanja. Elektron vodonične veze će se širiti kroz prostor što će ga činiti delokalizovanim i može biti deljen sa više od jednog mesta vezivanja. Sferični klaster vode poseduje brojna mesta za vezivanje vodoničnih veza koje su locirane na različitim razdaljinama od osnovnog stanja. (Koruga 2008.)

Proces starenja je tako složen da je najverovatnije posledica dejstva različitih mehanizama (ne samo genetičkih nego i sredinskih), koji vode permanentnom gubitku proliferativnog kapaciteta, poremećaju homeostaze, smanjenoj otpornosti na stres i učestalijoj pojavi bolesti. Biološko starenje predstavlja univerzalan nepovratni biološki proces, prirodnu fazu u životnom ciklusu svake jedinke, koja se završava smrću. To je proces koji predstavlja genetički programirano otkazivanje mehanizama koji održavaju homeostazu (stalnost unutrašnje sredine organizma), nakupljanje oštećenja ćelijskih mehanizama koji obezbeđuju ćelijsku homeostazu ili antagonistička plejotropna

interakcija gena. Starenje je akumulacija promena u organizmu, multi-dimenzionalan je proces i obuhvata fizičke, fiziološke, psihosocijalne i socijalne promene. Starenje je takođe progresivan gubitak fizioloških funkcija usled koga raste verovatnoća umiranja. Biološke teorije koje objašnjavaju starenje mogu biti podeljene u dve grupe programiranog starenja i stohastičke grupe teorija starenja. Programirane teorije ukazuju da je proces starenja regulisan biološkim satom. Drugi mehanizam predstavlja skraćivanje dužine telomera tokom ćelijskog ciklusa. Ova regulacija zavisi od promena u ekspresiji gena koji utiču na sistem koji je odgovoran za održavanje, popravku i odgovor odbrane ćelije, tkiva i organizma. Stohastičke teorije uzrok starenja pre svega vide u faktorima spoljašnje sredine i uključuju progresivna oštećenja na različitim nivoima kao glavne uzročnike starenja, kao što su aktivni radikali ili unakrsno povezivanje polimera.

Embrion čoveka se sastoji prvenstveno od molekula vode, u starosti šest nedelja se sastoji od 97.5% vode, krajem embrionalnog razvića 85% dok se na rođenju sastoji od 83% molekula vode. Dinamika stvaranja i razgradnje klastera vode u embrionu kao i u plodovoj vodi je praćena intezivnom dinamikom paramagnetizma i dijamagnetizma. Tokom života se nastavlja trend smanjenja sadržaja vode u telu čoveka pa u detinjstvu poseduje 70% vode u zreloj dobi 65% a u starosti oko 60-50%. Relativni sadržaj vode je određen individualnim karakteristikama (navikama, ponašanjem, fiziološkim stanjem, genotipom) polom, tako da je kod žena zbog veće količine masnog tkiva nešto manji sadržaj vode. Voda se nalazi u ljudskom telu u različitim kompartmentima i njihov odnos je od suštinske važnosti za fiziologiju organizma, može se podeliti na ekstracelularnu i intracelularnu vodu. Kod novorođenčadi koja sadrži od 80%-83% vode u telu ekstracelularna voda čini 45%-53% telesne težine a intracelularna oko 30-35%. Nakon 1.5 godina njihove se koncentracije izjednačuju da bi nakon 4 g. odnos ovih voda bio obrnut, intracelularne blizu 50% a ekstracelularne nešto manje od 25%. Tokom života se menjaju i odnosi vrsta vode u telu. Stariji muškarci sadrže 60% vode a žene 55% od toga unutarćelijska tečnost čini 2/3 (63%) ukupne tečnosti tela i čini 70%

citoplazme ćelije, 85% ćelijske vode poseduje bulk strukturu dok je preostala voda manje pokretna i vezana za makromolekule. Sa starenjem se menja stepen hidratacije molekula, njene efikasnosti i brzine što suštinski utiče na strukturu i energetiku biomolekula, biohemijske reakcije i fiziologiju ćelija, tkiva i organizma u celini. Promenom organizacije vodoničnih veza molekula vode tokom života, zbog interakcije sa strukturama biomolekula i svojim jonskim sastavom se menjaju osobine molekula vode pa i njena transportna funkcija, da prenosi kiseonik i hranljive materije i da uklanja štetne produkte metabolizma da omogući brzu i efikasnu hidrataciju bioloških molekula.

Zdrava deca sadrže na rođenju više vode u telu od bolesne, naročito ekstracelularne vode dok je nešto manja razlika u sadržaju intracelularne vode. Novorođenčad sa dijabetesom sadrže ukupno 70,2% vode od toga ekstracelularne 38,5% a intracelularne 31,8%. Većina patoloških promena je u granicama od 10% sadržaja vode u telu. Manje se vode nalazi u tumoroznom tkivu nego u zdravom tkivu, dok kod malignih tkiva naročito kože količina vode može dramatično da se uveća.

Tokom procesa normalnog starenja postoje tri mehanizma aktivacije koji uzrokuju taj proces: sirov materijal, energija, i ćelijski signali obnavljanja. Postoje takođe tri faze starenja tokom životnog ciklusa: rađanje do dvadesete godine, od dvadeset do trideset pet godina i trideset pet godina pa naviše. Starenje bi se moglo objasniti modelom koji obuhvata mehanizme koji su međusobno povezani kao: skraćivanje telomera, nastajanje slobodnih radikala, promena slobodne energije i imuniteta, promene centriola odnosno mikrotubula i spoljni faktori.

Svi krajevi eukariotskih hromozoma se završavaju telomerama i štite genetske podatke, takođe omogućuju ćelijama da se dele, sprečavaju krajeve hromozoma da se habaju i da se fuzionišu. Bez telomera krajevi hromozoma bi izgledali raskinuti pa bi reparacioni mehanizmi ćelije pokušali da reparišu nešto što nije raskidano. Napravljene su od sekvenci TTAGGG koje se ponavljaju, na jednom lancu DNK i vezani su za AATCCC na drugom lancu. Telomere koje se

nalaze na krajevima linearnih hromozoma se skraćuju tokom procesa starenja sa svakom deobom ćelije. U ćeliji ranog embriona dužina telomere iznosi približno 15.000 nukleotida. Nakon brze deobe ćelija embriona u materici na rođenju dužina telomera je približno 10.000 nukleotida. Svaki put kad se ćelija prosečne osobe deli izgubi 30 do dvesto baznih parova sa kraja ćelijskih telomera. Ćelije normalno mogu da se podele samo oko 50 do 70 puta tokom čega se telomere sve više skraćuju sve dok ćelije ne ostare, umru ili ne postanu kancerogene. Skraćivanje telomera odvija se tokom čitavog života kako se ćelije dele, kada ćelije dostignu dužinu od oko 5.000 nukleotida, u starosti, više ne mogu da se dele i organizam umire od starosti. Skraćivanjem telomera se omogućuje stvaranje kancerskih ćelija ili drugih bolesti. Telomere, repetitivne sekvence na kraju svakog eukariotskog hromozoma pomažu stabilizaciji hromozoma. Na kraju hromozoma postoji jednolančana petlja na 3' kraju, koja štrči i formira strukturu, T petlju koja štiti telomeru i viđena je kao DNK oštećenje. Tri primarna mehanizma učestvuju u procesu skraćivanja telomera. Nepotpuna replikacija zbog ne mogućnosti DNK polimeraze da replicira sami kraj linearne molekule DNK, degradacije jednolančane petlje na kraju jednolančanog 3' kraja i oksidativnog stresa koji može da uzrokuje prekid jednolančanog dela DNK, što može da se akumulira i vodi do suštinskog smanjivanja telomera. Enzimi telomeraze nakon svake deobe dodaju baze na kraju svake telomere. Kod mladih ćelija, telomeraze čuvaju telomere od oštećenja. Ali ako se deobe ponavljaju nema dovoljno telomeraza tako da telomere postaju kraće i ćelija stari. Međutim samo telomere ne određuju životni vek jer čovek ima telomere koje su mnogo kraće od glodara. Skraćivanjem telomera aktivira se sistem za prevenciju daljeg umnožavanja ćelija.

Starenje izaziva akumulacija oštećenja molekula DNK, koje inhibiraju sposobnost ćelije da funkcioniše i aktivira odgovarajuće gene, što vodi do ćelijske smrti i opštem starenju. Osam gena kontrolišu koncentraciju steroida dehidroepiandrosteron sulfata u krvi čiji nivo brzo opada sa starenjem tako da ga u 85. godini ima 95% manje nego u pubertetu. Ovi geni su povezani sa

bolestima koji se javljaju tokom starenja kao dijabetes II i limfoma. Geni koji kontrolišu različite funkcije u ćeliji i organizmu u celini mogu delovati kao antagonisti odnosno biti plejotropni. Ovi geni mogu imati prednost u mladosti da očuvaju energiju za reprodukciju smanjenjem preciznosti somatskih ćelija da bi se ubrzao razvoj i reprodukcija, tokom života su posledice njihove aktivnosti uzroci propadanje i smrt. Pozitivan efekat gena u mladosti je smanjenje ulaganja materije i energije u telesne ćelije, dok je loš tokom kasnijeg života dezintegracija telesnih ćelija odnosno smrt. Geni koji omogućuju fiksaciju kalcijuma u kostima imaju pozitivan efekat u mladosti jer smanjuju rizik od preloma kosti i naknadne smrti ali imaju negativne posledice kasnije u životu zbog povećanog rizika od osteoartritisa zbog povećane kalcifikacije. Određeni geni ograničavaju broj deoba oštećenih ćelija rano u mladosti da bi sprečili razvoj kancerogeneze, međutim mogu da potstiču stvaranje kancera kasnije u životu zato što oštećene ćelije stimulišu druge premaligne i maligne ćelije i formiraju tumor. Odnos između ćelijskog starenja i starenja organizma je kompleksan. Ćelijska besmrtnost je suštinska za stem ćelije, ali besmrtne somatske ćelije su kancerogene. Apoptoza, programirana ćelijska smrt omogućuje kontrolisano eliminisanje somatskih ćelija bez oštećenja tkiva i povezana je sa inflamacijom čija je posledica nekontrolisana ćelijska smrt. Apoptoza je inicirana vanćelijskim signalima ili intracelularnim oštećenjem i odvija se aktivacijom proteolitičkih enzima koji se nalaze u malim membranskim strukturama. Razni onkogeni omogućuju sintezu i regulaciju proteolitičkih enzima capsaza ili su uključeni u prenos vanćelijskih ili unutarćelijskih signala. Proteini koji posreduju u procesu apoptoze uvećavaju propustljivost spoljašnje membrane mitohondrije i u interakciji sa anti apoptoza proteinima dovode do oslobađanja jona Ca^{2+} koji omogućuje smanjenje unutrašnjeg gradijenta protona uvećavajući produkciju slobodnih radikala, smanjivanje produkcije ATP i oslobađanja citohroma c, ovaj proces može da aktivira i oštećenje molekula DNK. Mitogeni, hormoni rasta su faktori koji pokreću proces mitoze, neophodni su za razviće i diferencijaciju ćelija kod mladih ali kod starijih su često povezani sa inflamacijom. Mitogeni deluju na površini ćelija i preko kinaza aktiviraju kaskadu enzima koji regulišu proces

mitoze, dok fosfataze deluju suprotno inaktiviraju ove enzime. Pronađene su tri familije kinaza koje regulišu ekstracelularne signale i dve familije koje su odgovorne za različite vrste stresa i one su intracelularne kinaze i zajedno mogu da vode do proliferacije i diferencijacije ili do apoptoze. Čelije koje stare više se ne dele i mogu da funkcionišu kao normalne čelije ali pokazuju mnoge različite karakteristike. Neke od karakteristika su uvećana produkcija aktivnih radikala, povećana oksidativna oksidacija, uvećana glukozaciona oštećenja i smanjena ekspresija proteina toplotnog šoka, dok kompletno nestaje H1 histon koji učestvuje u pakovanju molekula DNK. Zavisno od uticaja ostalih regulatornih proteina može biti izazvana proliferacija ili apoptoza starih čelija. Stare čelije su otporne na apoptozu sve dok ne postanu osetljive na povrede zbog opadanja funkcije apoptoznih proteina što uslovljava brzi porast degradiranih proteina. Stari fibroblasti sintetišu metaloproteaze koje razgrađuju kolagenu matricu i sekretišu inflamatorne citokinine kao interleukin 1. Postoji međusobna povezanost između čeljkog starenja, apoptoze, tumora i starenja organizma. Starije čelije poseduju manje efikasnu kontrolu čelijskog ciklusa ređe će ulaziti u stanje apoptoze kad su neispravne ali će češće ulaziti u stanje disfunkcionalne apoptoze. Visok nivo apoptoze će u starom tkivu dovesti do degeneracije tkiva. Akumulacija slobodnih radikala, glikolizacija i drugi oblici čelijskih oštećenja vodi do povećanja disfunkcionalnosti kontrole čelijskog ciklusa.

Još jedan faktor starenja je glukolizacija i odvija se kad se glukoza vezuje za neke molekule DNK, proteine i lipide čineći ih nesposobnim da obavljaju svoje funkcije. Ovaj problem je sve ozbiljniji sa starenjem čineći da tkivo postaje nefunkcionalno što rezultuje u bolesti i smrti. Ovaj proces je odgovoran za produžetak životnog veka životinja koje unose manju količinu hrane.

Najveći uzrok starenja je oksidativni stres. Slobodni radikali su visoko reaktivni atomi, molekuli koji poseduju nesporen elektron u spoljnoj orbitali koji ne učestvuje u molekularnoj vezi. Jako su oksidirajući molekuli jer teže da preuzmu elektron od drugog molekula da bi sparili svoj neupareni atom. Atomi ili mali molekuli koji su slobodni radikali teže da budu nestabilni zato što veći molekuli poseduju kapacitet da formiraju rezonantne strukture sa njima. Naj

češći su radikali hidroksil OH^\cdot , pojedinačan molekul 1O_2 , superoksidni anjon O_2^\cdot vodonik peroksid H_2O_2 i azotmonksid NO . Što je kraći polu život aktivnog radikala veća je njegova reaktivnosti i obično se interakcija sa stabilnim molekulom odvija u trenutku od 1 ns. Primarno, aktivni radikali napadaju mitohondrijalnu DNK organelu koja produkuje hemijske materije, energiju koju koristi ćelija, i kao nusproizvod aktivne radikale i proizvode oksidacije kao molekuli vode i ugljen dioksid. Oksido-redukcione reakcije, kroz transport elektrona na unutrašnjim membranama mitohondrija, stvarju aktivne radikale. Aktivni radikal oduzima elektron od susednog stabilnog molekula razbijajući stabilnu vezu i formiraju još dva aktivna radikala ostavljajući dva atoma da dele neuparen elektron, takva lančana reakcija može da izazove produkciju na hiljade aktivnih fragmenata. Takođe su proizvod inflamacije, infekcije u procesu fagocitoze kao odgovor na bakterijsku i virusnu infekciju. Ćelijske membrane su sastavljene od nezasićenih masnih kiselina koje su osetljive na oštećenje slobodnim radikalima, oksidaciju i podložne su nekontrolisanoj lančanoj reakciji. Oksidativno oštećenje koje uzrokuju slobodni radikali vodi do raskidanja ili zasićenja lipida što vodi oštećenju i promeni funkcije ćelijske membrane. Na dejstvo aktivnih radikala nije osetljiva samo DNK, mitohondrijalna i jedarna, nego i ostali molekuli kao RNK, enzimi, proteini, i lipidi. Oksidanti raskidaju proteine ćelijskih membrana razarajući ćelijski indentitet, fuzionišu ćelijske membrane i proteine, raskidaju jedrove membrane izlažući genetički materijal mutacijama i raskidanju. Mitohondrije usled dejstva produkata oksidacije aktivnih radikala gube efikasnost zbog oštećenja mitohondrijalne DNK pa ćelija gubi sposobnost da produkuje energiju i postepeno umire. Aktivni radikali nisu samo uzrok strukturnih oštećenja nego imaju i fiziološki važne posledice u biološkim procesima oksidacije, dovode do poremećaja osetljivih redoks signalnih puteva. Mešoviti disulfidi koji nastaju na ovaj nači menjaju unutar ćelijski tiol/disulfid redoks status što je asocirano sa disfunkcijom ćelije, sa fotofiziološkim procesima povezanim sa starenjem. (Papić-Obradović 2010.)

Nesumnjivo da značajnu ulogu u nastanku starenja imaju i neuroendokrini i imuni sistem, kao i njihove međusobne interakcije kao i u ćelijskoj signalizaciji i metabolizmu. Tokom procesa starenja se odvijaju promene u interakciji ćelija ćelija koja je jako zavisna od slobodne energije i imunologije, koja slabi tokom godina. U mladim godinama imuni sistem se sastoji od ne izdiferenciranih T ćelija i nekoliko memorijskih ćelija, dok u starijem dobu broj memorijskih ćelija u velikoj meri raste i znatno raste broj efektorskih ćelija. Kao odgovor na ove promene u T ćelijama se menja produkcija citokinina i ekspresija markera T ćelija zbog čega se na površini odvijaju dramatične promene, koje utiču na promene fenotipa ćelije na periferiji. Promene koje prate starenje u fenotipu i ekspresiji gena adipocita, endotelnim ćelijama, stroma ćelijama prostate, ćelijama bubrega i hemopoetskim stem ćelijama menjaju interakciju sa T ćelijama ali takođe i sa nekoliko regulatornih interakcija između perifernih ćelija različitog tkiva. Hormoni koji regulišu reprodukciju deluju na antagonistički plejotropni način i kontrolišu starenje preko signala ćelijskog ciklusa, promovišu rast i razviće rano u životu u cilju postizanja reprodukcije ali kasnije u životu postaju disregulisani i pokreću starenje. Tokom starenja se smanjuje sekrecija hormona kako reproduktivnih tako i ostalih naročito hormona rasta. Produkcija hormona rasta počinje da opada sa potpunim razvićem oko 20 godine, produkcija hormona rasta počinje jače da opada, sa 30 godina se izgubi 75% sposobnosti da se repariraju i regenerišu ćelije tela. Tokom života i kod muškaraca i kod žena se smanjuje količina testosterona u krvi za 1% godišnje što je uzrok nekih bolesti i stanja vezanih sa starenjem kao: dijabetes, srčane bolesti, visok nivo holesterola, povišen pritisak i gojaznost. Tokom starenja se povećavaju nivoi: kortizola i insulina dok se smanjuje produkcija: hormona rasta, dehidroepiandrosterola, tiroksina, melatonina što uzrokuje čitav niz metaboličkih promena: rezistentnost na insulin, povećanu koncentraciju glukoze, holesterola, triglicerida, trombogeneze. Efikasnost imunog sistema dostiže vrhunac u pubertetu i postepeno se smanjuje sa starenjem, što je bazirano prvenstveno na T ćelijama i povezano je sa većom osetljivošću na infekcije, kao i većim brojem autoimunih oboljenja kod starijih. T ćelije gube

efikasnost još rano u životu zbog smanjivanja funkcije timus žlezde. Kvalitet i kvantitet T ćelija opada posle puberteta, sa starenjem izvestan broj antitela gubi svoju efikasnost tako da svaka bolest ubrzava proces starenja.

Postoji obrnuta zavisnost između stope metabolizma i dužine života što se objašnjava smanjenjem oksidativnog stesa. Unošenjem veće količine potencijalne energije, preko hrane, brža je stopa metabolizma što omogućuje brže metaboličke aktivnosti i organizam brže stari. U ćelijama postoji velika količina potencijalne energije koja je skladištena u kovalentnim vezama kao energija elektrona i znatno je veća od toplotne energije. Promet energije povećava verovatnoću održavanja životnih funkcija i apsolutno je neophodan za organizaciju ćelije i organizma. U svakom momentu energija se transformiše, rearanžira i degradira a njen deo se gubi kao toplota. Ovaj promet energije organizuje materijalni sistem daleko od stanja termodinamičke ravnoteže podižući energetske nivo, stvarajući gradijent. Ključno za život je zajednički spontani među odnos između ćelijskog sistema i okoline, od kojih se svaki organizuje i dezorganizuje. Svaka ćelija obuhvata usaglašene pokrete 10^{23} molekula vode i svaka ćelija je sinhronisana sa drugom. Pojedinačni molekuli vode se slučajno i nasumično bez reda i obrasca kreću. U trenutku faznog prelaza počinju da se kreću kolektivno u ćelijsku formaciju sve kao jedna. Takva ćelija je disipativna struktura i zavisi od prometa energije za svoje kontinuirano postojanje tako da pretstavlja koherentnu strukturu koja se dinamički održava. Svi živi sistemi poseduju dva glavna aspekta: opšta prisutnost ciklusa na svakom nivou organizacije i povezanost svih cikličnih procesa. Tajna metabolizma žive ćelije je da dobijena energija iz neke reakcije je uvek povezana sa energijom potrebnom za započinjanje te reakcije. Hemijski ciklusi se odvijaju kao rezultat prometa energije. Centralni proces koji povezuje energiju koja se oslobađa i energiju potrebnu za započinjanje procesa je ciklična interkonverzija ATP i ADP. Slobodna energija je veoma bitna za žive sisteme. U svim spontanim procesima slobodna energija se uvek smanjuje. Proces koji obuhvata promenu negativne slobodne energije (gubitak slobodne energije u okolinu) je spontan egzogeni; dok proces koji uključuje promenu pozitivne slobodne energije ili

dobitak slobodne energije je endogeni i nije spontan. Slobodna energija je razlika između ukupne energije ili entalpije i entropije i one se menjaju tokom biohemijske reakcije u ćeliji i organizmu. Ćelije su daleko od stanja termodinamičke ravnoteže i funkcionišu na molekularnom kvantno mehaničkom nivou, energija se u njima sadrži na različitim nivoima: elektronskom, vibracionom, rotacionom i translacionom nivou. Skladištena energija direktno zavisi od prostorno vremenske strukture ćelije. Ova energija je koherentna i pogodna da obavi neki rad. Živi sistem predstavlja termodinamiku organizovane kompleksnosti. Dok funkcioniše organizam može mobilisati ceo spektar energija za rad, od translacione do elektronske čineći razliku između vezane i slobodne energije između one koja je neraspoloživa i drugih raspoloživih. Energija može da se zarobi direktno na nivou elektrona ali takođe i u strukturama sistema: gradijentima, poljima i u proticanju, organela ćelija i tkiva. Tokom starenja egzogeni procesi sve više dominiraju pa biohemijske reakcije postaju sve manje efikasne što dovodi do rasipanja energije i sve većeg oštećenja živih struktura i njihove manje efikasnosti da održavaju svoju prostornu i vremensku organizaciju. Živi sistemi zbog promene svoje prostorno vremenske organizacije teže postizanju termodinamičke ravnoteže. Organizan u mladosti mobilisuje svoje koherentne energije i dostupan je unutrašnji spektar skladištenih energija za rad efikasnije i brže, međutim tokom vremena gde god je potrebna a sa starenjem je ovaj proces sve manje efikasan i sporiji. Svi fizički sistemi se iscrpljuju dok se sve korisne energije na kraju ne iskoriste i na kraju se raspadaju na homogeno dezorganizovano stanje. Organizmi su antientropijski onoliko dugo koliko su živi. (Mae Wan Ho, 2008.)

Svakog trenutka ćelije čoveka se dele i hromozomi repliciraju, telomere postaju kraće, greške koje nastaju oksidativnim stresom i drugim mehanizmima se nakupljaju u centriolama i mikrotubulama koje grade deobno vreteno i citoskelet. Ove promene vode ka oštećenju hromozoma tokom svake naredne deobe somatskih ćelija. Sa skraćivanjem telomera veća je verovatnoća da hromozomi pretrpe neku promenu tokom ćelijske deobe, da se pogrešno razdvoje ili da se dogodi promena strukture hromozoma. Postoji jaka korelacija

između dužine telomera i dužine života čoveka. Sa starošću se povećava proporcija somatskih ćelija sa poremećajima u građi i broju hromozoma: aneuploidija, poliploidija i strukturnih aberacija hromosoma. Deobno vreteno je u interakciji sa citoskeletom i građeno je od istih molekula kao i on. Osnovni strukturni delovi citoskeleta i deobnog vretena su: mikrofilamenti, mikrotubule i prelazni filamenti. Proteini citoskeleta su raspoređeni tako da grade rešetku, (mikrotrabekularna rešetka). Ona obavija sve organele i prostire se oko njih prožimajući čitavu ćeliju. Rešetka ujedinjuje organele i citoskelet u jedinstven sistem, dajući time organizaciju citoplazme, određuje oblik same ćelije, kao i za pokrete same ćelije i raspored organela unutar nje. Struktura, deobno vreteno, izgrađena od mikrotubula je odgovorna za tačno razdvajanje hromozoma tokom ćelijske deobe. Organizacija i orijentacija deobnog vretena je od suštinske važnosti za precizno razdvajanje hromozoma kod eukariota i postiže se pomoću interakcije mikrotubula koje svojom dinamikom omogućuju obrazovanje deobnog vretena. Prostorna i vremenska koordinacija između vrha deobnog vretena i ekvatorijalne ploče je suštinska za razdvajanje hromozoma isto i za obrazovanje raznovrsnosti ćelija tokom razvića eukariota. Interakcija mikrotubula centriola i astralnog kompleksa u vodenom okruženju diktira pozicioniranje deobnog vretena. Tokom asimetrične ćelijske deobe se oscilatorno pokreću polovi deobnog vretena. Aktinski citoskelet prolazi kroz drastične promene i remodeliranje tokom ćelijske deobe. Tokom deobe se aktinska mreža demontira i rearanžira, krajem mitoze formira kontraktilni prsten koji omogućuje citokinezu. Aktinska mreža ima važnu ulogu u razdvajanju centriola što je zavisno od kortikalnog kretanja kortikalne aktinsko miozinske mreže. Regulacija aktinskog citoskeleta i odvijanja ćelijskog ciklusa su povezane i njihova funkcionalna veza su proteini koji regulišu aktinski citoskelet i upleteni su u kontrolu ćelijskog ciklusa. Orijetacija deobnog vretena je veoma osetljiva na ometanje molekula aktina citoskeleta, nakratko pre anafaze orijentacija postaje nezavisna od aktina. Hromozomi se razdvajaju u dve faze, u prvoj fazi sila koja omogućuje razdvajanje hromozoma nastaje izduživanjem deobnog vretena klizanjem između mikrotubula koje grade deobno vreteno u drugoj fazi se posle plitkih brazda formiraju nizovi aktinskih

fibrila duž brazda sa kontaktom i omogućuju razdvajanje hromozoma do kraja deobe. Signali koje generišu hromozomi omogućuju rast mikrotubula i njihov intracelularni gradijent omogućuje sklapanje deobnog vretena. Orijentacija deobnog vretena je zavisna od adhezije ćelije za njenu okolinu. Strukturni element deobnog vretena je antiparalelni niz mikrotubula sa njihovim minus krajevima koji su pričvršćeni za polove deobnog vretena i plus krajevima koji su usmereni prema hromozomima. Mikrotubule su rigidni polarni polimeri sastavljeni od α i β dimera tubulina sa sporo rastućim minus krajem i brzo rastućim pozitivnim krajem. Dve osobine rešetke mikrotubula omogućuju izgradnju deobnog vretena, krajevi mikrotubula podležu stohastičkim promenama od polimerizacije do depolimerizacije, dinamička nestabilnost. Hidroliza GTP β tubulinom, koji je povezan sa mikrotubulama, daje energiju za pokretanje polimerizacije neravnotežne dinamike što omogućuje odvijanje mehaničkog rada u ćeliji i polarne mikrotubule služe kao staza za mehanohemijski motor dineinske (kreću se ka minus kraju) i kinezinske (idu prema plus kraju) superfamilije; ovi proteini pretvaraju energiju hidrolize ATP za prostorno premeštanje duž mikrotubula. Molekuli kinezina imaju korak od 8 nm na svaki hidrolizovani molekul ATP, dok dinein ima 8, 16, 24 i čak 32 nm korak na hidrolizirani molekul ATP. Hromozomi čine drugi strukturni element deobnog vretena i nisu samo pasivni nego su i aktivni učesnici u stvaranju deobnog vretena i njegove dinamike. Kinetohore, kompleksne molekularne mašine koje se okupljaju na centromeri, formiraju lokalizovano sa velikim afinitetom, mesto za vezivanje deobnog vretena mikrotubula za hromozome i po jedan kinetohor poseduje svaka hromatida. Najmanje tri različite pod populacije mikrotubula učestvuju u obrazovanju deobnog vretena, mikrotubule kinetohora koje se završavaju na kraju spoljnjeg regiona kinetohore i koje povezuju hromozome na kraju polova deobnog vretena, međupolarne mikrotubule polaze od suprotnih polova i interreaguju na antiparalelni način i stabilizuju bipolarnost deobnog vretena i astralne mikrotubule koje se protežu od centromera ka citoplazmi i koji deluju kao ručice za orijentaciju i pozicioniranje deobnog vretena unutar ćelije. Stopa promena krajeva mikrotubula od stanja depolimerizacije do stanja polimerizacije je pokretačka snaga brzog prometa

mikrotubula, stope katastrofičnosti što regulišu dva antagonistička proteinska faktora, kontrolišući osetljivost krajeva mikrotubula. Regulacija ovih proteina je posredstvom faktora regulacije ćelijskog ciklusa koji omogućuju brži promet mikrotubula za vreme mitoze u odnosu na interfazu procesom fosforilacije. Deobno vreteno je veoma dinamična struktura, veliki broj mikrotubula se brzo polimerizuje i depolimerizuje dok se kontinuirano premeštaju ka polovima neophodno je da se mala površina kinetohore susretne sa mikrotubulama. Najmanje sedam familija kinezina i citoplazmatički dinein su uključeni u različite aspekte funkcionisanja deobnog vretena. Ovi tetramerni proteini poseduju domene motora na oba kraja i mogu da se unakrsno vezuju i klize duž antiparalelnih mikrotubula u suprotnom pravcu. Kompleksno međudejstvo između sila koje stvaraju motorni proteini povezani sa kinetohorama, hromatidama hromozoma, i mikrotubulama deobnog vretena kao i one generisane dinamikom polimerizacije mikrotubula deobnog vretena i omogućuju razdvajanje hromozoma. Za vreme kondenzacije hromozoma kinetohore se sklapaju u oblasti centromere hromozoma i formiraju lokalizovano mesto velikog afiniteta na hromozomima da zarobe mikrotubule deobnog vretena, obezbeđuju neophodno visoku tačnost razdvajanja i praćenja vezanosti hromozoma za mikrotubule, regulišu prelaz metafaze u anafazu i deluju kao glavni učesnik u pokretanju hromozoma deobnim vretenom. Pokretanje hromozoma u deobnom vretenu su povezane promenama u dužini mikrotubula za koje su zakačeni kinetohorama. Kinezin veoma velike molekularne mase koji pokazuje motornu aktivnost u pravcu plus kraja mikrotubula je uključen u hvatanje kinetohore za mikrotubule deobnog vretena u toku skupljanja u metafaznoj ploči i održavanje skupa. Kinezinski motori su uključeni u pokretanje hromozoma ka polovima preko minus krajeva mikrotubula delujući kao faktor spojnice za depolimerizaciju mikrotubula. Sile koje deluju na hromosome se potpuno uspostavljaju u metafazi pa raspad veze sestrinskih hromatida na prelazu profaze u anafazu su dovoljne da pokrenu deobu hromozoma ka polovima u anafazi. Razdvajanje kohezina, lepka koji drži hromatide zajedno, je dovoljan da indukuje anafazu. Kretanje hromozoma ka polovima je asocirano sa depolimerizacijom kinetohornih proksimalnih tubula.

Sile za pomerenje hromozoma deobnim vretenom nastaju dinamikom polimerizacije mikrotubula i od dejstva motornih proteina i obezbeđuju povlačenjem razdvajanje neophodno za razdvajanje hromatida tokom deobe. Sile mogu biti visoko lokalizovane kao one koje stvaraju kinetohore ili distribuirane kao što je ona koja je generisana duž mikrotubula deobnog vretena ili duž hromatida. Mitoza može da bude simetrična i asimetrična što može imati duboke posledice po ćeliju, razvoj ili bolest u zavisnosti koja vrsta deobe na kom stadijumu razvika se odvija. Malo je poznato kako se pozicioniranje deobnog vretena reguliše. U nekim tkivima se slučajno određuje tip ćelijske deobe, dok se u drugim tkivima kroz slučajne varijacije u poziciji deobnog vretena uslovljava kasnija sudbina sestrinske ćelije. Ćelije ne sadrže samo proteinske faktore koji su važni za formiranje deobnog vretena već i faktore bitne za određivanje sudbine ćelije. U zavisnosti od fiziološke funkcije ćelije se odvija bliska interakcija molekula vode sa mrežom polimerizovanih mikrotubula, sa povećanjem brzine deobe ćelije se povećava brzina mobilnosti molekula vode. Mikrotubule su dinamički nestabilni molekuli, međutim njihovu stabilnost može da modifikuje više parametara, kao više asociiranih proteina drugi razni molekuli kao neki lekovi i molekuli vode preko promene konformacije heterodimera od kojih su građeni. Sklapanje mikrotubula od njegovih funkcionalnih subjedinica, tubulina je proces koji je pokrenut promenom entropije u sistemu što se postiže smeštanjem molekula vode oko molekula, na što utiče aktivnost molekula vode koja se smanjuje sa smanjenjem temperature. Polimerizacija dimera tubulina uključuje povećanje entropije i smanjenje slobodne energije uz eliminaciju vode. Zbog promene orijentacije molekula strukturne vode na mestima kontakta subjedinica u neskopljenim naspram sklopljenih mikrotubula ukupna entropija je veća u sklopljenom stanju. Nekovalentne asocijacije proteina kao polimerizacija mikrotubula se odvijaju posredstvom četiri tipa molekularnih interrekcija: vodoničnim vezama, van der Waals vezama, elektrostatičkim vezama i hidrofobnim vezama od kojih je hidrofobna interakcija najuticajnija, dok su ostale važne u održavanju strukture proteina. Konformaciona stabilnost proteina je zavisna od finog

balansa ovih interakcija koje su osjetljive na fizičke osobine intracelularnih molekula vode odnosno rastvora vode unutar ćelije. (Lodish 2004.)

Mašinerija deobnog vretena deluje u vodenom okruženju. Molekul vode je 0.1 nm u prečniku, dok su globularni proteini za dva reda veličine veći. Ova razlika u veličini sugerše da tečnost može biti tretirana kao kontinualna. Na protein koji se kreće kroz vodu deluju česti i neusklađeni momenti impulsa koji nastaju termalnim kretanjem tečnosti. Ovo vodi ka slučajnom kretanju kad protein čini izuzetno česte i kratke korake (dužine 0.01 nm i trajanje $\sim 10^{-13}$ s u slučajnom pravcu. U intracelularnom svetu difuzija je veoma efikasna u malim vremenskim intervalima i na kratkim razdaljinama, dok je prinudno kretanje efikasnije u dužem vremenu na većim daljinama. Površinska struktura vode na mikrotubulama ima značajnu ulogu kao medijator elektrostatičkih interakcija i omogućuje entropijski doprinos vezivanju. Vibracije proteina, malih frekfencija, su od suštinske važnosti za funkciju proteina i jako su povezani sa molekulima vode dok su srednje i visoko frekfentne vibracije suštinski nepovezane sa vodom izuzev onih prisutnih na površini proteina. Organizacija molekula vode, slično nekim antikancerogenim lekovima, bi mogla da utiče na dinamičku nestabilnost mikrotubula što utiče na modifikaciju bioloških procesa mikrotubula i signalnih puteva što dovodi do apoptoze kroz akumulaciju signala do dostizanja praga za otpočinjanje apoptoze ili smanjenjem praga za aktiviranje mehanizma za ćelijsku smrt. Molekuli proteina tubulina u rastvoru su okruženi molekulima vode, vodonične veze se formiraju između molekula vode i naelektrisanih ostataka aminokiselina u molekulu proteina. Molekuli vode hidratacionog sloja teže da optimizuju strukturu proteina energetski i pomažu proces prepoznavanja sa drugim molekulima. Dinamika molekula vode hidratacionog omotača u trajanju od pikosekunde determiniše konformacioni prelaz proteina. Dinamika uređenih molekula vode je od suštinke važnosti za funkcionisanje proteina. Ćelijska voda je više struktuirana od okolne bulk vode tako da većina jona Na^+ i K^+ u ćeliji nisu slobodni nego su asocirani sa naelektrisanim mestima na makromolekulima. Naj bitniji deo molekula vode je u obliku hidratacione vode koja je vezana za različite makromolekule. Ova

granična voda je loš rastvarač za jone a dobar za nepolarne molekule, poseduje nižu tačku smrzavanja i veće je viskoznosti i poseduje dinamičku korelaciju između pojedinačnih molekula. Ovakva vicinalna voda okružuje citoskelet pa i mikrotubule. Prisustvo dugodometnog dipolarnog reda dovodi do obrazovanja unutrašnjeg električnog polja ili kolektivnih oscilacija električnog polja. Molekuli vode graničnog sloja i u šupljinama mikrotubula emituju kolektivnu infracrvenu emisiju fotona i molekuli vode u šupljini mikrotubula zajedno sa tubulinom koji gradi zid mikrotubula i stvara elektromagnetske solitone preko kojih se transportuje energija koja je skladištena u kolektivnoj dinamici molekula vode. U šupljinama mikrotubula, prečnika 14 nm se nalazi voda u uređenom stanju zbog interakcije sa dipolima heterodimera koji grade unutrašnji zid šupljine, zbog konformacije α i β dimera što definiše pozicija njihovog neuparenog spina. Dimeri su negativnog naelektrisanja pa privlače katjone, po molekulu se vezuje 14 molekula vode za jon Ca^{2+} , u ćelijskoj vodi se takođe nalaze joni K^+ i Na^+ koji uravnotežavaju negativno naelektrisane grupe proteina koji grade citoskelet. Mikrotubule kao i aktin i drugi proteini citoskeleta formiraju negativno naelektrisan matriks na kojoj su polarni molekuli vode vezani i uređeni. Kad se molekuli aktina i tubulina polimerizuju citoplazma se transformiše od vodenog rastvora (sol) stanja u čvrsto želatinozno (gel) stanje. U gel stanju citoplazme, između dve površine citoskeleta se nalazi 5 do 9 slojeva molekula vode tako da je ćelijska voda kompletno uređena i struktuirana. Polimerizacija molekula aktina i dinamika citoskeleta može uzrokovati faznu tranziciju koja odgovara fluksu jona i gradijentu napona nezavisno od aktivnosti membrane. Znatno deo molekula vode u ćeliji je u obliku hidratacione vode vezene za mikrotubule, jedan njen deo postoji kao međugranična voda, pokazuje veću viskoznost od obične vode i pokazuje dinamičku korelaciju između pojedinačnih molekula. Veći deo molekula ovakve vode okružuje mikrotubule, čemu doprinosi velika površina ovih molekula u odnosu na okolnu vodu. U njoj je prisutan dipolarni red dugog dometa koji vodi do obrazovanja unutrašnjeg električnog polja i njegovih kolektivnih oscilacija. Uticaj faktora okoline, kao uređenost molekula vode, na uređenu vodu u šupljini mikrotubula je odgovorna za rasipanje energije

gubitkom fotona iz uređenih molekula vode u šupljini. Ovo isticanje uzrokuje dekoherentnost koherentnog stanja sistema uređenja voda mikrotubula, što utiče na promenu konformacije dimera. Kolektivni režimi su ključni za dinamiku živih sistema. Kolektivnim kretanjem molekula vode i dimera mikrotubula u mikrotubularnoj šupljini omogućuje se stvaranje i transport solitonskih talasa uspostavljanjem koherentnih kvantnih režima. Mikrotubule u vodi podržavaju površinske elastične talase sa frekvencijama u oblasti gigaherca i akustičke talase brzine 200-600 m/s. Takođe poseduje piezoelektrična svojstva što ih čini pogodnim za pretvaranje između električnih i mehaničkih (elastičnih) oscilacija. Ako se voda pretstavi kao stojeći trodimenzionalni talasi različite prirode: termalni de Broglievi talasi, IR fotoni i termalni akustični talasi moguće je zamisliti obrazovanje kvantno koherentnog stanja kao rezultata kvantno elektromagnetnih interakcija dimera mikrotubula sa molekulima uređene vode koja ih okružuje u unutrašnjosti cilindra mikrotubule. Oko mikrotubula se formira lokalno električno i magnetno polje koje varira od 0.01 V/m do 10 V/m električnog inteziteta i 10^{-10} do 10^{-7} T gustine magnetnog fluksa što utiče na lokalnu strukturu molekula vode.

Sa starenjem, i dužim vremenom izlaganja spoljašnjim faktorima, spoljašnji slojevi kože (epidermis) postaju stanjeni i transparentni čak i ako broj ćelija u slojevima ostaje neizmenjen. Broj pigmentnih ćelija, melanocita, se smanjuje ali preostale melanocite uvećavaju svoju veličinu. Staračke pege se pojavljuju na mestima koja su izlagana suncu, promene u vezivnom tkivu smanjuju čvrstinu i elastičnost kože ove promene su poznate kao elastoza i posebno su prisutne u oblastima tela koje su izložene suncu. Slobodni radikali su prisutni u okruženju kao zagađivači vazduha, izvor im je sunčeva svetlost, radijacija itd. Stresne situacije su važan faktor u procesu starenja jer se odgovor organizma na ovo stanje obezbeđuje različitim mehanizmima koji utiču na povećanje inteziteta metabolizma, koncentracija nekih hormona se povećava dok se smanjuje koncentracija drugih hormona, takođe utiču i na smanjivanje efikasnosti imunog sistema. Radijacije je jedan od glavnih faktora spoljašnje sredine koji utiče na starenje oslobađanjem aktivnih radikala kao što su $\text{OH}\cdot$ i

HO₂⁻ radikala. Oni se nalaze prirodno u ćelijama i njihova koncentracija raste sa porastom nivoa metabolizma. Spoljašnji faktori i različita živa bića su u stalnoj interakciji sa organizmom. (Papić-Obradović 2010.).

Tokom starenja dolazi do promene metabolizma vode u telu, ukupna količina vode u telu se smanjuje kao i intracelularna a nasuprot tom procesu se povećava prag osećaja žeđi. Smanjivanjem vode u ćeliji se nagomilavaju toksini koji dodatno doprinose oštećenju i smrti ćelije. Aktivnost renina se smanjuje sa starenjem kao i produkcija aldosterona dok dolazi do povećanja vazopresina, i atrijskog natriuretičkog hormona što dovodi do porasta odgovora na osmotsku stimulaciju. Vremenom se smanjuje težina bubrega, renalni krvotok se redukuje, smanjuje se kapacitet za izlučivanje, za koncentrisanje, zadržavanje natrijuma, i odgovor na vasopresin, zbog smanjenog broja nefrona i osetljivosti na prisustvo ADH, što sve zajedno vodi do hiponatremije, zadržavanja vode ili gubitka natrijuma, unošenja velike količine vode, renalna insuficijencija i nedovoljne sekrecije ADH. Posledice ovog stanja mogu biti nastajanje tumora, apscesa pluća ili infekcije, hipotireoidizma, dijabetesa i adrenalne insuficijencije. Do gubitka vode u telu i stanja stalne dehidracije dolazi smanjenjem unosa vode i povećanim izlučivanjem usled dubokih fizioloških promena čiji su uzroci na molekularnom nivou i posledica su starenja. Promena u balansu fluida se kontinuirano odvija sa starenjem. Od smanjenja ukupne količine vode je značajniji gubitak heksagonalne vode u telu od rođenja do starosti. Starenje je gubitak heksagonalne strukturirane vode u telu, organima, tkivima i ćelijama koji se odvija uporedo sa smanjenjem ukupne količine vode u organizmu naročito intracelularne. Gubitak heksagonalne vode vodi do gubitka kalcijuma što izaziva čitav niz problema tokom starenja: direktan uticaj na mišiće, kosti i funkciju nervnih ćelija. Kalcijum je jon koji stvara strukturu što znači da održava heksagonalnu strukturu vode. Kosmotropni joni kao kalcijum i neke amino kiseline doprinose stvaranju i održavanju heksagonalne strukturisane vode. Heksagonalna voda je u rezonanci sa nekim strukturnim aminokiselinama koje održavaju ćelijsku strukturu i pomažu održavanje ćelijskog integriteta i funkcije. Voda je nophodna komponenta ćelijske strukture i metabolizma neophodna je

za transport hranljivih materija, kiseonika, produkata metabolizma, hormona, uključena je u prenošenje i realizaciju genetskih i ostalih informacija, procese reparisanja ćelijskih oštećenja i ostalih bioloških funkcija kao starenja.

6.1. Voda: Slobodna, vezana, međućelijska i ćelijska (aquaporini)

Voda se u tečnom stanju sastoji od klastera manje gustine u kojima su molekuli dalje jedan od drugog kao i klastera sa većom gustinom u kojima su molekuli bliži jedan drugome. Molekuli vode u klasterima trepere između partnera kako se njihove vodonične veze konstantno stvaraju i raskidaju. Tokom dužeg vremena trajanja, oni su izgleda privilegovano uređeni. Prirodna strukturisanost na uobičajenim temperaturama u vodi teži prema kolapsirajućoj strukturi, ova struktura veće gustine može rasti da bi formirala veće ne kristalaste klasterne. Voda se može zamisliti kao ravnoteža između dve vrste klastera, strukture veće gustine, u kojoj se molekuli vode drže bliže ne vezujućim interakcijama, formirajući gušću strukturu, i strukture manje gustine, sa molekulima koji se drže dalje jedan od drugog povezanih vodoničnim vezama. Postoji mala razlika u energiji između ovih struktura, tako da je ekvilibrijum lako pomeren prema strukturama veće gustine u prisustvu rastvoraka i površina.

Unutar ćelija se voda na površini njihovih molekula razlikuje od glavne mase vode (bulk). Vodeni biofluidi su elektroliti i sadrže biopolimere, hranljive materije i metabolite. U stanju stresa, intracelularna voda je prinuđena da zauzme prepune međuprostore sa dostupnim kanalima između ćelijskih biopolimera, konkurenti u prostoru su nanometarskih razmera. Vodeni medijum, rastvarač, omogućuje kontrolu za samo spajanje molekula proteina, "hidrofobne interakcije" fenomen koji značajno doprinosi konformaciji proteina i za strukturnu stabilnost membrana za zajedničko pomeranje lipidnih slojeva i za čin podmazivanja za unutrašnje dinamičke strukture.

Ćelijska voda se sastoji od klastera manje gustine sa više kalijumovih jona. Razlike u intracelularnoj i ekstracelularnoj sredini ćelije je prvenstveno usled proširene specifične površine i visoke intracelularne koncentracije rastvoraka koji potpomažu obrazovanje klastera vode niže gustine i ograničavaju difuziju unutar ćelije. Proširene površine ćelijskih membrana (svaka ćelija jetre sadrži $\sim 100\,000\ \mu\text{m}^2$ specifične površine membrana) pomažu stvaranje vode niže gustine unutar ćelije, kako membranski lipidi sadrže glave od hidrofilnih grupa koje potstiču organizaciju asociirane granične vode. I druge površine privlače vodu, takvo razvlačenje molekula vode povezanih vodoničnim vezama opkoljene stešnjem razmacima u ćelijama omogućuju stvaranje ekvilibrijuma klastera različitih gustina.

Struktura vode unutar ćelije u blizini biomolekula nametnuta je jedino geometrijom okružujućih vodoničnih veza. Molekuli vode se povezuju vodoničnim vezama ne samo sa susednim molekulima vode, nego i sa drugim molekulima koji poseduju $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ ili COO^- grupu za koje se vezuju. Ovo obuhvata jednostavne molekule kao što su alkoholi i površine kao makromolekuli, što je vezana voda u biološkim sistemima. Intracelularna voda unutar citoplazme se odlikuje kompleksnošću i specifičnom organizacijom. Uvećanje veličine ćelije je praćeno depolarizacijom ćelijske membrane i smanjenjem difuzije vode, što ukazuje na veoma različite karakteristike intracelularne vode koja se prinudno javlja u poređenju sa ekstracelularnom vodom. Intracelularna voda poseduje visoko organizovanu lokalnu strukturu kad interreaguje sa molekulima sposobnim da uspostave ove strukture u njoj. Usmereni dipolni momenti molekula vode uzrokuju delimičan jonski karakter vodonične veze (usled neravnomerne raspodele naelektrisanja unutar molekula) stvarajući afinitet između negativnog dela molekula i pozitivnog dela njegovog suseda. Kako voda, na neki način, lokalno menja svoju gustinu tako da njene vodonične veze postaju pravije i jače ili iskrivljenije i slabije, sva njena fizička i hemijska svojstva se moraju promeniti. Njena tačka ključanja će opadati kako veze postaju slabije, slobodna energija hidratacije Na^+ i K^+ i drugih katjona i od reaktanata i proizvoda reakcija hidrolize mora sve promeniti. Povećanje

jačine vodoničnih veza mora voditi do suprotnih promena u fizičkim i hemijskim svojstvima. Razlika u koncentracijama jona je posebno očigledna za natrijum (Na^+ ; intracelularno 10 mM; ekstracelularno 150 mM) i kalijum (K^+ ; intracelularno 159 mM; ekstracelularno 4 mM). Na^+ stvara više raskidano vodonično povezivanje i preferira većoj gustini vode, dok K^+ jon preferira vodenom okruženju manje gustine kako je dokazano. (Philippa Wiggins 1990.) Razlike u intracelularnom i ekstracelularnom rasporedu kalijuma i natrijuma su usled razlika u afinitetu ovih jona prema vodi. Interakcija između vode i Na^+ su jače nego između samih molekula vode, a one su jače nego one između vode i K^+ jona, usled razlika u površinskoj gustini naelektrisanja jona jer je Na^+ oko 2 puta manji od K^+ jona. Ca^{2+} , sa intracelularnom koncentracijom 0,1 μM i ekstracelularnom koncentracijom 2.5 mM, poseduje površinsku gustinu naelektrisanja dva puta veću od Na^+ i poseduje jače destruktivne efekte na vodonične veze kojima su povezane molekule vode niže gustine od Na^+ jona. Razdvajanje jona se odvija u zavisnosti od njihovih prioriternih okolina vode naročito K^+ jona čije je favorizovano okruženje unutar ćelije i prirodno se akumuliraju u ćeliji na račun Na^+ jona, ovaj proces se odvija jednostavno kao rezultat strukturisanja vode. Ugao između dva vodonikova atoma i kiseonikovog atoma u molekulu vode može varirati za 20 stepeni isto tako rastojanje između dva molekula koji su povezani vodoničnim vezama može varirati kako se menja ugao i jačina vodonične veze koja zavisi i od preostalih vodoničnih veza u okolini. Stepem kojim se gustina ćelijske vode snižava je određen rastvorenim materijama i stanjem kretanja proteina. Voda poseduje suprotne efekte u okolini proteina usled različitih amino kiselina koji obrazuju njihove površine. Slabe interakcije između proteina i površine molekula vode omogućuju veću fleksibilnost proteina. Jake interakcije obezbeđuju da je protein u stanju veće stabilnosti i rastvorljivosti. Oko proteina je uređena struktura u sloju molekula vode koji ga neposredno okružuje sa obe strane hidrofobne nalik na klatrat i molekula vode koji su vezani vodoničnim vezama za hidrofilne delove od kojih svaki pomažu drugoga da optimalizuju mrežu vodoničnih veza vode. Proteinske karboksilne grupe su generalno okružene molekulima vode koji su vodoničnim vezama povezane sa njima pošto molekuli vode koji okružuju bazne grupe

arginin, histidin i lizin teže otvorenoj strukturi klatrata zbog njihove hidrofobnosti. Formiranjem delimičnih klatratnih kaveza preko hidrofobnih površina maksimalizuju se ne vezujuće interakcije između vode i proteina bez gubitka vodoničnih veza između molekula vode pošto su karboksilne grupe samo podesne za obrazovanje kolapsirajuće vodene strukture kojima se stvaraju reaktivne fluidne zone. Rotacije proteina će izazvati promene u strukturi vode izvan ovog bliskog hidratacionog omotača. Na površini raskidanja, vodonične veze su isprekidane i stvaraju zonu vode veće gustine. Rotacija proteina stoga stvara okružujuću zonu vode veće gustine sa više razrušenih vodoničnih veza. Proteini poseduju dve kisele amino kiseline asparaginsku i glutaminsku, sa karboksilnom ($-\text{CO}_2^-$) bočnom grupom. Normalno, voda se vezuje vodoničnim vezama za kiseonikove atome ovih karboksilnih grupa koji privlače molekule vode uzrokujući lokalizovano klastere vode veće gustine i smanjenje kiselosti karboksilne kiseline. Inače, kada okolni molekuli vode daju prednost međusobnom stvaranju vodoničnih veza sa stvaranjem klatratnog kaveza, kiselost karboksilnih grupa se uvećava. Nađeno je da Na^+ jon preferira vezivanje za slabiju karboksilnu kiselinu dok K^+ jon preferira jaču kiselinu. Na^+ i K^+ joni se takođe ponašaju drugačije kad su u blizini karboksilnih grupa; K^+ joni poseduju preferencu za formiranje jonskog para, gde postoji direktan kontakt između K^+ jona i karboksilnog jona dok Na^+ jon formira razdvojeno rastvorno sparivanje gde molekuli vode leže između Na^+ jona i karboksilnog jona, formirajući ojačane vodonične veze prema karboksilnim grupama. Ovo je zbog Na^+ jona koji vezuje molekule vode jače. K^+ joni preferiraju da budu unutar klatratnog vodenog kaveza i ovo preferencira ojačavanje neposrednog jonskog sparivanja za karboksilnu grupu i ometa vodoničnim vezama povezivanje molekula vode za karboksilne grupe. Neposredna asocijacija K^+ jona sa asparaginskim i glutaminskim grupama u proteinu je centralna tema Lingove (Ling 1962.) hipoteze nepomičnih naelektrisanja gde dokaz za molekularni mehanizam za asocijaciju obuhvata: nisku intracelularnu električnu provodljivost, jako smanjena mobilnost intracelularnih K^+ jona, jedna po jedna stihometrijska apsorpcija K^+ jona za karboksilne grupe i indentifikacija mesta apsorpcije K^+ jona, kao asparaginski i

glutaminski bočni ostaci intracelularnih proteina. Aktin je visoko konzervativan i rasprostranjen unutarćelijski protein (42-43 kDa) odgovoran za mnoge funkcije u ćelijama. Ne mišićne ćelije sadrže aktin u iznosu od 5-10% od svih proteina, dok mišićne ćelije sadrže oko 20%. Aktin se preobražava između monomera koji slobodno rotiraju (G aktin; oko 4-6 nm dijametar) i statičkog desno uvijenog proteinskog filameta polimera sa dvostrukim heliksom (F aktin do nekoliko mikrona u dužinu) uz ATP, proces konverzije α u β heliks obuhvata obrt u jednom od njegovih strukturnih domena. Svaki molekul slobodno rotirajućeg G aktina može uskomešati veliku zapreminu vode, dok F aktin poseduje mnogo uređeniju strukturu koja stvara više reda u okolnoj vodi. Proteinska vlakna aktina obuhvataju molekule vode, smanjujući njihovo kretanje i kompenzujući to jačim vodoničnim vezama. Isto tako kapilarno dejstvo se prostire na stešnjenu vodu, tako obezbeđujući da je manje gustine i iz tog razloga strukturisanija nego bulk voda. Svi molekuli aktina sadrže konzervativni negativno naelektrisan N kraj, na primer N-acetil-asparatil-glutamil sekvencu u α aktinu. Kad polimeri G actina u ćeliji usled dejstva ATP formiraju F-aktin, ove visoko karbolizovane antene su locirane na izloženim spoljnim ivicama spirale, gde je moguće da budu dopunski koji se koriste za mesto vezivanja za druge proteine, kao miozin. Tubulin, drugi intracelularan strukturalan protein koji formira nepokretne strukture unutar ćelija, mikrotubule poseduju proširen negativno naelektrisan kiseli C-kraj, konzervativna antena od oko osam karboksilnih grupa koji služe sličnim funkcijama. F-aktinski višestruko negativno naelektrisan N-kraj privlači pozitivno naelektrisane katjone. Pod uslovima kad su karboksilne grupe slabije oba K^+ i Na^+ joni mogu formirati rastvorne odvojene serije. Ove kompeticije rezultuju u preferenci za Na^+ jon i vodi veće gustine. Međutim, prirodna rotacija proteina će težiti ka zamahu takvih jona, i njihove asocirane vode. Ako je protein ometan u rotaciji, Na^+ jon teži da razori bilo koju strukturu niže gustine oko karboksilne grupe proteina. Međutim koncentracija intracelularnog Na^+ jona je uopšte daleko manja od K^+ jona koja omogućuje uspešnu kompeticiju za ovo mesto, formirajući par jona i ohrabrujući formiranje klatrata. Vezivanje K^+ jona za karboksilne grupe snižava jačinu jona u intracelularnom rastvoru

intracelularno dvostruko naelektrisanog HPO_4^{2-} jona do pojedinačno naelektrisanog H_2PO_4^- što je mnogo povoljnije za obrazovanje klastera niže gustine. Svi intracelularni entiteti fosfata se ponašaju na sličan način. Obrazovanje K^+ karboksilatnih jonskih parova vodi do obrazovanja okolnih klatrata vode, na taj način strukturišući molekule vode, tako obezbeđuju obrazovanje maksimalnog broja vodoničnih veza i informišu susedne karboksilne grupe. Ovi signali kooperativno pojačavaju tetraedralnost strukture vode nađene između ovih grupa. Klatratni kavezi omogućuju rotacionu pokretljivost, omogućujući vodoničnim vezama da traže kooperativne partnere. Oko intracelularnih molekula proteina se obrazuju 7-8 slojeva vezanih molekula vode. Svaki kooperativan jonski par je okružen klatratnim kavezom od molekula vode, što je praćeno produženjem vodonične veze na kooperativan način. Ako vodeni klatratni kavez poseduje negativnije naelektrisanje na njegovoj unutrašnjoj i pozitivnije naelektrisanje na spoljašnjoj strani, nastaje znatna polarizacija u molekulima vode i ojačava interakcije vodoničnim povezivanjem. Klasterisanje uslovljava veće smanjenje mobilnosti vode, jače 4-koordinantno povezivanje kompenzuje ovo. Produživanje klatratne mreže i njene asocijacije sa vodom niske gustine omogućuje K^+ jonu da se veže za sve asparaginske i glutaminske kiselinske grupe, koje nisu uključene u krucijalnu kinetiku N-terminalnog kiselog centra. U prisustvu povišenog nivoa Na^+ i/ili Ca^{2+} jona, koje se povremeno dešava za vreme ćelijskih funkcija, ovi joni će zameniti neki od vezanih K^+ jona. Ovaj novoformirani rastvor razdvojeni Na^+ i/ili Ca^{2+} jonski par će razoriti klatratnu strukturu niže gustine i inicirati kooperativnu konverziju asocirane vode prema gušćoj strukturisanosti. Intracelularna voda se nalazi u stalnoj konverziji između klastera manje i klastera veće gustine što omogućuju životne funkcije ćelije i moguća je uz utrošak energije da bi se održala niska entropija sistema. Biološka aktivnost proteina je kritično zavisna ne samo od njihove građe nego i načina na koji su ovi ogromni molekuli savijeni ovo savijanje zapliću interakcije sa vodoničnim vezama vode i takođe između različitih delova samog molekula. Sve što naruši intermolekularne vodonične veze će denaturisati proteine i uništiti njihovu biološku aktivnost ili uticati na njihovu funkciju. Poznato je da je intracelularna voda veoma blizu bilo kojoj

membrani ili organeli (ponekad se zove vicinalna-susedna voda), organizovana veoma različito od bulk (glavni deo) vode i ova strukturna voda ima značajnu ulogu u određivanju oblika i stoga njihove biološke funkcije) biopolimera. Strukturna vode u ovom regionu, je određena jedino geometrijom okolnih vodoničnih veza.

Hidrofobni efekt hidrofobnih rastvoraka u vodi (kao što su nepolarni gasovi) je prvenstveno posledica promena u klasterima okolne vode pre nego interakcija rastvorak-voda. Proširenje mreže uzrokuje smanjenje gustine vode, gde uređene veze moraju imati sklonost ka povišenju temperature i tako delovati na toplotni kapacitet. Hidrofobna hidratacija je proizvod smanjenja gustine vode i porasta toplotnog kapaciteta. Stoga hidrofobna hidratacija deluje na suprotan način od polarne hidratacije koja raste sa gustinom i opada joj toplotni kapacitet usled haotične asocijacije vodoničnih veza u vodi budući da se one krive ili prekidaju. Hidrofobna hidratacija je praćena promenom negativne entalpije, delimično usled višestrukih van der Waalsovih interakcija, promena negativne entropije usled uvećanog reda u okružujućoj vodi i pozitivna promena toplotnog kapaciteta usled promene negativne entalpije (jače vodonične veze). Voda na hidrofobnoj površini gubi vodonične veze, dakle uvećava se entalpija sistema. Molekuli vode kompenzuju to delimično radom: promena pritiska, volumen, to jest mreža se širi u formu vode manje gustine sa manjom entropijom. Voda pokriva hidrofobnu površinu klatratima da bi se izbegao gubitak mnogih vodoničnih veza. Ovo prinuđuje lokalnu strukturu vodu veće gustine da se menja. Voda pokriva hidrofobnu površinu u obliku klatrata, tako izbegava gubitak mnogih vodoničnih veza, ova prinudna promena lokalne strukture vode snižava njenu gustinu. Stvaranje klatratne strukture se maksimizira sa van der Waals kontaktima između hidrofobnih rastvoraka i vode ali bez smanjenja vodoničnog povezivanja. Rotaciono ograničenje vodoničnih veza na hidrofobnoj površini može delimično biti odgovorno za njihovu uvećanu snagu. Struktura klatrata ne postoji kao kristalast krut klaster ali minimalna entalpija strukture se lako i konstantno ruši kinetičkim efektima (na primer, povećanje temperature). Gde voda niske gustine (LDW) preklapa hidrofobnu

površinu, tamo će postojati tendencija za minimalizaciju međusobne površine i odstranjivanje vode, izazivajući stvaranje zone spajanja u mnogim hidrokolidima. To je inkompatibilnost između LDW i hidrofobne površine koja pokreće obrazovanje strukture. Formiranje vode niske gustine pored hidrofobne površine i prateći obrazovanje zone spajanja je favorizovana ako je voda male gustine povezana sa vodom veće gustine koja se stvara u blizini dodatne polarne grupe rastvorka (na primer u polisaharidima ili ćelijskoj membrani). Alternativno lokalno jako vodonično povezivanje može biti sposobno za kreiranje vode niske gustine bez asistencije. Međutim lokalno slabo vodonično povezivanje će ometati obrazovanje zone spajanja. Hidrofobni efekt opada sa povećanjem pritiska (ili gustine) zavisnost od prisustva tetraedralno lociranih molekula vode (kao u LDW), smanjuju broj krivljenja vodoničnih veza usled uticaja pritiska. Hidrofobni efekt se povećava sa povećanjem temperature (hidrofobni molekuli postaju lepljiviji) usled smanjenja obrazovanja klatrata povećava se energetska cena interakcije hidrofobne površine voda i smanjuje se hidratacija hidrofobne površine. Uticaj vode na polisaharide i polisaharida na vodu su složeni i postaju još složeniji u prisustvu drugih materija, kao što su soli. Voda se nadmeće za mesta vodoničnog vezivanja sa unutar molekularnim i među molekularnim vodoničnim vezama unutar polisaharida, sigurno će se ustanoviti ugljenohidratna elastičnost i može se odrediti ugljenohidratna preferencijalna konformacija.

Na efekte hidratacije polisaharida utiču: polarnost, slabo vodonično vezivanje ili jako vodonično vezivanje, hidrofobnost i prisustvo drugih nejonskih i jonskih rastvoraka. Voda u ćeliji nije statička konfiguracija struktura molekula, dinamički procesi u ćeliji omogućuju da se strukture vode konstantno menjaju, bivaju raskidane i ponovno formirane da bi omogućili funkcionisanje ćelije i održavanje njene strukture odnosno veliki stepen dinamičkog reda. Na ovaj način se nastoji održati ravnoteža jačina vodoničnih veza unutar uzanog raspona koji je podesan za život.

Ekstracelularna voda je pre svega tečna bulk voda i sastoji se od ključale mase lanaca raznih veličina, sličnih grupa i podrhtava u i izvan vremena trajanja

od pikosekunde. Ali blizina čvrste površine molekula ili jona koji poseduju neuravnoteženo električno naelektrisanje, uzrokuje da molekuli vode mogu postati orjentisni i ponekad mogu da se vežu u relativno stabilnu strukturu. Hidratacija je proces interakcije molekula vode sa drugim naelektrisanim molekulima, uspostavlja se granični sloj molekula vode na granici prema jonu ili molekulu ali je ona slabo definisana. Granični molekuli vode se formiraju u obliku jednog ili više slojeva u zavisnosti od površinske gustine naelektrisanja naelektrisanog molekula ili jona. Molekuli vode u daljim slojevima su sa kraćim vremenom trajanja vodoničnih veza, one su sa većim stepenom slobode kretanja i manje su pod uticajem elektromagnetskog polja naelektrisanog molekula. Molekuli vode se duže zadržavaju u blizini graničnog sloja, vreme trajanja vodonične veze u bulk vodi je reda veličine pikosekunde u klasterima vode traju u nanosekundama dok u blizini graničnih površina vreme raskidanja vodoničnih veza odnosno vreme zadržavanja molekula vode može biti u mikrosekundama pa i reda veličine sekunde. Osim toga se ograničava stepen slobode rotacije molekula vode što ih prinuđuje da se kreću u jednom ili malom broju pravaca koji su dopušteni. Hemijski potencijal vode se povećava usled ljujanja veza koje izazivaju termalni efekti ili kad su molekuli vode u klasterima veće gustine. Hemijski potencijal vode opada sa širenjem mreža vodoničnih veza molekula vode u blizini hidrofobnih površina jer je visoka energija granične površine kompenzovana obrazovanjem vode niže gustine.

Voda u organizmu može biti podeljena na: slobodnu bulk vodu, graničnu vodu, koja je podkategorisana kao sposobna za zamrzavanje ili ne i nevezanu vodu podkategorisanu kao zarobljena ili ne. Nevezana voda se smrzava na istoj temperaturi kao i normalna voda ($< 0^{\circ}\text{C}$ zavisno od brzine hlađenja). Vezana voda se smrzava na nižoj temperaturi od obične vode i biće lako pothlađena. Ona takođe pokazuje smanjenje entalpije fuzije (topljenje).

Membrane ćelija transportuju vodu procesom difuzije i vodenim kanalima akvaporinima, intracelularna voda se javlja kao visoko organizovana. Umesto amorfnog rastvarača, voda postoji unutar ćelije kao kompleks više slojnih struktura. Ova aktivna, visoko pokretna voda pomaže mnogo bržem

dostavljanju hranljivih materija, uspješnije hidriraju i potpomaže uklanjanje ćelijskih otpadaka mnogo efikasnije nego vezana voda koja se uobičajeno nalazi u starijim ćelijskim sistemima. Ovi klasteri vode poboljšavaju sposobnost proteina da prenose signale jedno drugome, strukturisana voda unutar ćelije deluje kao transduktor hemijske i bioelektrične energije, promene u ćelijskoj hidrataciji izazivaju dramatične promene u ćelijskom metabolizmu i ekspresiji gena. Nestrukturisana voda gubi jedan elektron iz svoje spoljašnje orbite dok strukturalna voda nema izgubljeni elektron. U ljudskom telu, postoje dva osnovna tipa vode vezana i slobodna koja je klasterisana, obe vrste vode se mogu nalaziti u ćeliji i izvan ćelije u ekstracelularnom rastvoru. Slobodna voda može biti ograničena, kad je ograničeno ili zaustavljeno njeno kretanje. Savršen oblik molekula klasterisane vode im dopušta klizanje kroz ćelijsku membranu, noseći hranjive materije u ćeliju i noseći otpadne i toksične materije napolje iz ćelije. Ovaj lak prolaz molekula vode oblika heksagonalnih kristala u i izvan ćelija održava ćelije čistim i mladim tako da one zdravo vibriraju. Kako organizam stari menja se organizacija molekula vode unutar ćelije. Zato što stres i zagađivači, toksini aktivni radikali i akumulacija otpadaka koji se postepeno vezuju za molekule vode, povećavajući njihove vodonične veze i iskrivljujući ih, čine da se obrazuju veći klasteri i haotične strukture vode. Kako normalni klasterisani molekuli vode postaju veći i gube pravilan oblik postaje teže za vodu da prođe kroz barijeru ćelijske membrane. Ćelije su u mladosti jako podmazane i čišćenje sa normalnim klasterisanim molekulima vode se efikasno odvija, sa laganim nakupljanjem sve više toksina, otpadaka i aktivnih radikala sve više stare. Sa starenjem ćelije vezana voda postaje predominantna i nivo klasterisane vode opada, ometajući efikasnost bukvalno hiljada metaboličkih funkcija i uzrokujući značajne strukturne promene u tkivu tela. Starenjem, molekuli vode uređeni u pravilne heksagonalne oblike počinju da se menjaju. Zato što stres i zagađivači, toksini, aktivni radikali i akumulirana voda u telu se postepeno vezuju za molekule vode, uvećavajući vodonične veze i kriveći ih. Kako normalni klasteri u ćelijama i tkivima postaju veći i gube pravilan oblik postaje teško za vodu da prolazi kroz barijeru ćelijske membrane i uspešno hidratiše biološke strukture i molekule u ćeliji.

Akvaporini, ćelijski savršeni vodeni filteri, su proteini koji grade vodene kanale, nalaze se na površini ćelijskih membrana koje su nepropustljive za vodu i omogućuju brzi ulazak i izlazak molekula vode da bi izjednačili osmotski pritisak sa ekstracelularnim prostorom. Sprečavaju rasprskavanje ćelije usled promena spoljašnje koncentracije soli ili gubitak vode iz ćelije (osmotska regulacija). Kod ljudi akvaporini regulišu protok vode u bubrezima, crvenim krvnim zrnima, očnom sočivu, mozgu, koži i svim ostalim ćelijama. Struktura akvaporina pokazuje da ovi proteini formiraju kanal u membrani koji je 2 nanometra dug i 0.3 nanometra širok taman dovoljno velik da kroz njega prođe molekul vode, tako da se sprečava prolazak većih molekula. Klasteri vode mogu proći kroz kanal, izgleda da molekuli vode prolaze pojedinačno kroz ćelijsku membranu a ne kao klaster. U obliku uređenih skupova se molekuli vode brže transportuju kroz vodeni kanal što omogućuje efikasniju hidrataciju i unos hranljivih materija i kiseonika i iznošenje štetnih materija koje nastaju tokom metaboličkih procesa. Voda prolazi kroz ćelijsku membranu na dva načina: difuzijom kroz dvostruki sloj lipida i kroz vodeni kanal, akvaporin. Funkcionalna karakterizacija prvog akvaporina je saopštena 1992 god. (Beitz Agre 2004) ali se sumnjalo na postojanje vodenih kanala ranije, zato što je osmotska propustljivost nekih tipova ćelija bila prevelika za proračun jednostavne difuzije kroz plazma membranu. Pojedinačan ljudski akvaporin 1-kanal olakšava transport vode brzinom od približno 3 milijarde molekula vode u sekundi. Takav transport se pojavljuje kao dvosmeran saglasan sa preovlađujućim osmotskim gradientom. Istraživanja u Max Planck Institute for Biophysical Chemistry in Göttingen, Germany pokazuju da se transport vode kroz ćelijsku membranu odvija posredstvom vodenih kanala kroz koje molekuli vode prolaze u koloni jedan po jedan (tj. neklasterisani) brzinom približno milijardu u sekundi. Neki akvaporini su propustljivi samo za vodu AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 dok je AQP6 osim za vodu propustliv i za anjone, AQP8 je propustliv i za ureu. Druga grupa akvagliceroporini AQP3, AQP7, AQP9 i AQP10 su propustljivi za vodu u različitom stepenu ali su takođe propustljivi i za male molekule kao glicerol. U različitim ćelijama su prisutni različiti akvaporini usled različitih zahteva različitih ćelija i organa za regulisanje homeostaze vode na

raznim stadijumima razvića. Akvaporini su prisutni u membrani kao tetrameri i nisu raspoređeni simetrično u odnosu na osu tetramera, svaki hidrofoban monomer težine 28 kDa sadrži vodeni kanal. Struktura akvaporinskog kanala obezbeđuje jedinstven selektivni mehanizam za slobodan prolaz vode sa nepokretnim delovima. Karakteristika akvaporinskih kanala je da sprečava formiranje kontinuiranog lanca vodoničnim vezama povezanih molekula vode. Prva barijera za prolaz protona je locirana u najvećem suženju na putu vode kroz kanal oko 0.8 nm iznad sredine dvoslojne membranske strukture u kanalu su poredani bočne grupe Arg, Phe, His. Naspram ovih struktura se nalazi ugljenikov atom glicina i cisteina i zajedno čine dijametar pore približno 0.28 nm što čini van der Waals dijametar molekula vode. Ostatak arginina poseduje jako pozitivno naelektrisanje koje služi da odbija protone i tako obezbedi selektivno propuštanje samo molekula vode. Lanac molekula vode povezanih vodoničnim vezama se prekida u blizini arginina. Akvagliceroporini poseduju na mestu amino kiseline histidina 0.1 nm širu poru što omogućuje prolaz molekula glicerola i malih anjona. Druga barijera za prolaz protona je jak dipol koji formiraju dva kratka lanca pore koji se susreću u centru akvaporina. Ova naelektrisanja i ostatak asparagina reorjentišu molekul vode koja prolazi kroz kanal. Voda dipol reorjentacija prekida vodonične veze između molekula vode kako one iznad tako one ispod njih, eliminišući mogućnost da prođe proton. (Kozono, Yasui, King, Agre 2002.) Postoje značajni dokazi da se heksagonalna voda kreće unutar bioloških organizama sa većom lakoćom. To se javlja kad se povećava apsorpcija hranljivih materija i uklanjanje metaboličkih otpadaka Ovo može biti usled veličine molekularnih jedinica i njihove sposobnosti da uđu i izađu iz ćeljkog sadržaja sa većom lakoćom. To takođe može biti zbog specifične organizacije heksagonalne mreže vodoničnih veza koja se javljaju da povećaju celularnu komunikaciju i za podršku drugih struktura unutar bioloških organizama.

6.2. Prelaz vode iz derma u epiderm (bazalna membrana)

Dermis se nalazi ispod epidermisa, debljine je 1.5 do 4 mm, načinjen je od spoljašnjeg rastresitog vezivnog tkiva i unutrašnjeg gušćeg vezivnog tkiva, čini 90% kože, sadrži folikule dlaka, lojne i znojne žlezde, senzorne receptore, nervna vlakna i krvne i limfne sudove. Podeljen je u dva sloja: papilarni i retikularni. Papilarni sloj se sastoji od rastresitog vezivnog tkiva koji poseduje mnogo krvnih sudova (subpapilarni pleksus koji sadrži kapilarne petlje) hrani epidermis i snabdeva ga tečnošću i uključen je u termoregulaciju, sadrži dermalne papile tanak je i nalazi se iznad retikularnog sloja. Retikularni sloj, gušće nepravilno tkivo i kolagen koji čini ekstracelularan matriks omogućuje snagu, elastičnost, čini dermis kompaktnim, kolagen takođe vezuje vodu da sačuva hidrataciju kože. Voda u koži se nalazi u dermu gde se uglavnom i zadržava. Osnovni deo tečnosti epiderm dobija iz derma jer nema svoje krvne sudove koji bi mogli popunjavati zalihe vlage u njima. Derm sadrži oko 80%-70% vode i ta količina retko se smanjuje tokom starenja što čini 15%-18% ukupne količine vode u celom organizmu. Sadržaj vode u dermu zavisi od uzrasta, stanja organizma i genetičkih svojstava. Mehanička svojstva epidermisa i količina vode u njemu se nalaze u tesnoj vezi sa mehaničkim svojstvima komponenti derma koje su u mnogome uslovljeni rastegljivošću njenih kolagenih vlakana i elastina kao i njihovim kvalitativnim odnosom i prostornom organizacijom. Njene glavne komponente obezbeđuju sporu difuziju konstituentnog fluida. Stopa difuzije u dermisu zavisi od krvotoka, pokretanja međućelijske tečnosti i interakcije tečnosti sa konstituentima dermisa.

Nađene su značajne razlike relativne gustine protona između spoljnog i unutrašnjeg dermisa. Čelije i proteoglikani su obilniji u površinskom dermisu nego u unutrašnjem dermisu i fibrili kolagena gornjeg dermisa su tanji i ređe pakovani u snopove nego u dubljem dermisu. Proteoglikani nastaju vezivanjem glikozaminoglikana na središnji proteinski lanac. Preovlađuje ugljenohidratni deo. Veoma su hidrofilni sa slojem vezane vode oko sebe. Strukturni glikoproteini nastaju vezivanjem razgranatih ugljenih hidrata na proteinsku

osnovu. Preovlađuje proteinski deo. Poseduju ulogu u međusobnom djelovanju susednih ćelija i prijanjanju ćelija uz podlogu. U papilarnom delu dermisa je 72% vode dok je u mreži dermisa, retikularnom sloju oko 61% zbog prisustva proteoglikana i glikoproteina koji zadržavaju molekule vode. Kolageni fibrili dermisa zajedno sa nekolagenim molekulima sadrže pore radijusa ~ 5.5 nm i mikropore radijusa ~ 0.45 nm kroz koje se odvija difuzija tečnosti. Gustina kolagena je proporcionalno manja u spoljnjem dermisu tako da proporcija mesta za interakciju protein voda je manja od one u dubljem dermisu. Kolagen čini 70% suve mase dermisa, protoni male pokretljivosti u ovom tkivu su odlika obilja vode koja je tesno vezana za kolagene dermisa usled čega im je ograničeno kretanje. Kolagen nije samo materijal sa mehaničkim svojstvima nego poseduje i dielektrička i električka svojstva provodljivosti što ga čini veoma osetljivim za mehanički pritisak, pH i jonski sastav kao i za elektromagnetska polja. Električna svojstva zavise u velikoj meri od vezanih molekula vode u i oko trostrukog heliksa. Postoje tri različite populacije molekula vode koje su asocirane sa molekulom kolagena međuprostorna voda koja je veoma čvrsto vezana unutar trostrukog heliksa molekula kolagena koja jako interreaguje sa peptidnim vezama polipeptidnog lanca: vezana voda, odgovara slabije strukturisanom cilindru vode na površini trostrukog heliksa i slobodna voda koja ispunjava prostor između fibrila. Mreža kolagenih vlakana je direktno povezana sa unutar ćelijskim matricama pojedinačnih ćelija preko proteina koji se pružaju kroz ćelijske membrane kao integrini. Vezivno tkivo i unutar ćelijske matrice zajedno formiraju tensegrity sistem kao ekscitabilni električni kontinuum za brzu među komunikaciju kroz dermis i telo. Vezivno tkivo dermisa je po prirodi strukturisano, načinjeno od kolagena u tečno kristalastoj mezofazi, karakteristične organizacije fibrilarnih struktura koje su jasno povezane sa mehaničkim stresom. Trostruki heliks molekula kolagena se nalazi u cilindru vode koji je vodoničnim vezama vezana za bočne grupe hidroksiprolina. Voda u fibrilima kolagena se razlikuje od bulk, okolne vode. Ova voda je razdvojena u dve posebne klase-čvrsto vezana i slobodna voda ili slična bulk vodi. Čvrsto vezana voda stabilizuje trostruki heliks, učestvuje u jačini vodoničnih veza. Pokretni klasteri i lanci molekula vode, povezani vodoničnim

vezama, formiraju kompleksnu mrežu, povezani sa polarnim bočnim grupama u osnovi peptida trostrukog heliksa. Nenaelektrisani heliksi ne pokazuju direktne kontakte. Voda direktno posreduje interakcijama između njih. Kretanje vode iz brazda kolagena je usporena rezonantnim pokretima vode sa rezonacijom protona. Veliki osmotski ili mehanički pritisak je potreban za uklanjanje vode sa površine proteina kolagena. Na proteinu kolagena se voda nalazi u prvom hidratacionom sloju, koji je prekriven susednim slojem molekula vode koji obezbeđuje dvostruki sloj razdvajanja približno 0.63 nm između površina susednih fibrila kolagena. Ovo razdvajanje omogućuje brzu izmenu u vodoničnoj mreži, koja se sastoji od međumolekularnih dvostrukih i trostrukih vodenih mostova od mesta pozitivnog naelektrisanja bočnog lanca peptida do obližnjih mesta negativnog naelektrisanja. Voda u procepima kolagena je ograničenija strukturalna voda, striktno je intermolekularna i asocirana je sa glavnim proteinskim lancem. Površinski sloj vode je sa manjom slobodnom energijom od bulk vode koja je malo ili nimalo prisutna u tkivu. Za kolagen postoji karakteristična temperatura $t_0=291$ K koja razdvaja temperaturne intervale sa različitim difuzionim obrazcima, na $t_0 < t$ molekuli vode se kreću u neuređene regione a na $t > t_0$ prodiru u uređene regione, što je praćeno raskidanjem dijagonalnih veza između peptidnih lanaca. Vreme dielektričnog opuštanja za bulk vodu je 8.3 ps za slobodnu vodu kolagena 40 ps i za vezanu vodu 10 ns a za poređenje molekula mioglobulina poseduje releksaciono vreme od 74 ns. Komplikovana struktura različitih populacija molekula vode poseduju različita ograničenja kretanja u poređenju sa bulk vodom. (Matthew Shoulders, Raines 2009.)

Kolagen strukturise vodu u pravilne lance niz fibrile, pogodne za brazde u tripletu heliksa. Između kolagenih fibrila, naročito u dermu i bazalnoj lamini kože je organizovani strukturisani protonski kabl. Kolagen strukturise vodu u jednoj fazi u jednom trenutku vremena, u kritičnom trenutku hidratacije se odvija iznenadni fazni prelaz u kom se uspostavlja različito stanje reda analogno strukturama nalik ledu. Voda asocirana sa molekulom kolagena pokazuje iznenađujući stepen uređenosti i mogla bi biti super provodni kanal koji

omogućuje svakoj ćeliji unutar tela da međusobno komuniciraju radi međusobne koordinacije.

Vaskularizacija kože obezbeđuje ne samo ishranu nego i dolazak tečnosti u dermis. Sastoji se od uobičajenih krvnih sudova (arteriola, kapilara i vena) i vaskularnih struktura uključenih u termoregulaciju, koje se sastoje od razgranatih subkutanih venskih pleksusa, u kojima se mogu zadržavati veće količine krvi, kao i arteriovenskih anastemoza, koje arterijske sudove povezuju direktno sa venskim pleksusima. Krv dospeva u kožu putem malih mišićnih arterija iz hipodermisa. Ove arterije u dubljim delovima retikularnog sloja u blizini hipodermisa formiraju duboki vaskularni pleksus, rete cutaneum. Iz ovog pleksusa deo arteriola se spušta prema hipodermisu, dok drugi deo arteriola sprovodi krv ka površnim slojevima epidermisa. Najveći deo arteriola iz ovog pleksusa stvara drugi pleksus, na granici između papilarnog i retikularnog sloja rete subpapillaris. Kapilari nastali iz anastemoza ovog pleksusa formiraju kapilarne petlje u dermalnim papilama i prolaze uz samu bazalnu membranu. Kapilari se nastavljaju venama do venskog pleksusa postavljenog direktno ispod arterijskog papilarnog pleksusa. Krv dalje otiče do dubokog venskog pleksusa. Limfni sudovi kože dobro su razvijeni u papilarnom sloju dermisa i stvaraju superficijalni pleksus. Kapilari iz ovog dela dreniraju limfu u veće sudove koji se nalaze u retikularnom sloju dermisa (duboki pleksus), koji je dalje odvede do regionalnih limfnih čvorova. (Zweifach 1965.) Mali krvni sudovi su srž cirkulatornog sistema. Razmena vode i rastvorenih materija se odvija fizičkim procesima bez utroška energije od endotelnih ćelija (hidraulički pritisak, koloidna osmoza tkiva). Postoje dva moguća puta kojim voda i rastvorene materije mogu proći kroz zid kapilara. Mogu difundovati kroz kontinuirane vodene kanale (akvaporine) ili mogu biti filtrirani kroz pore hidrodinamičkim silama koje uzrokuje krvni pritisak. Barijera kapilara kroz koju se vrši razmena se sastoji od endotelnih ćelija koje su delimično preklopljene i formiraju kontinuiranu cev u unutrašnjosti suda, i spoljašnje okruženje (bazalna membrana) amorfnog fibrilarnog sloja 50 do 60 nm debelog. Površina lumena kapilara je ograničena tankim slojem glikoproteina čija je uloga kontrola

propustljivosti kapilara. Granice susednih ćelija su u bliskom kontaktu, rastojanje između njih je 10 do 15 nm. Materijal koji se nalazi između endotelnih ćelija je produžetak bazalne membrane. (Karadaglić 2000). Ukupno kretanje molekula vode kroz ovu barijeru zavisi od ravnoteže između hidraulične snage krvi i osmotskog pritiska proteina plazme. Hidrostatički pritisak favorizuje filtraciju pod pritiskom vode kroz pore zato što je ovaj pritisak sa strane pore u krvi veći od onog u tkivu. Primarna odbrana protiv suviše filtracije je koloidni osmotski pritisak, tako da je ukupna sila filtracije samo neznatno pozitivna ili negativna. Rastvarač, voda predstavlja trodimenzionalno povezane molekule vode vodoničnim vezama. U koži se voda sastoji od brzo izmenjujućih klastera manje gustine gde je drugi sused intermolekularna O-O distanca 0,45 nm, i kompaktni veće gustine klasteri gde je odgovarajuće rastojanje O-O rastojanje 0.35 nm. Molekularno kretanje u tečnoj vodi zahteva konstantno prekidanje i reorganizaciju pojedinačnih vodoničnih veza u trajanju reda veličine pikosekunde (10^{12} s). Ovo omogućuje vodi da organizuje molekule i čestice rastvorene i suspendovane u njoj. Ovi uređeni domeni, čestice se tako uređuju i njihove pozicije ostaju konstantne da liče na džinovski kristal (koloidni kristal). Ovi uređeni kristali teže da rastu na račun neuređenih domena, što rezultuje da su koloidni kristali razdvojeni prazninama gde čestice ne postoje. Ovako uređena voda otežano difunduje kroz dermis i nepovoljno deluje na konformaciju molekula koji grade dermis.

Bazalna membrana je pločasta naslaga ECM, sastoji se od dva sloja, bliže epitelnoj ćeliji – bazalna lamina ili lamina rara (glikoproteini, laminin i proteoglikani) i deluje kao barijera za transport tečnosti i dalje od epidermalne ćelije retikularna lamina ili lamina densa (snopovi kolagena IV koje proizvode ćelije dermisa i obezbeđuju čvrstinu. Nefibrilarni kolagen, tip IV ili kolagen bazalne membrane je najzastupljeniji kolagen, specijalizovane strukture nađene u graničnom tkivu ispod bazalnih ćelija kože. Relativno tanka ploča debljine (tipično 40-50 nm) sastavljena je osim kolagena IV tipa od laminina, heparin sulfata, proteoglikana i nidogena, čini mrežu otvorene strukture, koja je stabilizovana disulfidnim vezama preko ostataka lizina. Proteoglikani su

negativnog naelektrisanja, privlače pozitivno naelektrisane jone Na^+ koji privlače molekule vode osmozom čuvajući ćelije koje se nalaze iznad nje. Ugljenohidratne komponente bazalne membrane čine n-galaktoza, manoza, fukoza, dezoksiriboza, riboza, glukozamin i sialna kiselina njihov sadržaj je 9.50% ukupne težine bazalne lamine. Ovakva struktura omogućuje usporavanje procesa difuzije tečnosti i njeno zadržavanje u ekstraćelijskom matriksu. Pored brojnih funkcija uloga bazalne membrane je da bude difuziona barijera.

Gustina fiksiranih naelektrisanja, bazalne membrane, kao jonogenih grupa koji se nalaze u proteoglikanu i heparan sulfatu je mala. Pokazatelji mobilnosti hloridnih anjona i alkalnih klatjona se razlikuju u odnosu na one u vodi. U bazalnoj membrani je veća mobilnost Cl^- jona u odnosu na K^+ , Na^+ i Cl^{2+} . Struktura bazalne membrane se menja pod dejstvom pritiska. Strukture membrane se menjaju, umotani filamenti od kojih je sastavljena (elastin) se istežu kako stres deluje na membranu. Smanjena propustljivost se održava uprkos uvećanju površine membrane za 75% i smanjenja debljine 65%. Prolaz vode se odvija kroz cilindrične pore čiji se prečnik smanjuje sa povećanjem pritiska na membranu, odnosno istezanjem membrane. Sama debljina nije neophodna da bi se smanjila propustljivost bazalne membrane čije je prosečno vreme 3h. Voda je konstituent međućelijskog prostora, čiji je deo bazalna membrana, u kom interreaguje sa biološkim molekulima. Razumevanje ove dinamike je od fundamentalnog značaja za funkcionisanje kože pa i čitavog organizma.

Sloj cilindričnih ćelija koji je lociran na vrhu dermisa, između njih je bazalna lamina, predstavlja bazalni sloj vijabilnog epidermisa, ćelijska granica i veliko ćelijsko jedro su jasno uočljivi, proksimalni deo ćelije je slobodan i nalazi se u ekstracelularnom prostoru koji okružuje trnolike ćelije. Stratum spinosum, koji se nalazi iznad ovog sloja se karakteriše trnolikim izgledom i ove ćelije su povezane dezmozomima. Stratum granulosum čine spljoštene ćelije čija je karakteristika visok kontrast i okruglo jedro koje je još vidljivo. U stratum corneumu ćelije postaju izdužene. Granica između stratum granulosum i stratum corneum se razlikuju oštrim smanjenjem kontrasta. Mali kontrast

stratum corneuma je pokazatelj veoma malog sadržaja vode. Hidratacija epidermisa je izuzetno varijabilan proces, kao odgovor na spoljne faktore i dermis i hipodermis su jako propustljivi za vodu. Ukupna funkcija barijere je kontrolisana od strane epidermisa, koji može da bubri apsorbujući vodu kojom se snabdeva iz mikrocirkulacije ili okolne sredine. Zapremina ćelijske faze se reguliše ulaskom vode i Na, K i Cl kroz ćelijsku membranu i njihovim kontrolisanjem u skladu sa vremenskim kašnjenjem. Razmena tečnosti obuhvata i difuziju i glavno kretanje vode kroz vodene kanale ili pore. Dva su glavna puta za protok vode: hidrofilna matrica koja je prisutna između endotelih ćelija i u kontinuitetu je sa bazalnom membranom i tanki delovi endotelih ćelija (akvaporini). (Tang i Goodenough 2003) su svojim rezultatima podržali hipotezu da su diskretni jonski kanali prisutni u čvrstoj spojnici (tight junction). Za razliku od konvencionalnih jonskih kanala, koji poseduju transport jona kroz lipidni dvosloj, kanali čvrste spojnice moraju da se orijentišu paralelno sa područjem ćelijske membrane da omoguće paracelularni transport jona. Ova nova klasa paracelularnih kanala čvrstih spojnica ubrzava transport jona između razdvojenih ekstracelularnih kompartmenata. Čvrste spojnice poseduje pore dijametra 0.6 nm slične veličine kao konvencionalni kanali. Sklapanje ovih kanala je najverovatnije ekstracelularno unutar čvrste spojnice. (Tsukita i Furuse 2000) su pretpostavili da tesne spojnice poseduju vodene pore, koje su kanali ispunjeni vodom i ne poseduju selektivnost za jone. Eksperimentalno je ovo kasnije potvrđeno. Kretanje jona kroz čvrstu spojnicu je pasivan proces koji zavisi od gradijenta jona koji prolaze kroz jonski kanal. Čvrsta spojnica obezbeđuje paracelularan put za transport vode i rastvorenih materija ne samo u stratum bazale nego i u stratum granulozum. Čvrsta spojnica je spojnica ćelija-ćelija koja se formira kao paracelularna barijera za rastvorke i vodu između epitelih ćelija i međućelijskog prostora, time uspostavlja paracelularnu barijeru. Proteini koji ulaze u sastav tesne spojnice su nađeni u svim živim delovima epidermisa.

Akvaporini su proteini u ćelijskoj membrani koji regulišu tok vode. Efikasnost akvaporina je zasnovana na prolasku individualnih molekula vode na

kontrolisani način. U germinativnim ćelijama kože akvaporin 3 je propustljiv osim za vodu za glicerol i ureu. U vodenim kanalima voda može proći nesmetano u oba pravca u smeru osmotskog gradijenta. Intercelularna sredina je osmotski kontrolisana da bi sačuvala molekularnu strukturu i svoju funkciju. Ova kontrola je veoma važna u epidermalnim kompartmentima koji su izloženi suvoći spoljašnje sredine. AQP 3 igra suštinsku ulogu u osmotskoj kontroli. Koncentracija AQP-ina u ćeliji nije konstantna, Indukcija ekspresije je povezana sa intezitetom stresa i odvija se 24 h nakon oštećenja barijere. Za razliku od ovog procesa kratkotrajno smanjenje ekspresije profilagrina i filagrina se odvija 3 sata posle stresa, a ponovo se obnavlja nakon 24 časa. Kao odloženi sekundarni odgovor mreža akvaporina pokazuje koordinisanu kontrolu sa filagrinom i ta interakcija obezbeđuje da ćelije imaju vodom bogatu sredinu da se nakon oštećenja obnovi funkcija barijere kože. Otkriveno je prisustvo i drugih akvaporina, u koži čoveka je otkriven AQP 11, AQP 1 je pronađen u dermalnim endotelnim ćelijama, dermalnim fibroblastima, i melanocitima. AQP 10 mRNK je otkrivena u korneocitama, poznato je takođe da se odvija ekspresija AQP 9 za vreme diferencijacije ćelije. U monocitama i derivatima monocita dendričkim ćelijama je takođe pronađen AQP 9, ali monociti takođe poseduju i AQP 10. Na kraju AQP 9 je nađen u preadipocitama, dok su u diferenciranim adipocitima nađeni AQP 7, a u ćelijama znojnih žlezda prisutni AQP 5. Stoga 6 različitih akvaporina (AQP 1, 3, 5, 7, 9, 10) mogu biti selektivno prisutni u ćelijama ljudske kože. Gde su AQP 1 i AQP 5 isključivo vodeni kanali, AQP 3, 7, 9 i 10 propustljivi i za vodu i za glicerol. Često se nalaze dva različita akvaporina u jednom tipu ćelija, što zavisi od stanja ćelijske diferencijacije. Prostorna distribucija AQP 3 je u korelaciji sa sadržajem vode u koži; bazalni i suprabazalni slojevi ćelija sadrže 75% vode dok stratum corneum sadrži 10-15% vode. Akvaporin 3 u ćelijama bazalnog sloja ubrzava kretanje vode između bazalnog sloja ćelija i stratum corneum da bi se održao konstantan nivo hidratacije u živom delu epidermisa. Slično tome dok je Ph na površini kože oko 5 povećava se do 7 ispod stratum corneuma. Dakle Ph senzitivan AQP 3 je inhibiran kiselim Ph i ima udela u nepropustljivosti za vodu na granulo korneocitnoj granici. Diskontinuitet u sadržaju vode između stratum

granulozuma i stratum corneuma je suštinski za strukturu epidermisa zato što loša hidratacija stratum corneuma omogućava visoko uređenu lipid-voda organizovanu strukturu (suštinsku za održavanje barijere propustljivosti kože) koji postoji između korneocita. Ekspresija akvaporina je povezana sa ekspresijom drugih epidermalnih proteina uključenih u mehanizam održavanja hidratacije kože. Ekspresija AQP 3 i kladina 1 je u obrnutoj korelaciji sa ekspresijom CD44 receptorom za hijaluronat (glukozaminoglikan koji veliku količinu vode može da zarobi). Klaudin 1 je protein čvrste spojnice koji zatvara intercelularni prostor za vodu. Ova otkrića sugerišu da klaudin 1 limitira paracelularni prolaz molekula vode kad AQP 3 favorizuje transcelularni prolaz vode i niži sadržaj kladina 1 može da omogući akumulaciju vode i transport u otvoren međucelijski prostor koji karakteristiše visoka ekspresija CD44. Prolaz vode od stratum bazale kroz kožu se odvija osmotskim procesom. Varijacije u osmotskom pritisku i njegova relacija u odnosu na regulaciju telesne temperature su povezane. Postoje i varijacije u stopi transfera gasova kroz kožu sa prolaskom vode i termoregulacijom kože.

Monovalentni joni Na, K i Cl su u ekvilibrijumu između stratum corneuma i dermisa, ako se pretpostavi da su svi monovalentni joni u rastvoru, onda je sva voda iz tkiva raspojoživa za hidrataciju jona. Hidratacija epidermisa je izuzetno varijabilna kao odgovor na spoljašnje faktore, dok su dermis i hipodermis krajnje propustljivi za vodu. Ukupna funkcija barijere je kontrolisana od strane epidermisa koji može da bubri preuzimajući vodu preko mikrocirkulacije ili iz okolne sredine. Sistem, aktivna ćelijska faza ekstraćelijski matriks se prilagođava poroelastičnim efektom koji izaziva bubrenje sloja stratum corneuma. Zapremina ćelijske faze se reguliše fluksom: vode K, Na i Cl jona, kroz ćelijsku membranu i reguliše se u skladu sa vremenskim kašnjenjem.

Put za intercelularno kretanje kroz ćeliju se sastoji od najmanje dve komponente: membranske komponente (posredstvom kanala čvrste i pukotinaste spojnice) i citoplazmatske komponente. Ovo kretanje je pod uticajem efektivne površine kanala pukotinaste i čvrste spojnice. Difuzija malih molekula je u funkciji veličine molekula oblika kao i viskoznosti. Stopa kojom

molekuli difunduju u citoplazmu je pod uticajem ne samo viskoznosti nego i matriksa citoplazme. Faktor koji limitira stopu difuzije molekula je smanjenje stope difuzije citoplazme, mada su razmatrane i pore u arhitekturi matriksa citoplazme. Proteini mogu da se vežu reverzibilno za komponente citoplazmatskog matriksa smanjujući svoju mobilnost ali i molekula vode. Ovo vezivanje i interreakcija sa vodom je važno za steričke interrekcije. Citoplazma doprinosi približno sa 15% ukupnom otporu kretanje molekula kroz intercelularni prostor (čvrstu i pukotinastu spojnicu i citoplazmu). Kanal pukotinaste i čvrste spojnice ima veću proporciju rezistentnosti difuziji (85%) u odnosu na citoplazmu. Stopa difuzije kroz citoplazmu je brža u odnosu na pukotinastu i čvrstu spojnicu ako je viskoznost molekula manja, i stoga nije limitirana. Stopa difuzije zavisi proporcionalno od koncentracije molekula. Tokom diferencijacija keratinocita u sloju stratum granulozum produkcija keratohijelina uzrokuje da su ćelije sa zrnastom citoplazmom. Kako ćelije prolaze iznad tog regiona počinje sinteza glikolipida koji se istiskuju u međućelijski prostor. Ovaj proces formira debeo adhezivni vodonepropusni lipidni omotač koji omogućuje čuvanje vlage unutar kože i omogućuje koncentracioni gradijent keratinoznog sloja epidermisa. Akvaporini nestaju tek u stratum corneumu sa završetkom procesa diferencijacije i smrću korneocita. Unutrašnji lipidni slojevi stratum corneuma su hidrofobni stoga provodnost molekula vode postaje mala. Da bi postojao protok vode u plćim slojevima kože slobodna voda mora proći kroz specifične kanale ili biti vezana za specifične hidrofilne supstance i onda se transportovati kroz dezmozome, mostove u epidermisu. Epidermalni lipidi nastaju u goldžijevom aparatu u ćelijama u procesu orožnjavanja, skladište se intracelularno u obliku dvojne lipidne membrane u mikroskopski malim delićima vakuolama, vezani su za membranu i zovu se telašca Oblanda, lamelarne su granule i nastaju kako se korneocite diferenciraju. U zrnastom sloju, stratum granulozum, se Oblandova telašca fagocitozom prenose u međućelijski prostor. Tokom sazrevanja se polarni lipidi, fosfolipidi i sterolestri, enzimski pretvaraju u nepolarne lipide kao što su ceramidi i proste masne kiseline i tako nastaje polupropustljiva barijera orožnalih ćelija i lipida u tečnoj fazi. Odstranjivanjem ove barijere voda hemikalije i mikroorganizmi lako

prodiru u dublje delove kože. Kao odgovor kože se povećava sinteza holesterola, masnih kiselina i sfingolipida što vodi do ponovnog obnavljanja funkcije barijere. Lipidi su organizovani u lamelarne dvoslojne strukture u kojima su lipidni lanci visoko uređeni. Ceramidi su kovalentno vezani za opne proteina korneocita i interreaguju sa slobodnim lipidima ekstraćelijskog prostora. Površina kože je prevučena hidrolipidnim slojem koji čine voda i proste masti i glavna joj je uloga u zaštiti od bakterija i gljiva. U samom keratinu je 1% lipida, glavna komponenta lipida keratina je ceramid 40%, slobodnih masnih kiselina 25% i holesterola 25%.

6.3. Zadržavanje vode u epidermu, TEWL i dr.

Stratum corneum poseduje približno 30% vode, koja je uglavnom asocirana sa elastičnošću. U lipidima je zarobljeno 10% vode, a preostalih 20% koja je otporna na ekstrakciju rastvaračima je sekundarno vezana za keratin. U samoj unutrašnjosti slojeva stratum corneum sadrži veći nivo vode, dok spoljašnji slojevi stratum corneuma sadrže nivo vode koji je više pod uticajem okolne vlažnosti vazduha. Prirodni faktori ovlažavanja (NMF) su prisutni samo u stratum corneumu. Nalaze se u dubljim slojevima od kojih nivo sadržaja NMF opada kao i nagib profila sadržaja vode u corneumu zajedno sa njim, sve do površine kože. Ovi faktori ovlažavanja koji nastaju pre svega razgradnjom filagrina do pojedinačnih amino kiselina, uz pomoć uree koju izlučuju akvaporini, su odgovorni za zadržavanje vode u donjim delovima corneuma. Plastifikacija stratum corneuma je u funkciji sadržaja vode. Zdrav stratum corneum mora biti u stanju da održava adekvatan nivo vode nasuprot gradijentu evaporativne difuzije koju kontroliše relativna vlažnost. Zdrav stratum corneum sadrži 10 % čvrsto vezane vode, koja zavisi od prisustva prirodnih faktora vlažnosti (NMF) koji vezuju molekule vode iz vazduha. Sadržaj vode u stratum corneumu raste sa povećanjem relativne vlažnosti vazduha. Voda nije prisutna samo u korneocitima nego se nalazi i u međućelijskom regionu, akumulira se u vodenim džepovima smanjujući koheziju korneocita. Uprkos prisustvu velike količine vode u stratum corneumu sloj niske hidratacije

između stratum corneuma i stratum granulozum je još prisutan, širok je oko 10 µm. Ovaj sloj omogućuje zaštitu dubljih, živih slojeva kože od prevlaživanja da bi se u gornjim slojevima granulocita mogli formirati lipidne membrane za zadržavanje vode iz organizma. Za formiranje lipidnih slojeva je od izuzetne važnosti mala količina vode i njena molekularna organizovanost. Transport vode kroz kožu je blisko asociran sa razlikom u pritisku vodene pare spoljašnje sredine. Gradient hemijskog potencijala kože nastaje zbog gradijenta potencijala pritiska. Transport vode uzrokuje prenošenje jona. Koncentracija jona na površini kože je veća od one u subpapilarnom pleksusu. Joni ne mogu proći granicu koža okolina pa prenošenje jona, zbog toka tečnosti, je uravnoteženo difuzijom jona u suprotnom smeru. Glavna sila za transport vode je gradijent hemijskog potencijala tečnosti i joni. Negativna vrednost hemijskog potencijala na površini kože je suštinska za manji pritisak pare na površini kože što smanjuje gubitak vode. Hidraulična propustljivost mrtvih delova kože je 10⁷ puta manja nego u živim delovima. Epidermis je u suštini visko elastična čvrsta materija bez unutrašnjeg toka tečnosti. Korneocyte čine kompaktno stratum corneum koji je znatno deblji i jasnije diferenciran. Ove ćelije poseduju više diferencirane dezmozome, deblje kornifikovane omotače i tanke su sa uskim unutar ćelijskim prostorom. Poseduju brojne korneodezmozome i dobro orjentisanu mrežu keratinskih fibrila koja je povezana sa dezmozomalnim strukturama. Više ili manje kontinuirani regioni molekula vode su prisutni, apsorbovani u neregularnim slojevima za polarne grupe keratina. Fizički je verovatno da se glavni tok difuzije odvija kroz regione vode između molekularnih i makromolekularnih komponenata keratinocita pre nego kroz proteinski matriks. Voda u susedstvu površine proteina pokazuje značajno drugačija fizička svojstva u odnosu na bulk vodu, raste gustina i viskoznost kao i stepen imobilisanosti. Polarne i nepolarne grupe zajedno mogu učestvovati u stabilizaciji imobilisanih molekula vode što favorizuje posedovanje otvorene strukture. Struktura molekula keratina može pomoći takvu stabilizaciju, slobodna i ograničena difuzija tečnosti može da se odvija zajedno. Relativni iznosi bitno zavise od efikasnosti stabilizacije i veličine međumolekularnih prostora. Primarno apsorbovani sloj vode je svakako težak put za difuziju zato

što je H₂O-protein veza jača od H₂O - H₂O veze i rotacija molekula vode je strogo ograničena u prvom sloju vezanih molekula vode. Ovi faktori mogu da uvećaju vreme za uzastopne skokove veza molekula vode u pojedinačnom sloju i stoga opada stopa difuzije. U sledećem sloju i u nekoliko narednih smanjenje stepena slobode rotacije može biti značajan faktor. Molekul vode ili neki mali polarni molekul koji se nalazi u regionu vezane vode difunduje sa velikom aktivacionom energijom. U sloju slabije vezanih molekula vode aktivaciona energija molekula koji difunduju je bliska onoj u bulk vodi. Veza sa nekoliko molekula vezane vode mora biti raskinuta da bi jedan molekul vode mogao difundirati.

Keratin poseduje složenu strukturu u kojoj su filament i mikrofibrili ugrađeni u osnovnu supstancu ili matriks. Mikrofibrili su u prečniku ~7.2-7.6 nm a razmaknuti su 8.65-9.75 nm aksijalne jedinice koje se ponavljaju su dužine 20 nm. Mikrofibrili poseduju helikalnu simetriju. Matriks je manje uređen i manje globularan po prirodi i sastoji se od proteina sa visokim sadržajem sumpora. U stratum corneum molekuli vode postoje u tri različita stanja, zavisno od sadržaja vode. Ispod 9% voda je čvrsto vezana za polarna mesta proteina stratum corneum (primarna hidratacija), od 9% do 28% voda je vezana za primarnu vodu a stratum corneum gubi kapacitet za izduživanje slabijim vodoničnim vezama i pokazuje svojstvo brze hidratacije i dehidratacije a preko 33% svojstva vode su kao u bulk vodi i svojstva keratina su neznatno izmenjena. Hidratirani keratin poseduje veću dielektričnu konstantu ne samo zbog apsorbirane vode nego i zbog samog proteina. Električna provodljivost je u korelaciji sa sadržajem vlage u mikrofibrilu keratina, raste sa porastom hidratacije. U keratinu difuzija molekula vode između filamenata ili na njihovoj površini je potpuno različita i nezavisna od difuzije unutar molekula keratina. Difuzija se odvija kroz pore u keratinu i kroz samu zapreminu keratina. Ako sistem molekula koji difunduju duž tih različitih puteva održavaju svoju nezavisnost jedan od drugog ukupna difuzija će biti suma oba fluksa. Kad se proces difuzije odvija kroz dva ili više nezavisnih puteva onda opšta difuzija neće biti linearna. Voda poseduje veliki efekat na mehanička i druga fizička svojstva fibrila α keratina i zajedno čine jedinstven sistem. Pošto je voda visoko

polaran molekul može interreagovati sa vodoničnom vezom i Kulonovom interakcijom sa drugim polarnim grupama u lancu α keratina u strukturi fibrila. Prisustvo ostataka amino kiselina sa hidrofilnom grupom rezultuje u privlačenju molekula vode. Ovo privlačenje se odvija pri maloj relativnoj vlažnosti, sa nižom energijom privlačenja, mesto vezivanja postaje mnogo važnije pri većoj relativnoj vlažnosti. Pri većoj vlažnosti voda se ne vezuje za specifična mesta nego sa absorpcijom kao rezultatom u razlici slobodne energije na osnovu smeše vode i keratina. Molekuli vode su mnogo pokretniji od komponenti strukture molekula keratina. Mobilnost molekula vode raste sa porastom sadržaja vode. Porast sadržaja vode menja energiju vezivanja za sve molekule vode koje su već apsorbirane u strukturi keratina. Keratin voda sistem deluje kao poluprovodnik protona. Mehanizam provođenja: rotacija molekula vode je praćena skokovima protona između dva ravnotežna stanja koje postoji u vodoničnoj vezi između dva atoma kiseonika u mreži veza između molekula vode koja obezbeđuje provodljivost. Provodljivost sistema je veoma osetljiva na kontinuitet mreže vodoničnih veza koje formiraju molekuli vode keratin voda sistema. Ovo objašnjava visok stepen zavisnosti provodljivosti od vraćanja u ponovno stanje sistema keratin voda. Voda u keratin voda sistemu deluje pre kao kontinuirana mreža nego izolovani molekuli vode koji su vezani za hidrataciona mesta keratinske strukture. Sa porastom sadržaja vode u sistemu voda keratin odvija se progresivna promena vezivanja za sve molekule vode. U sistemu mikrofibril matrica, mikrofibril sadrži kristalastu strukturu α heliksa. Glavni lanac ove α heliks strukture predstavlja više od pola proteina mikrofibrila i ne interreaguje sa molekulima vode. Njegove amidne NH grupe se ne konvertuju u ND kad su vlakna keratina nabrekla, stepen nabreknuća uzrokovanih molekulima vode je 53% a mikrofibrila 11%. Visoki stepen bubrenja matrice ukazuje da voda primarno mora biti izvan proteina matrice. Protein matrice je visoko izukrštan (jedna cisteinska veza na svakih šest ostataka) bez hidrofobnih ostataka i sposobni su za veliki stepen bubrenja. Matriks može biti razmatran kao matriks + voda pre nego nabreknuo matriks u vodi. Protein matriks je primarno globularan formiran u hidratisanom okruženju površina globularnog proteina je hidrofilna i interreaguje sa vodom.

Dalje njegova unutrašnja struktura koja je visoko izukrššana i sadrži hidrofobne strukture. Voda u α keratin strukturi je kontinuirana vodoničnim vezama vezana masa koja interreaguje sa graničnom površinom sa α keratin proteinom. Voda u polimeru keratina formira inter penetrirajuću polimernu mrežu. Mešavina dva polimera vode i keratina su dimenzija da je voda u preseku dijametra 0.1nm dok je prečnik mikrofibrila 7.3 nm sa razdaljinama između mikrofibrila od oko 11 nm. Integracija ova dva sistema je posledica interakcija kratkog dometa. Mehanizam interakcije u sistemu voda keratin je pomoću vodoničnih veza sa krajevima bočnih lanca kao NH_3^+ i COO^- koji deluju kao akceptor odnosno donor protona. Na relativno niskoj vlažnosti molekuli vode u stratum corneum se kruto vezuju za primarna mesta vodoničnog povezivanja u keratinu. Kako relativna vlažnost raste više vode ulazi u stratum corneum i ova primarna mesta vezivanja postaju zasićena pa se dodatna voda kondenzuje u sekundarna mesta vezivanja, koja su indentifikovana sa primarno vezanom vodom i ona se vezuje za kruto vezanu vodu. Ako relativna vlažnost dalje raste više vode ulazi u stratum corneum i sekundarna mesta postaju zasićena, dodatna voda se kondenzuje kao slobodna voda sa veoma slabim interakcijama sa primarnim ili sekundarnim mestima vezivanja. Voda je tešnje vezana za primarna mesta vezivanja keratina, što vodi ka većem redu i manjem opsegu energija vezivanja nego u čistoj bulk vodi. Kako slabije vezana i slobodna voda ulazi u stratum corneum na većoj relativnoj vlažnosti red se smanjuje i opseg energija vezivanja raste što vodi do proširenja spektra omotača. U toku sazrevanja živih ćelija koje se kreću prema stratum corneum protein keratin se grupiše u granule. Ove granule su prisutne u granularnom sloju ćelija kože i ispunjene su filagrinom, ovaj kompleks štiti filagrin od razgradnje. Kako se degenerisane ćelije kreću ka površini enzimi razgrađuju keratin filigrin kompleks. Filagrin se potom nalazi izvan korneocita a keratin koji zadržava vlagu unutar korneocita. Kada količina vlage u koži opadne specifični proteolitički enzimi stratum corneuma aktiviraju buduće raskidanje filagrina u slobodne amino kiseline. Korneo epidermalne spojnice, agregati proteina koji kontrolišu paracelularnu propustljivost, deluje na drugi način da spreče vodu iz epidermisa da ispari iz stratum corneuma. Korneodezmozomi se sastoje od

proteina iz familije kadherina, transmembranskih glikoproteina, dezmogleina 1 i dezmokolina 1, vezuju se jedan sa drugim u susednim korneocitima. Unutar korneocita su ovi proteini vezani za mikrofilamente keratina preko korneodezmomalne proteinske ploče kao plakoglobin, dezmoplakin i plakofilin. Oni obezbeđuju stabilnost i ekstra koheziju korneocita u stratum corneum. Drugi korneodezmomalni protein, korneodezmozin, posle izlučivanja u lamelarna tela sa intercelularnim lipidima i izvesnim proteinima postaje asociiran sa dezmozomalnim proteinima baš pre transformacije dezmozoma u korneodezmozome. Svi ovi proteini su unakrsno povezani u kompleks transglutaminazom, njihova kontrolisana dezorganizacija se odvija proteolizom čime se smanjuju međumolekularne sile između korneocita.

Karakteristika stratum corneuma je visoko uređena strukturna organizacija lipida, čija je težina 10% ukupne težine, sastavljena je od kratkoperiodične i dugoperiodične faza sa distancom ponavljanja od 6 odnosno 13 nm. Velike klase lipida koje se ekstrahuju iz kože su ceramidi, kojih je 6 klasa, 50%, holesterol 25% i masne kiseline 25%. Male količine holesterol sulfata i holesterol estra su takođe prisutne. Svi ceramidi i masne kiseline su štapićastog ili cilindričnog oblika i njihove fizičke osobine ih čine pogodnim za formiranje domena membrane sa visoko uređenom gel fazom. Domen gel faze će biti manje fluidan i stoga manje propustljiv od njemu suprotne tečno kristalaste faze. Holesterol je opšte prisutan membranski lipid i sposoban da obezbedi stepen fluidnosti da ne bi mogli biti rigidni i moguće krt sistem. Ovo može biti neophodno za savitljivost kože. Po modelu Forslinda (Forslind 1990) ostrva gel faze domena su razdvojena kontinuiranim tečno kristalastim domenom. Unutar takve lamele polarni molekuli difunduju bočno u ili u blizini regiona grupa polarnih glava i manje polarni molekuli mogu difundovati bočno unutar hidrofobne unutrašnjosti hidrofobnog dvosloja. Molekuli mogu difundovati samo slabo kroz domen gel faze i difuzija kroz takvu lamelu će biti više favorizovana kroz tečno kristalni domen. Region većeg fluksa kroz takvu lamelu mešovitih faza bi bila na granici faza. Granica faza poseduje veću frekvenciju defekta pakovanja. Većina međucelijskog prostora je ispunjeno lamelama dok

manji deo ekstracelularnog prostora sadrži dezmozome i amorfni materijal. Elektron gusti amorfni materijal predstavlja produkte razgradnje dezmozoma dok svetao amorfni materijal predstavlja tečnu fazu holesterol estera. U lamelarnom regionu broj lamela kroz međućelijski prostor i način organizovanja lamela varira. Specifičan raspored lamela je rezultat interakcije između kovalentno vezanih lipida na spoljnim površinama dva susedna korneocita. Svingozin iz kovalentno vezanog ω hidroksiceramida se izvrće da formira visoko međuprstaste, poput zatvarača, uske lamele između široke ω hidroksiacil porcije ovog molekula. Slobodni lipidi pune neke prostore unutar strukture. Ove interakcije efikasno vezuju susedne ćelije zajedno. Između široke ravne površine korneocite se nalaze ravnomerno raspoređene, približno 5 nm široke lamele, međutim mogu biti i drukčijih rasporeda što zavisi od načina fuzije vezikula koje su istisnute iz lamelarnih granula. (Wertz 2000.) Hemijska struktura ceramida je kombinacija masnih kiselina sa sfingoidnom bazom (sfingozin, fitosfingozin) udruženi amidnom vezom između karboksilne grupe masne kiseline i amino grupe baze. Struktura i organizacija ceramida u lipidnoj fazi stratum corneuma ima jak uticaj na propuštanje i zadržavanje vode u koži. Za ceramide i malo sniženje lamelarne razdaljine ponavljanja može biti povezano sa reorganizacijom ugljovodoničnih lanaca. Znak i oblik amida I jasno ukazuje da voda prodire u polarnu međupovršinu lipida, posle hidratacije amid I je uključen u mrežu jačih vodoničnih veza. Prisustvo vode nema veliki uticaj na lamelarne razdaljine ponavljanja ukazujući da se veoma mala količina vode može inkorporisati u polarnu površinu ceramidnih molekula. Osnovna svojstva vode kao gustina i dielektrična konstanta se menjaju u kontaktu sa jednom polarnom glavom lipida ili globularnim proteinom. Karakteristika različitih polimorfnih lipid voda faza je da voda zarobljena u kanalima mikroskopskih dimenzija različitih morfologija lipida ograničava vodu u jednu, dve ili tri dimenzije. Kad nova voda dospe u region između dvosloja vrši se rad kako nova voda uređuje polarne glave. Ovo rezultuje u efikasano odbijanje između susednih lipidnih dvosloja. Doprinos u ukupnoj slobodnoj energiji od udruživanja više vode sa polarnim glavama prevazilazi ovaj rad, tako da je ukupna promena slobodne energije negativna. Na nižem osmotskom pritisku

izvan opsega hidratacionog odbijanja ovaj režim daje način za elektrostatičko odbijanje za naelektrisane molekule ili van der Waals privlačenje za neutralne molekule. Kad se voda inkorporisana između dvoslojeva smrzne, migrira izvan lamelarne rešetke možda u međucelijski region gde formira džepove leda. Ako voda ne migrira onda će se ona smrznuti u prostoru između dvosloja a led bi bio mnogo gušći nego što je primećeno pa led ne postoji između dvosloja. Džepovi leda postoje kao bazeni vode u ravnotežnom stanju sa vodom koja se nalazi između lipidnih dvosloja, koja se nije smrznula. Kad se temperatura menja voda se repartioniše dok se hemijski potencijal ne izbalansira zato što hemijski potencijal vezane vode strogo zavisi od debljine sloja vode između dvosloja, reparticionisanje se manifestuje kao promena u jedinici ćelijskog prostora lamelarne rešetke. Imamo sistem u kom se može otkriti ravnoteža particionisanja vode između dva stanja. Struktura dvosloja se modifikuje kako se voda particioniše u lamelarnoj strukturi. (Gleeson Erramilli Gruner 1994.)

Posle hidratacije acil lanci fitosfingozin ceramida se pakuju u nalik na heksagon strukture. Amid I i amid II vibracije su osetljive na fazni prelaz ceramida. Postoje jake inter i intra molekularne vodonične veze između amida i hidroksilne grupe u polarnoj grupi ceramida. Mreža vodoničnih veza i konformacija polarne grupe ceramida je samo neznatno pod uticajem hidratacije. Kapacitet ceramida za propuštanje vode je međutim znatno veći kod ceramida tipa 3 u odnosu na ostale klase fitosfingozina. Strukturalna i organizaciona svojstva ceramida tipa 3 u raznim fiziološkim uslovima utiču na svojstva lipidne barijere stratum corneuma. Sloj vode između membrana je ekstremno tanak oko 0.1 nm i vreme potrebno za potpunu hidrataciju je u poređenju sa fosfolipidnom membranom mnogo duže dok voda prodire mnogo dublje u membranu i otkrivena je delimično u sloju ugljovodoničnih lanaca, verovatno voda ubrzava lateralnu difuziju lipida u membrani. U uzorku membrane sa 25% holesterola debljina je oko 4.56 nm. Debljina polarnih glava je oko 0.35 nm a ugljovodoničnih lanaca 3.86 nm. Simetrične i asimetrične CC vibracije istezanja na 1062 i 1130 cm^{-1} ukazuju da je membrana visoko uređena struktura sa velikim brojem trans konformacija. Koncentracija holesterola ne utiče na hidrataciju spoljašnje membrane i ne utiče na debljinu sloja vode između membrana. Holesterol se

nalazi u inter zoni između kristalaste i tečno kristalaste faze i fluidizuje kristalastu (gel) fazu i stabilizuje tečno kristalastu fazu. Debljina sloja vode između membrana, pod punom hidratacijom, je ekstremno tanak. Uprkos tome voda igra važnu ulogu u faznom razdvajanju. Uvećana količina holesterola smanjuje debljinu membrane. Red acilnih lanaca u među ćelijskim lipidima raste sa hidratacijom kad je sadržaj vode mali dok je nezavisan od stepena hidratacije pri većem sadržaju vode. Na neznatno višoj temperaturi se fluidnost membrane povećava sa povećavanjem sadržaja vode do potpuno hidratisanog stanja. Ovo ukazuje da i temperatura i hidratacija utiču na fazno ponašanje stratum corneuma. Proces hidratacije može uticati na stepen jonizacije masnih kiselina u lipidima, moguće da koncentracija protona između lamela može varirati između nabreklog i suvog uzorka. Verovatno da Ph utiče na fazno ponašanje lipida stratum corneuma. Lipidi u gel stanju imaju mnogo manju sposobnost da apsorbuju vodu. Nađen je eksponencijalni odnos između osmotskog pritiska i sadržaja vode pri relativnoj vlažnosti od 65%. Osmotski pritisak vode je isti kao i intermolekularne sile u dvosloju lamelnog sistema pri relativnoj vlažnosti od 100%. Egzotermni prelazi pri višoj relativnoj vlažnosti se odvijaju usled reorganizacije lipidnih domena unutar lamelarne strukture tj. usled fuzije lipidnih domena na većoj relativnoj vlažnosti. Svojstva ekstracelularnih lipida stratum corneuma su suštinski za svojstva barijere za kožu, tečni lipidi predstavljaju neprekidan put za transport molekula. (Silva Topgaard Kocherbitov Sousa Pais Sparr 2007). U stratum corneum postoje dva kritična nivoa vode, oko 18% i 33%. Ispod 18% mobilnost dubljih delića ugljovodoničnih lipidnih lanaca se povećava, sa velikim promenama u elastičnosti i električnim svojstvima stratum corneum. Iznad 18% vode u stratum corneum i hidratacije polarnih regiona membrane stratum corneum povećavaju svoju fluidnost i oštro efikasnost transporta vode kroz membranu. Mobilnost srednjeg dela ugljovodoničnog lanca se dešava kad je sadržaj vode u stratum corneum iznad 33% kad elastični i električni parametri ne zavise od stanja hidratacije. Korneodezmozomi se tokom vremena polako razgrađuju da bi bio omogućen proces deskvamacije. Sama voda tekođe remeti stratum corneum ali sporije. Izmene međućelijskih lamelnih dvosloja ali ne i savijanje

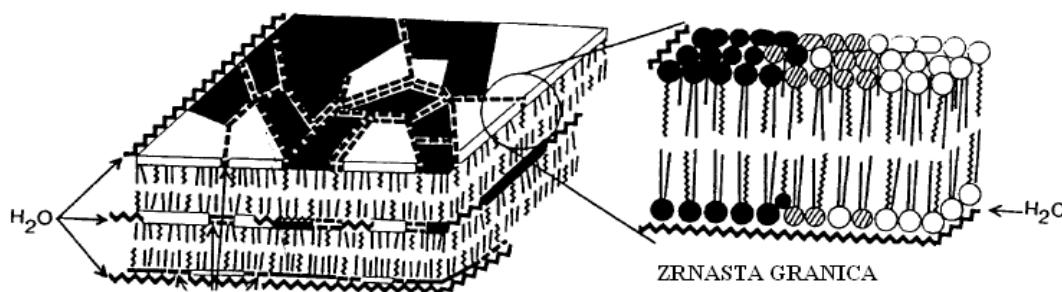
lamelarnih dvosloja se odvijaju nakon dva sata kontakta sa vodom. Savijanje intercelularnih membrana se dešava nakon šest sati. Obimna disocijacija korneocita se dešava nakon 24 h izlaganja vodi. Izlaganje u vodi uzrokuje formiranje amorfnih međucelijskih lipida. Degradacija korneo- dezmozoma se odvija paralelno sa remećenjem međucelijskih lamela, kalcijum izgleda obezbeđuje neku vrstu zaštite. Slično remećenje međucelijskih lamelarnih dvoslojeva se odvija na sobnoj temperaturi. Dvosloji koji sadrže molekule ceramida poseduju veću gustinu stoga nižu stopu pasivnog transporta u poređenju sa fosfolipidnim dvoslojem. Na fiziološkoj temperaturi lipidi su u gel fazi sa uređenim lipidnim repovima. Međutim velika asimetrija dužine dva repa molekula ceramida vodi do strukture nalik na tečno okruženje u dvoslojnoj ravni. Profil bočnog pritiska pokazuje velike lokalne varijacije kroz dvosloj. Kad je sastav dvosloja bliže odnosu kao u koži bočne fluktuacije pritiska su u velikoj meri potisnute, ceramidni repovi značajno interreaguju, depresija lokalne gustine u regionu između repova se smanjuje i ovaj dvosloj poseduje smanjen modul elastičnosti. Ovaj sastav lipidnih slojeva u stratum corneum je odgovoran za svojstva barijere i za stabilnost lipidne strukture nasuprot mehaničkog stresa. Višak hemijskog potencijala i difuzibilnost vode su u funkciji dubine u lipidnom dvosloju. Višak slobodne energije vode unutar lipidnog dvosloja je dva puta veća nego one u fosfolipidnom dvosloju na istoj temperaturi. Propustljivost koja se smanjuje eksponencijalno sa barijerom slobodne energije se smanjuje za nekoliko redova veličine u poređenju sa fosfolipidnim dvoslojem. Prosečno vreme potrebno da molekul vode prođe dvosloj je oko 0.2 s. (Das, Olmsted, Noro 2009.) Trifazni krupnozrni model, (Cibele, Falkenberg Georgiadis 2008), kojim se objašnjava transport kroz epidermis sastoji se od slobodne ekstracelularne vode, živih ćelija (keratinocita) i inertnog ekstracelularnog matriksa. Model obuhvata aktivni transport Na^+ , K^+ i Cl^- jona kroz membranu keratinocita i elektromigraciju pokrenutu spolja nametnutom razlikom elektrostatičkog potencijala. Lokalna zapremina ćelije je regulisana transmembranskim fluksom vode i jona u skladu sa vremenskim kašnjenjem sa ciljem da očuva zapreminu između određenih granica. Slab hipoosmotski šok ili gradijent negativnog potencijala može održavati veći transepidermalni gradijent potencijala i

omogućiti vlaženje gornjih delova epidermisa. Postoji velika fleksibilnost delova međućelijskih lipidnih lamela, koji sadrže različite po količini i sastavu lipide. Takve varijacije su rezultat metaboličkih efekata i uticaja različitih okolnih faktora. Takav razmeštaj se odražava u broju i formi međućelijskih lamela stratum corneuma. Hidroliza holesteril sulfata i glikozil ceramida rezultuje u nestanku međućelijskih lamela u gornjem delu stratum corneum.

Sadržaj vode u najdubljem sloju stratum corneum je u ravnoteži sa susednim vlažnim granularnim slojem. Spoljašnji sloj ćelija je u ravnoteži sa okolinom i teško je odrediti njenu količinu vode i suvlji je od najdubljeg sloja stratum corneum. Prisutan je gradijent koncentracije u stratum corneum koji uslovljava kontinuiranu difuziju vode iz i unutar tela kroz kožu i u spoljašnju okolinu-transepidermalan gubitak vode. Transepidermalni gubitak vode je pokretan koncentracionim gradijentom vode. Unutar stratum corneum molekuli vode se sreću sa silama koje ih zadržavaju, koje ometaju njihovo kretanje, ove sile koje zadržavaju opadaju kako hidriranost tkiva raste. Difuznost za kretanje vode kroz stratum corneum može biti determinisana i ovo je mera zadržavajuće sile. Ako difuznost vode u stratum corneum može biti izmerena kao funkcija njenog sadržaja vode, ovi podaci sa poznavanjem koncentracije vode u spoljašnjem i unutrašnjem sloju stratum corneuma bi omogućili izračunavanje profila koncentracije vode. Koncentracija vode u stratum corneum može biti izmerena merenjem transepidermalnog gubitka vode. Za kožu kao barijeru, za prolaz tečnosti kroz kožu u ili iz organizma je karakteristično svojstvo nevidljivog gubitka vode kroz slojeve ćelija koje grade epidermis. Veliki transepidermalni gubitak vode TEWL može izazvati ozbiljnu dehidraciju i time poremećaj homeostaze elektrolita. TEWL je strukturno svojstvo epidermisa ali može biti pod uticajem mehanizma koji ubrzava transport vode. Akvaporini su uključeni u ekstremni gubitak vode kroz kožu u slučaju okluzije ili prevelike vlažnosti donjih slojeva kože, AQP 3 je obilan u svim živim delovima epidermisa, akvaporini su nekoliko puta češći u embrionu nego u odraslom organizmu. Za difuziju vode kroz epidermis i transcelularni i intercelularni put su važni, međutim veća količina vode difunduje kroz transcelularni put zbog

većeg odnosa površine korneocita u odnosu na lamelarnu oblast. Fluks difuzije vode, TEWL, je obrnuto proporcionalan u odnosu na veličinu korneocita, manja veličina korneocita dovodi do većeg TEWL jer poseduju brži proces difuzije.

Brzina transfera molekula vode kroz epidermis je uslovljena porozitetom bilamelarne strukture membrana. Sastav i struktura epidermnih lipida se menja tokom procesa epidermne diferencijacije. Procenat ćelijskih lipida značajno se povećava, a njihov sastav postepeno se menja od donjih ka gornjim slojevima. Fosfolipidi i glikozilceramidi preovlađuju u vijabilnom epidermu, dok su u rožnatom sloju prisutni u izuzetno malim količinama. Obrnuto, procenat ceramida, holesterola i masnih kiselina povećava se od donjih ka gornjim slojevima epiderma. Ove promene posledica su ne samo povećane sinteze lipida u spinoznom i granuloznom sloju već i transformacije ranije stvorenih lipida. Stvoreni lipidi u rožnatom sloju formiraju multilamelne slojeve koji grade lipidnu barijeru epiderma od nivoa bazalne membrane do nivoa stratum corneuma, dužina lanaca lipida приметно raste. Proteini korneocitne membrane kovalentno vezivani sa C30–C34 ω -hidroksi kiselinama, kao i hidroksiacil svingozidima i zasićenim masnim kiselinama lanaca dužine C14–C22, što površinu korneocita čini hidrofobnom. Prisustvo alifatičnih lanaca dužine C18–C34 na membrani korneocita uslovljava kristalno ili gel stanje lipida na fiziološkim temperaturama. Posebnu ulogu u formiranju barijere, ali i u koheziji epiderma ima stvaranje lipidnih omotača korneocita prelaskom acilglikozilceramida u hidroksiceramide na površini ćelijskog omotača. (Toskić-Radojičić 2002.)



Slika 11. Mozaički model sa zrnastim granicama. Lipidi sa veoma dugim lancima agregiraju u površine kristalne gel strukture razdvojene zrnastim granicama građenim d lipida sa relativno kratkim lancima u tečno kristalnom stanju. (Toskić-Radojičić 2002.)

Dva su uslova za nastajanje kristalnog stanja. Prvi je dužina lipidnih lanaca a drugi temperatura. Ako se temperatura smanjuje, a dužina lanca raste i ako su pri tom to zasićeni alifatični lanci, van der Waals-ove sile između acilnih lanaca dovešće do srastanja, odnosno do zgusnutog pakovanja i nastajanja kristalnog stanja. U kristalnom stanju pokreti lanaca su minimalni i zbog toga čak i tako mali molekul kakav je molekul vode nije u stanju da prođe kroz dvosloj. Slika (11) Ne treba zanemariti ni uticaj funkcionalnih, odnosno hidrosolubilnih grupa na lipidnom molekulu, pošto i one utiču na razdvajanje i grupisanje lipida u dvosloju. Tako nastaju kristalne površine različitog sastava zavisno od konfiguracije zasićenih i mononezasićenih acilnih lanaca, kao i od konfiguracije funkcionalnih grupa. Ostali lipidi koji su u tečnom stanju (masne kiseline) okružuju kristalne površine predstavljajući ujedno mehanički elastične spojeve kristalnih površina. Ovi spojevi će omogućiti vodi da se razlije kroz sistem. Kristalne površine su stabilne strukture na temperaturama kože od 20° do 40°C. Da bi se razbila kristalna organizacija i da se struktura prevede u tečno kristalno stanje, potrebna je povišena temperatura, pa pod normalnim okolnostima možemo očekivati da se čitav transport preko barijernog dvosloja obavlja u oblastima gde su lipidi u tečno-kristalnom stanju. Put transporta vode kroz stratum corneum se odvija preko tečno-kristalnih zona bilamelnih lipidnih struktura koje zauzimaju prostor između korneocita. Ove bilamelne strukture su razdvojene vodenim filmom koji dodiruje funkcionalne hidrosolubilne grupe lipidnih molekula. Prema tome voda može da klizi u filmu sve dok ne pronađe prolaz u sledeći sloj. Visok sadržaj ceramida je u strukturi lipida kožne barijere sa karakteristično visokim procentom masnih kiselina koje imaju u osnovnom lancu 24–30 C atoma. Od nivoa bazalnih ćelija ka površini stratum corneuma dužina lanca lipida primetno raste. Za funkcionisanje barijere bitno je da sadržaj neutralnih lipida bude veći od sadržaja svingolipida. Vrlo retko voda će moći da vezano prođe više slojeva, pa će stoga imati dugu krivudavu putanju. (Toskić-Radojičić 2002.) Istraživanja sugerišu da je vode agregirana u malim bazenima koji su locirani u blizini zupčastih površina lipidnih regiona. Vodeni bazeni su uzrokovani faznom separacijom između hidrofobnih regiona lipidnih dvoslojeva

i molekula vode. Predpostavlja se da su bazeni međusobno povezani, što predstavlja kontinuiranu mrežu vodenih puteva za difuziju vode. Voda prolazi kroz kožu u obliku vodene pare, bez rastvoraka. Vodena para prolazi iz spoljne sredine uz pomoć gradijenta pritiska pare koji je dovoljno veliki da pokrene vodenu paru kroz epidermis. Kad je pritisak vodene pare okolnog vazduha ispod 23 mm Hg voda isparava iz kože, dok ako je iznad 23 mm vodena para ulazi u kožu. Svojtvo molekula vode u gasnom agregatnom stanju je da poseduje veću kinetičku energiju od molekula vode u tečnom stanju, termalna energija mora biti dodata da bi se voda konvertovala u paru. (Michael Membrino 2002.) Jačina barijere za vodu zavisi od specifičnog sastava lipida kao i relativne proporcije holesterola, ceramida i slobodnih masnih kiselina. Ovi međucelijski lipidi kao i sebum, prirodni faktori održavanja vlažnosti, organske kiseline i joni utiču na kapacitet zadržavanja vode u stratum corneum.

7. EKSPERIMENTALNA ISTRAŽIVANJA

7.1. Eksperimentalne životinje: pacovi

U istraživanjima su upotrebljeni laboratorijski pacovi vrste *Rattus norvegicus*, aguti soj pacova linije DA kao model na kom je istraživana uticaj voda različitih bioloških svojstava na strukturu organa i tkiva. Pacovi 95 dana stari, su raspoređeni u šest kaveza, po jedan mužjak i jedna ženka. Parovi su konzumirali šest tipova voda koje su im davane u posebnim kavezima, u I kavezu strukturisanu vodu 18.2M Ω u II kavezu ta ista demineralizovana voda 18.2M Ω uz dodatak NaCl, u III kavezu oplemenjena voda sa dodatkom hidrolizovanih ugljeničnih nanomaterijala u IV kavezu voda sa Zlatibora, u V kavezu voda iz Beogradskog vodovoda i VI voda iz Zrenjaninskog vodovoda koja je zabranjena za piće i kuvanje. Životinje su gajene u istim uslovima i davana im je briketirana hrana istog hemijskog sastava od istog proizvođača. Na raspolaganju im je bila voda različitog hemijskog sastava i različitih struktura, tako da je svaki par životinja u jednom kavezu konzumirao isti tip vode do žrtvovanja. Nakon 18 dana koje su životinje provele u zajedničkom kavezu mužjaci i ženke su razdvojeni, sve vreme se merila zajednička potrošnja vode. Nakon razdvajanja mužjaci su zasebno gajeni 34 dana, što je ukupno 52 dana konzumiranja istog ispitivanog tipa vode, nakon čega su žrtvovani i uzeti su im uzorci: krvi, kože, mozak, nadbubreg i deo kosti. Ženke su se okotile u zasebnim kavezima, osim one koja je konzumirala oplemenjenu vodu iz I kaveza, koja je bila bez potomstva. Ženke su se okotile nakon 25 do 26 dana od početka eksperimenta, sve su bile sa različitim brojem potomaka, u II kavezu je okoćeno 2 potomka 1 mužjak i 1 ženka, u III kavezu okoćeno je 3 mužjaka i 3 ženke, u IV kavezu okoćeno je 5 ženki i dva mužjaka, u V kavezu okoćeno je 4 ženke i 5 mužjaka i u VI kavezu je okoćeno 1 ženka i 1 mužjak. U VI kavezu je ženka roditelj pojela žensko mladunče tako da je ostala sa jednim muškim potomkom. Nakon 35 dana zajedničkog života majki i potomaka u istom kavezu su razdvojeni u zasedne kaveze tako da su ženke ostale same a potomstvo je premešteno u posebne kaveze. Sve vreme je merena potrošnja vode u svakom

kavezu posebno. Nakon 26 dana od odvajanja majki i potomaka životinje su žrtvovane i od svake jedinke su uzimani uzorci za analizu kao kod mužjaka: krv, koža, nadbubrežna žlezda, mozak i kost.

7.2. Dobrovoljni ispitanici: ljudi

Istraživanje na ljudima je rađeno u Beogradu i u Zrenjaninu, gde je merena bioimpedanca i OMF kože dobrovoljnih ispitanika koji su konzumirali različite tipove voda sa njihovim mineralnim sastavima i strukturama. Ispitanicima u Zrenjaninu koji su pretežno pili vodovodsku vodu, koja je zabranjena za piće i kuvanje zbog povišenog sadržaja arsena, su mereni OMF kože unutrašnjeg dela desne podlaktice. Nakon merenja njih 15 je prešlo da pije druge vode dok je petoro ljudi nastavilo da pije Zrenjaninsku vodu. Ispitivanje OMF metodom je izvršeno slikanjem kože unutrašnjeg dela desne podlaktice, belom i polarizovanom svetlošću, potom je lepljivim hanzaplastom skidan deo stratum corneuma pa je onda opet slikana preostala koža kao i keratinociti zalepljeni na lepljivom hanzaplastu, ovaj postupak je ponovljen pa je skinut ceo corneum i deo stratum germinativuma pa je opet slikana koža kao i lepljiv hanzaplast sa slojem stratum granulozuma. Na kraju je lepljivim hanzaplastom uklonjen preostali sloj živih ćelija pa je vršeno snimanje kože sa stratum spinozum i delimično stratum bazale zatim je snimana koža bez lipidne barijere i slikani su slojevi stratum granulozum i stratum spinozum koji su se zadržali na lepljivom hanzaplastu. Nakon mesec dana ceo postupak je ponovljen sa tim da je veća grupa 15 ispitanika prešla na konzumiranje različitih voda od Zrenjaninske a 5 ispitanika je i dalje nastavilo da pije Zrenjaninsku vodu. Nakon 40 dana je uzet biopsijom uzorak kože sa unutrašnjeg dela podlaktice desne ruke kod tri ispitanika koji su menjali vodu za piće i jednog ispitanika koji je nastavio piti Zrenjaninsku vodu. Nakon 3 meseca je čitav postupak ponovljen sa time da je jedan ispitanik koji je prešao na flaširanu vodu počeo opet piti Zrenjaninsku vodu. Svaki ispitanik je tada nakon 5 meseci od početka eksperimenta ispitivan aparatom za merenje bioimpedance. Impedanca je merena kod svakog ispitanika pre uklanjanja hanzaplastom prvog sloja ćelija stratum corneuma i

nakon uklanjanja 3 sloja kada je na koži ostao samo deo stratum spinosum. U eksperimentima su učestvovalе osobe različite starosti od 23 do 96 godina i različitog pola 5 muškaraca i 15 žena.

Na ispitanicima u Zrenjaninu je rađena i serija eksperimenata merenja bioimpedance kože. Ispitivanje je vršeno na istim ispitanicima na kojima je rađeno OMF snimanje. Provođena je ista procedura za ispitivanje bioimpedance kao i procedura za snimanje OMF. Snimana je intaktna koža kod ispitanika obe grupe, koja je pila Zrenjaninsku vodu kao i grupe koja je pila flaširane tipove voda. Potom je snimanje ponovljeno nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice. Obe grupe su ispitivane sa serijom merenja u frekventnom opsegu od 50 Hz do 10 kHz i inicijalnim pobudnim naponom od 5V. Bioimpedanca je merena na intaktnoj koži ljudi koji su pili Beogradsku vodu pod istim uslovima kao i ispitanici iz Zrenjanina.

8. REZULTATI I DISKUSIJA

8.1. Rezultati teorijskih istraživanja

Sastav vode znatno varira u zavisnosti od geoloških uslova, sadrži male količine gasova, mineralnih i organskih materija prirodnog porekla. Ukupna koncentracija mineralnih materija koje su rastvorene u vodi dobrog kvaliteta je u stotinama $\mu\text{g/l}$. Voda može sadržati i nepoželjne materije, dok poželjne mogu biti u većim ili manjim količinama što je polazište za uspostavljanje regulative za ocenjivanje kvaliteta vode. Maksimalno prihvatljive koncentracije neorganskih i organskih materija kao i mikroorganizama su internacionalne i mogu obezbediti sigurnu pijaću vodu. Mineralne materije utiču na odvijanje fizioloških funkcija kao i stanje čitavog organizma, tako da njihov veći ili nedovoljni unos u dužem vremenskom periodu mogu da ugroze zdravlje. Najveća količina ovih materija se obezbeđuje ishranom, ali mineralne materije u vodi su okružene hidratacionim sferama, usmeravaju molekule kiseonika prema katjonima i atome vodonika prema anjonima i mogu dodatno povećavati ili smanjivati koncentracije poželjnih i toksičnih elemenata i jona. Voda često može sadržati minimalne koncentracije esencijalnih minerala (i drugih materija kao što su karbonati) koje poseduju protektivne efekte na organizam. Glavna pažnja je usmerena ka toksičnim efektima konstituenata vode, pa se malo pažnje posvećuje njihovim protektivnim efektima.

Biološki parametri u pijaćoj vodi su od velikog interesa. Legislativa sadrži brojne mikrobiološke testove koje se sprovode za minimalne analize ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija, aerobnih termofilnih bakterija, fekalnih streptokoka, sulfit redukujućih sporulacionih bakterije, parazitskih mikroorganizama. Kompletna mikrobiološka analiza sadrži testove za prisustvo salmonela, patogenih stafilokoka, fekalnih bakteriofaga, enterovirusa, helminata, algi, spora gljiva. Mnogo vrsta patogena mogu da prežive u vodi, i sposobne su da zadrže svojstvo da inficiraju dugačak vremenski period i bivaju privremen član vodenog sistema. Voda je medijum za širenje raznih infekcija ne

samo u prošlosti nego i sada pa je interes za studije o vrstama i brojnosti patogenih, kao i ostalih mikroorganizama u vodi veoma značajan i potrebno je njihovo efikasno merenje eliminacija ili kontrola u promenljivim uslovima njihovog postojanja.

Voda nije kontinualan fluid bez strukture, hemijski uniformna sa dielektričnim svojstvima, nego se voda prilagođava ili adaptira prisustvu rastvoraka i površina u različitom stepenu se udružuju formirajući strukture i poseduje svoju dinamiku obrazovanja i razgradnje molekularnih struktura svojih molekula što je praćeno promenom dijamagnetskih i paramagnetskih osobina. Asocijacija molekula vode daje specijalna svojstva vodi što je čini specijalnom, pogodnom kao okolinu. Život se obično smatra da je zasnovan na molekulu ugljenika ali biološka svojstva vode su u osnovi života. Voda kao naelektrisan molekul poseduje oblasti koje su naelektrisane pozitivno i negativno. Kao rezultat polarnosti molekula vode se između susednih molekula formiraju vodonične veze čija su svojstva klesično, elektrostaticko privlačenje i kvantne prirode. Pojedinačne vodonične veze su slabe ali kolektivno čine vodu veoma stabilnom i koja je sa svojim neobičnim fizičkim i hemijskim svojstvima je vitalna za živa bića. Najvažnija su svojstva vode kao: rastvarača, hemijska aktivnost, gustina, termalna svojstva koja su zavisna od vodoničnih veza. Voda može da rastvara hidrofilne supstance i jone takođe može da razdvaja kovalentno vezane molekule jer mogu da formiraju vodonične veze. Molekularni aspekt hidrofobne i hidrofilne hidratacije kao i njihova brzina su od ključnog značaja za funkcionisanje biopolimera. Voda u živim bićima je komponenta ćelije i deluje kao metabolit u svim metaboličkim reakcijama u ćeliji, takođe je esencijalna kao transportno sredstvo za konformaciju bioloških molekula i obrazovanje bioloških struktura. Molekuli vode se adaptiraju da bi ispunili životom biopolimere, kroz raznovrsan kompleks hidratacionih mehanizama. Mađarski naučnik Sent Georg ju je nazvao matricom života zbog njene mogućnosti da rastvara polarna jedinjenja, sposobnosti da formira vodonične veze, amfoterne prirode je zbog čega je pozadina za aranžiranje molekularnih komponenti. Voda nije jednostavno masa molekula koji individualno

interreaguju jer vodonične veze molekula vode razvijaju kompleksne geometrijske strukture. Molekuli vode oponašaju četverostranu trodimenzionalnu strukturu (tetraedar) i formiraju strukture koje poseduju pseudo kristalan oblik, tako da voda poseduje pseudokristalno stanje kao tečnost. Voda je problem i rešenje za interakcije u živim bićima. Asocijacije molekula vode neposredno do jona su raskidane i molekuli vode se orijentišu u električnom polju jona. Biološka vrednost vode se obezbeđuje i uklanjanjem patogenih memorija vode koje se obrazuju u interakciji sa molekulima koje se nalaze u okruženju molekula vode. Relativna koncentracija individualnih konstituenata utiču na odvijanje fizioloških funkcija u organizmu u zavisnosti od njihove različite koncentracije i utiču na asocijaciju molekula vode, veličinu i koncentraciju klastera u njoj. Voda zbog svoje prirode može generisati male aktivne klasterne i makroskopske skupine koje ne mogu preneti informacije na različitim nivoima i otrežano prolaze kroz ćelijske membrane i hidratišu molekule. Energetika i dinamika interakcije vode sa proteinima je odlučujući faktor u procesu protein ligand prepoznavanju. Molekuli vode posreduju ili su most u interakciji DNA i proteina preko njihovog povezivanja vodoničnim vezama.

Hemijska priroda vode, njen hemijski sastav i prisustvo organskih materija kao i živih bića određuju strukturu, funkciju i hidrataciju intra i ekstracelularnih molekula i njihovih skupova. Biomolekuli u ćeliji ne samo da funkcionišu u vodi nego i aktivno interreaguju sa njom za sopstveno strukturno formiranje i funkcionisanje. Od izuzetnog je značaja nadgledanje hemijskih i bioloških parametara vode da bi se odredio njihov status i određivanje njenog tretmana i dekontaminacije. U jednačinu za kvalitet vode pored hemijskog i biološkog kvaliteta je neophodno uneti i monitoring kao i popravljavanje strukturnih osobina vode sa obzirom na mrežu vodoničnih veza kojima su povezane molekule vode njenu dinamiku jer su veoma značajni u dugom vremenskom periodu za odvijanje bioloških funkcija.

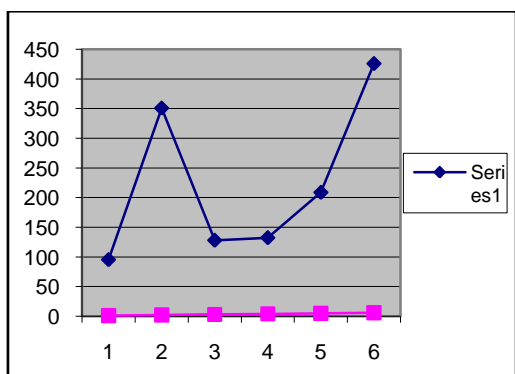
Voda sa svim svojim osobinama od kojih zavisi život i funkcijama koje obavlja u živim bićima učestvuje kao determinanta starenja. Tokom života

jedinke od njenog nastanka do smrti ne samo da se smanjuje ukupna količina vode u njemu nego se i menja raspored i vrste voda u njegovim tkivima. Sa vremenom se u organizmu menjaju odnosi unutar ćelijske i ekstraćelijske vode da bi se nakon 1.5 godine od rođenja njihov procenat izjednačio a onda do kraja života količina unutarćelijske vode raste dok se ukupna količina vode u organizmu smanjuje. Vremenom se menjaju i odnosi vezane i slobodne vode, koja može da se razmenjuje, transportuje hranljive i štetne materije omogućuju hidrataciju ili jednostavno obezbeđuje komunikaciju, količina vezane vode se povećava. Dinamika molekula vezane vode je manja od one u bulk stanju tako da se ona teže izmenjuje, duže zadržava i ispoljava štetno dejstvo na molekul. Kod umerenih i velikih daljina struktura vode je glavni faktor za biomolekule. Voda za piće se uobičajeno sastoji od pojedinačnih molekula dimera i trimera kojih je 62% i malih, srednjih i velikih klastera 38% tako da predstavlja faktor starenja. Struktura vode se u organizmu održava da bi omogućila optimalne biološke funkcije i pre svega mogla da se brzo izmenjuje, sa starenjem organizam gubi kontrolu nad ovim procesom zbog raznih nepovoljnih faktora spoljašnje sredine, genetskog programa, infekcija i velike energetske cene za održavanje molekula vode u stanju optimalne uređenosti. Genetski i stohastički mehanizmi koji uslovljavaju progresivno otkazivanje mehanizma homeostaze, gubitak fizioloških funkcija ćelija i tkiva, smanjenja proliferacionog kapaciteta ćelija obuhvataju i molekule vode koja zajedno sa biološkim molekulima ostvaruju sve životne funkcije. Jonski sastav vode je značajniji od ukupne količine jona i reprezent je organizovanosti vode i njenog paramagnetizma i dijamagnetizma. Organizovanost molekula vode se progresivno smanjuje sa starenjem i raste energetska cena njenog održavanja. Poremećaj komunikacije između ćelija i njenih delova ja svakako i rezultat promene organizovanosti molekula vode kao i njenih svojstava u živom biću. Poremećaji komunikacije u organizmu se manifestuju kao: hormonalna promena, narušavanje mehanizma razmnožavanja ćelija, narušavanje genetske kontrole i kao posledica svega smanjena otpornost na stres, gubitak fizioloških funkcija i disfunkcionalnost koja vodi u smrt.

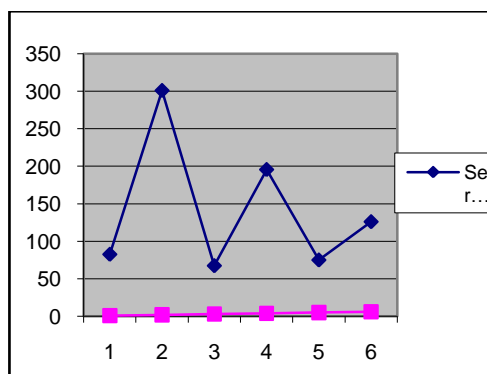
8.2. Rezultati eksperimentalnih istraživanja

8.2.1. Eksperimentalne životinje

Biohemijske analize su obavljene na 31. jedinki nakon žrtvovanja. Uzorci za hematologiju su uzorkovani u predviđene mikrokontejnere sa antikoagulansom K3 EDTA, a za biohemijske analize u epruvete sa inertnim separacionim gelom. U biohemijskim analizama, obavljeno je određivanje nivoa serumske: glukoze, uree, kreatinina, ukupnog holesterola, triglicerida, ukupnih proteina, albumina, ukupnog i direktnog bilirubina, AST, ALT, Fe, Ca, P, Mg, K, Na, Cl. Mora se uzeti u obzir da je veći deo seruma imao prisutnu hemolizu koja se može dovesti u vezu sa sipanjem uzorkovane krvi brizgaljkom, tako da se prilikom njenog istiskivanja pod pritiskom u epruvetu razaraju crvena krvna zrnca što dovodi do prebojavanja seruma u svetlo crvenu boju usled oslobađanja hemoglobina kao i drugih elemenata iz citosola eritrocita. Hemolizovan serum nije idealan supstrat za egzaktnu biohemijsku analitiku, jer može uticati na neke biohemijske parametre tokom određivanja njihovog nivoa i može uglavnom pokazati elevaciju njihovog nivoa, prvenstveno kalijuma, LDH, AST, ALT, AP, bilirubina, Fe. Na sledećim dijagramima (10) i (11) su prikazani rezultati biohemijskih analiza mužjaka, ženki i njihovog potomstva. Prikazana su odstupanja od normalnih vrednosti parametara krvi, ordinata u procentima i njihova zavisnost od tipa vode za piće koja im je bila na raspolaganju apscisa.

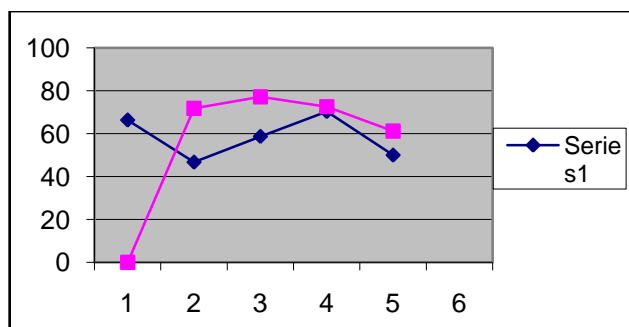


Dijagram 6. Vrednosti AST za mužjake koji su pili različite tipove voda.



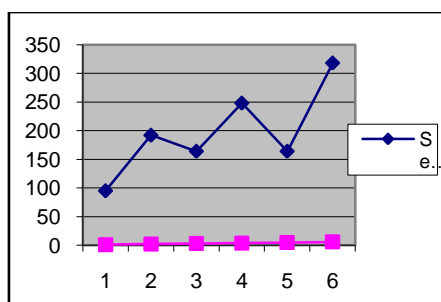
Dijagram 7. Vrednost AST za ženke koje su pile različite tipove voda.

Vrednost odstupanja za AST kod njihovog potomstva je prikazana na narednom dijagramu (12) gde je na ordinati prikazano odstupanje AST od normalnih vrednosti a na apscisi tipa vode koji su pili njihovi roditelji i koji su njima na raspolaganju.

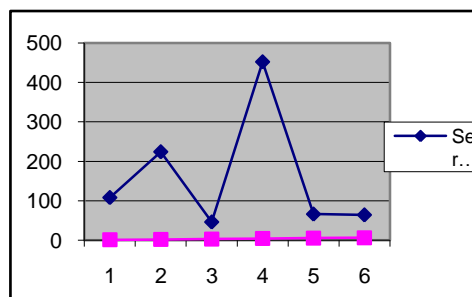


Dijagram 8. odstupanje AST kod potomaka jedinki koji su pili određene tipove voda. Roze bojom su predstavljena odstupanja AST kod ženskog potomstva, odstupanje muškog potomstva je predstavljeno plavom bojom.

Sledeći parametar koji znatno odstupa kod svih grupa jedinki je ALT. Vrednosti odstupanja kod mužjaka i ženki su predstavljeni na sledećim dijagramima (13) i (14).

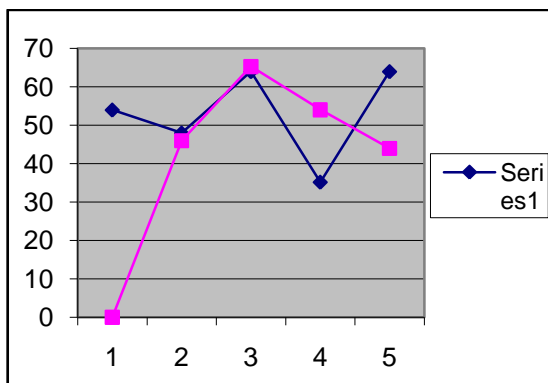


Dijagram 9. vrednosti ALT u zavisnosti od tipa vode za mužjake.



Dijagram 10. vrednosti ALT u zavisnosti od tipa vode za ženke.

Vrednosti odstupanja ALT od normalnih vrednosti za potomstvo je predstavljeno na dijagramu (15) gde se uočava zavisnost odstupanja od tipa vode.



Dijagram 11. vrednosti odstupanja ALT od normalnih vrednosti kod potomstva gde su crvenom bojom predstavljene ženske a plavom bojom muško potomstvo. Za druge parametre, od normalnih vrednosti nisu odstupale sve jedinice u zavisnosti od voda koje su pile ni kod mužjaka i ženki ni kod njihovog potomstva.

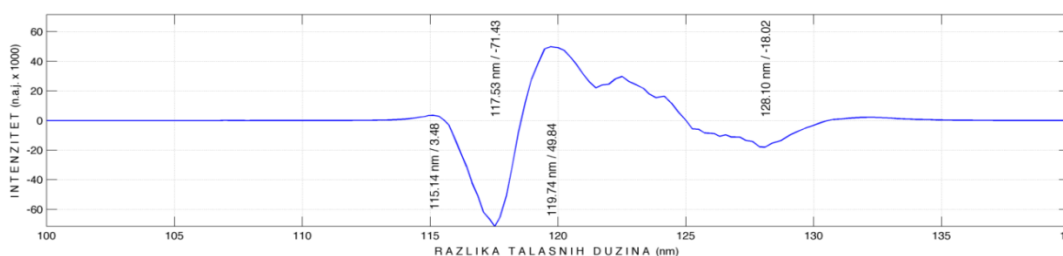
8.2.2. Ispitanici dobrovoljci

8.2.2.1. Optomagnetna spektroskopija

Slojevi kože su sastavljeni od različitih vrsta ćelija i ekstracelularnih molekula koji pokazuju najrazličitije tipove prostiranja svetlosti. Metodom OMF snimana je koža unutrašnje podlaktice grupe ispitanika, različite dobi i pola koji su konzumirali vodu iz Zrenjaninskog vodovoda. Zatim je jedna grupa ispitanika počela da konzumira različite vode od Zrenjaninske vode pa je i njihova koža obrađena OMF metodom. Snimana je površina kože podlaktice, zatim je flasterom uklanjan prvi sloj kože pa je snimana koža nakon skidanja flastera kao i sam flaster, zatim je to ponovljeno još dva puta da bi se snimio svaki sloj kože od površinskog sloja keratinocita do bazalnih ćelija sa lamelarnim strukturama između različitih slojeva keratinocita. Ovim snimanjem je karakterisana zarobljena voda između lipidnih membrana koje se nalaze između keratinocita, kao i vezana i slobodna voda u donjim živim slojevima kože koje su bogate vodom.

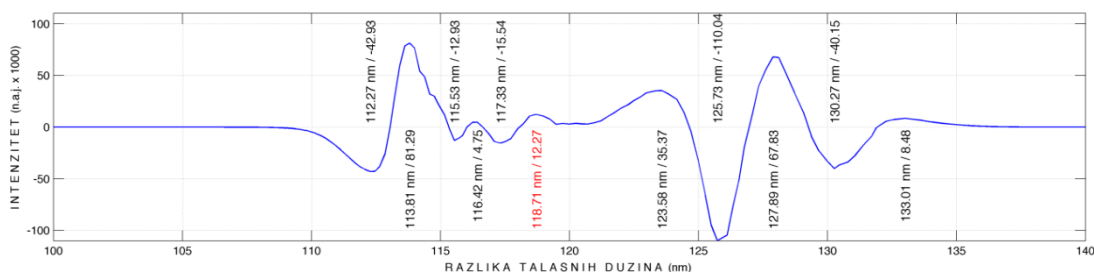
Dijagrami OMF kože podlaktice pre i nakon uklanjanja slojeva orožnalih ćelija, kao i flastera nakon uklanjanja slojeva pokožice, sa slojevima orožnalih ćelija i lipidnih lamela između njih, kod ispitanika koji su konzumirali uglavnom Zrenjaninsku vodu.

Na dijagramima su predstavljene OMF kože ispitanice (53g) koja je pila samo Zrenjaninsku vodu. Na dijagramu (16) su predstavljene razlike u intezitetu talasnih dužina svetlosti dobijenih sa intaktne kože, nultom sloju pre skidanja prvog sloja pokožice. Razlike inteziteta svetlosti na određenim talasnim dužinama predstavljaju interakcije upadne svetlosti sa valentnim elektronima molekula vode koje ukazuju na njihove magnetne osobine koje su 10^4 puta osetljivije od električnih svojstava i stoga bliže kvantnim osobinama vodonične veze i zato preciznije oslikavaju osobine vodoničnih veza vode i time njihova svojstva i dinamiku razgradnje i stvaranja klastera vode u interakciji sa rastvorcima u njoj kao i interakcije molekula vode sa njihovim okruženjem.



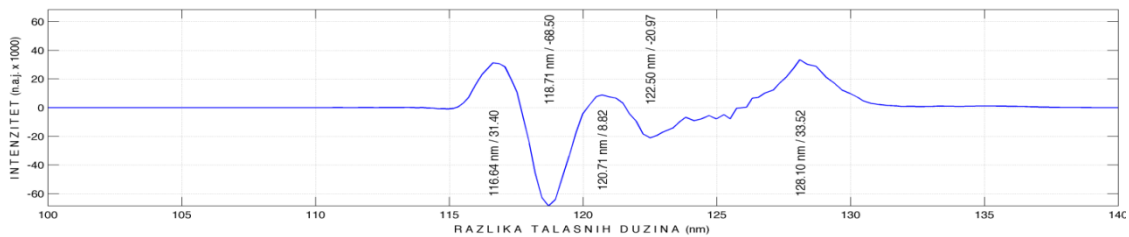
Dijagram 12. prikazuje OMF površine kože unutrašnjeg dela podlaktice sa karakterističnim pozitivnim i negativnim pikovima.

Izdvajaju se negativni pik na talasnoj dužini 117.63 nm sa intezitetom - 71.43 i pozitivni pik na 119.74 nm sa intezitetom od 49.84 razlike talasnih dužina. Nakon uklanjanja prvog sloja pokožice, kod iste ispitanice snimak flastera OMF metodom je pokazao dijagram (17) sa različitim intezitetima svetlosti na određenim talasnim dužinama svetlosti.



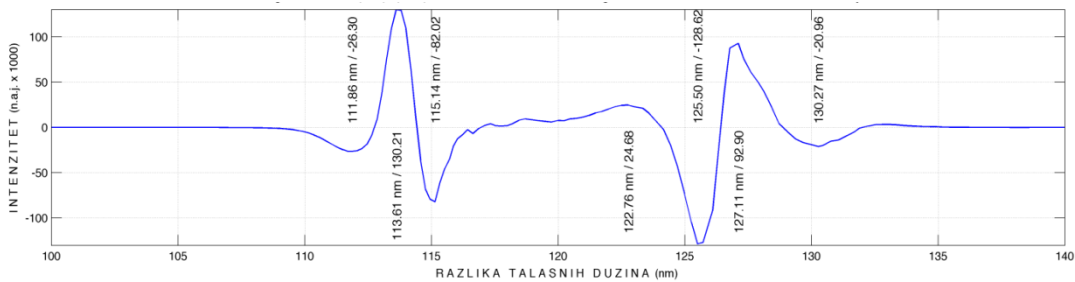
Dijagram 13. OMF flastera sa uklonjenim slojem keratinocita i lamelarnom strukturom između njih pokazuje karakteristične: dva pozitivna pika na 113.81nm sa intezitetom 81.20, drugi glavni pik na 127.89 nm sa intezitetom 67.63 i jedan negativan na talasnoj dužini 125. 73 nm sa intezitetom od -110.04.

Posle uklanjanja prvog sloja pokožice, flasterom, snimana je koža na podlaktici sa kog je uklonjen prvi sloj pokožice i dobijen je karakterističan OMF dijagram (18) koji je sa drugačijim za njega karakterističnim pikovima razlika inteziteta svetlosti.



Dijagram 14. je prikazan OMF kože podlaktice nakon uklanjanja prvog sloja keratinocita sa karakterističnim negativnim pikom na talasnoj dužini od -118.71 nm sa razlikom u intezitetu od 88.50. Karakterističan je pozitivni pik na talasnoj dužini od 128.10 nm sa razlikom od 33.52.

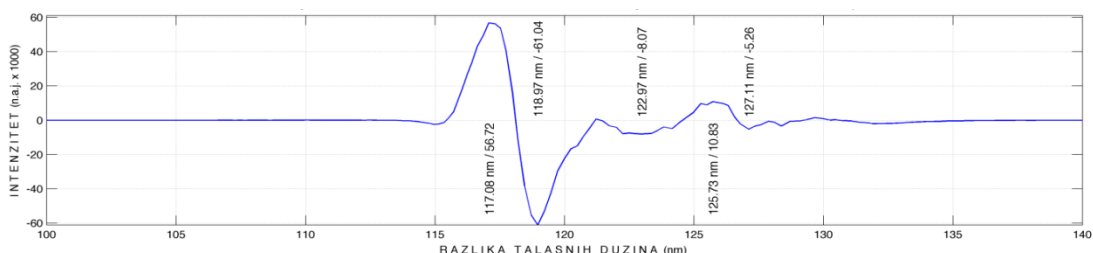
Nakon skidanja drugog sloja pokožice flasterom sniman je OMF ostataka keratinocita i lamelarnih struktura, dijagram (19), sa karakterističnim za vodu u ovom sloju svojstvima.



Dijagram 15. OMF flastera sa karakterističnim pikovima pozitivnim na talasnoj dužini od 113.61 nm i razlikom u intezitetu od 130.21, manjim negativnim pikom na talasnoj dužini od 115.14 nm sa razlikom u intezitetu svetlosti od -82.02, izrazitim negativnim pikom na 125.50 nm sa razlikom u inteziteu od -128.62 i odmah iza njega pozitivnim pikom na 127.11 nm sa razlikom u intezitetu od 92.90.

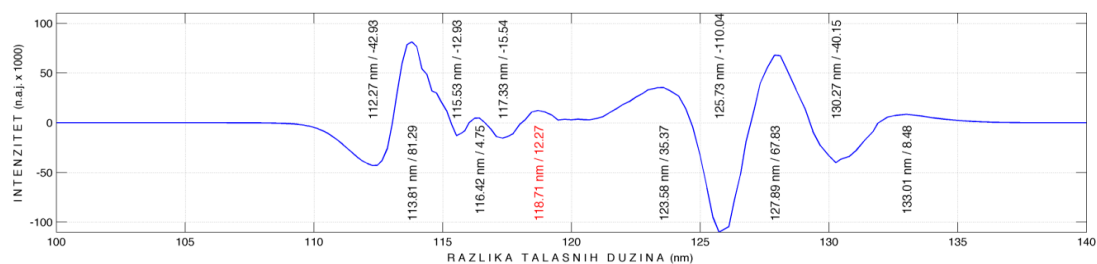
Nakon uklanjanja drugog sloja pokožice je snimana OMF metodom koža na istom mestu i na dijagramu (20) je prikazan OMF kože nakon uklanjanja dva sloja pokožice. Dobijeni dijagram je veoma sličan dijagramu OMF kože nakon

uklanjanja prvog sloja pokožice sa nešto nižim vrednostima pikova na sličnim talasnim dužinama.



Dijagram 16. OMF kože unutrašnjeg dela podlaktice poseduje slične karakteristike kao OMF kože nakon uklanjanja prvog sloja pokožice. Karakterističan je prvi pozitivni pik na talasnoj dužini od 117.08 nm sa intezitetom od 56.72 i izrazit je negativan pik na talasnoj dužini od 118.97 nm sa intezitetom od -61.04.

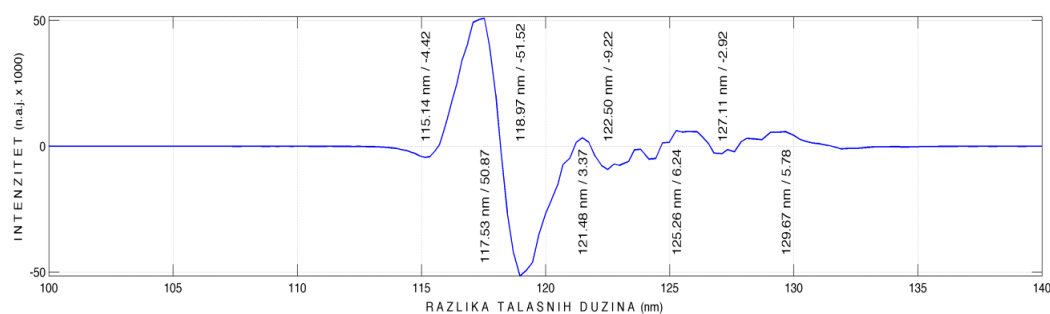
Potom je uklonjen treći sloj pokožice i dobijen je OMF dijagram (21) za sloj pokožice koji je ostao zalepljen za flaster sa većom količinom vode u ovom sloju kao i izmenjenim svojstvima vode. Svojstva vode trećeg sloja pokožice pokazuju slična svojstva kao i drugi sloj pokožice koji je zaostao na flasteru nakon skidanja. Nedostaje drugi glavni negativni pik i vrednosti pikova dijagrama su niže što ceo dijagram čini znatno ravnijim od OMF dijagrama dobijenog sa drugog flastera.



Dijagram 17. OMF trećeg sloja pokožice koji je ostao zalepljen za flaster nakon trećeg skidanja sa površine kože.

Karakteristično je da je manja vrednost glavnog pozitivnog pika na talasnoj dužini od 113.81 nm i intezitetom od 81.29. Upadljivo je odsustvo negativnog pika na talasnoj dužini od 115.14 nm. Glavni prvi negativni pik na 125.73 nm sa intezitetom od -110.04 je glavni dominantan pik nešto je pomeren ka višoj talasnoj dužini i ima nešto manji intezitet od pika sa OMF drugog flastera. Karakteristični drugi pozitivni glavni pik na talasnoj dužini od 127.89

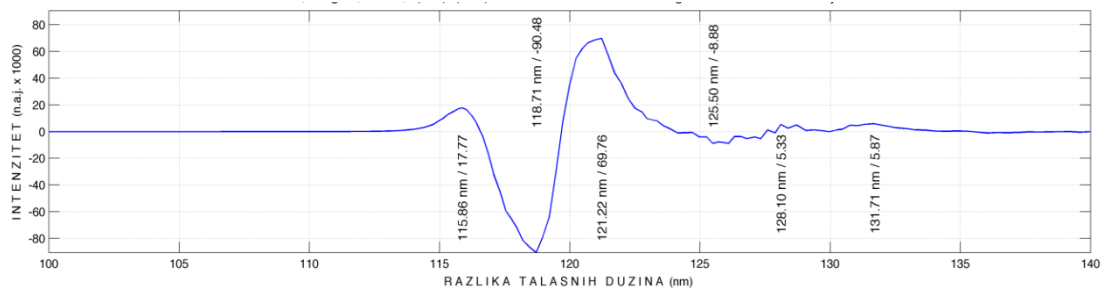
nm sa intezitetom od 67.83 je nešto pomeren ka većoj talasnoj dužini i nešto manjom razlikom u intezitetu u odnosu na OMF sloja pokožice koji je skinut sa drugim flasterom. Zatim je urađen OMF dijagram (22) kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice. Dobijeni OMF dijagram je veoma sličan OMF dijagramu kože nakon skidanja drugog sloja pokožice. Upadljivo je prisustvo više malih pozitivnih i negativnih pikova u ovom dijagramu kao i nešto manjim vrednostima pikova.



Dijagram 18. OMF dijagram kože nakon uklanjanja tri sloja pokožice poseduje veoma slične vrednosti pikova kao i sloj kože nakon uklanjanja drugog sloja pokožice.

Za OMF kože posle uklanjanja trećeg sloja pokožice je karakteristično postojanje dva izrazita pika, pozitivnog na talasnoj dužini od 117.53 nm i vrednosti pika od 50.87 i glavnog negativnog pika na talasnoj dužini od 118.97 nm i vrednošću - 51.52.

Na sledećim dijagramima su predstavljene OMF ispitanice (54g) koja je pila uglavnom Zrenjaninsku vodu a zatim posle slikanja počela da pije komercijalne vode (različite od Zrenjaninske vode) da bi nakon 36 dana bila opet slikana i na osnovu toga dobijen i OMF dijagrami. Na dijagramu (23) su predstavljene razlike u intezitetu talasnih dužina svetlosti dobijenih sa intaktne kože, nultom sloju pre skidanja prvog sloja pokožice kao i kod prethodne ispitanice. Dobijeni OMF je upadljivo sličan kao kod prethodne ispitanice sa nešto pomerenim pikovima i nešto većim vrednostima pikova.



Dijagram 19. OMF ispitaniče od 54g intaktnog sloja kože sa dva karakteristična pika: negativnim na talasnoj dužini od 118.71 nm i intezitetom od -90.48 i pozitivnim pikom na talasnoj dužini od 121.22 nm i intezitetom od 69.76.

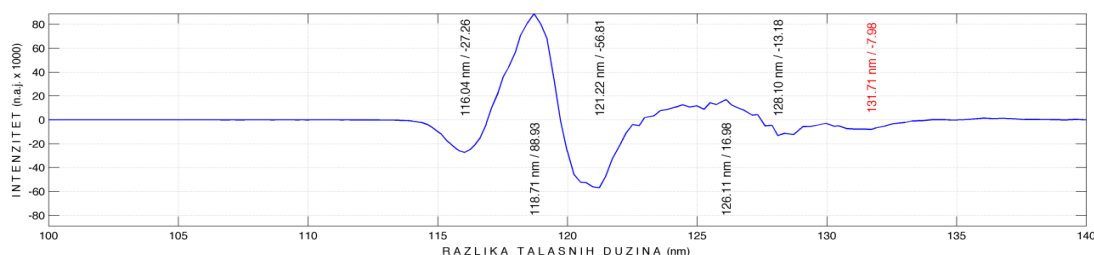
Nakon uklanjanja prvog sloja pokožice sa unutrašnje strane podlaktice dobijen je OMF dijagram (24) flastera sa ostacima pokožice koji su pokazali različite intezitete svetlosti na karakterističnim talasni dužinama slično prethodnoj ispitaniči.



Dijagram 20. OMF prikazuje svojstva vode u keratinocitima i lipidnim lamelarnim strukturama koji su se zalepili za flaster nakon skidanja prvog sloja pokožice.

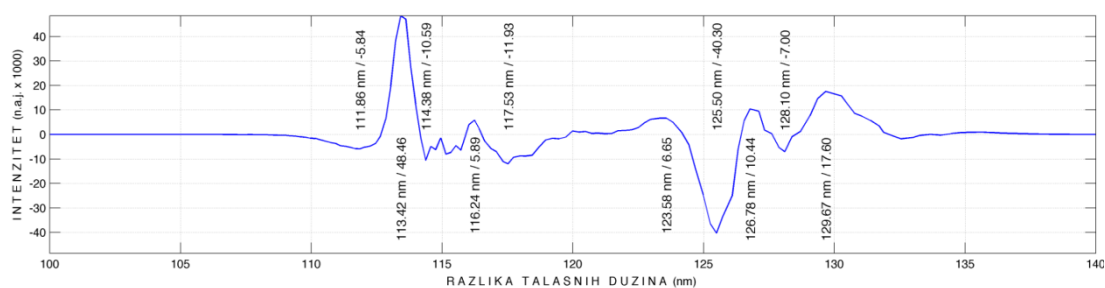
Dijagram poseduje slične pikove kao kod prethodne ispitaniče s time da su inteziteti pikova kod ove ispitaniče nešto niži. Za ovaj sloj kože su karakteristični pozitivni pik na talasnoj dužini od 113.61 nm sa intezitetom pika od 61.35 i negativan pik na talasnoj dužini od 125.50 nm i intezitetom od -76.64. Neposredno iza negativnog pika je drugi glavni pozitivni pik na talasnoj dužini od 127.11 nm i intezitetom od 42.40. Posle uklanjanja prvog sloja pokožice slikana je koža unutrašnjeg dela podlaktice i dobijen je OMF dijagram (25), koji je veoma sličan OMF dijagramu kože bez skidanja pokožice. Karakteristično je da je prvi negativni pik mali, koji je pomeren ka manjoj talasnoj dužini dok dominira glavni pozitivni pik koji je na talasnoj dužini malog pika OMF kože bez

uklanjanja prvog sloja pokožice. Zanimljivo je da je umesto širokog negativnog pika na dijagramu (25) pozitivni široki pik duplo većeg inteziteta.



Dijagram 21. OMF kože nakon uklanjanja prvog sloja pokožice.

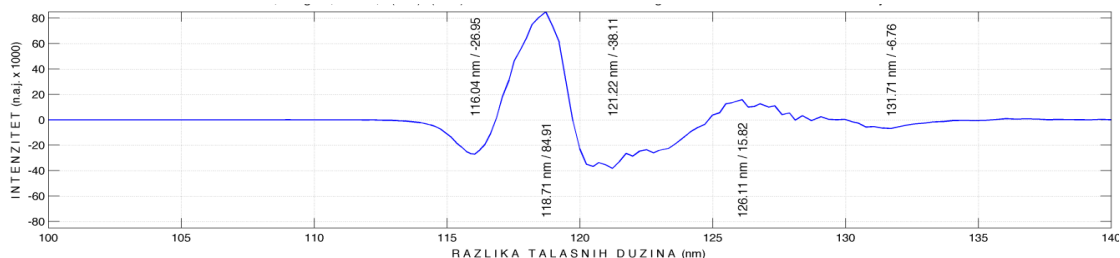
Primetno je postojanje dominantnog glavnog pozitivnog pika na talasnoj dužini od 118.04 nm sa intezitetom od 88.93 i odmah iznad njega negativnog pika na talasnoj dužini od 121.22 nm i intezitetom od -56.81. Dalje je uklonjen drugi sloj pokožice sa istog mesta kože unutrašnjeg dela podlaktice. Na Dijagramu (26) je pretstavljen OMF sloja pokožice koji je ostao zalepljen za flaster. Uočljivo je da su dijagrami oba uklonjena sloja epidermisa upadljivo slični po talasnim dužinama na kojima se javljaju pikovi, dok je vrednost pikova manja na dijagramu drugog sloja pokožice kod glavnih pikova dok su sporedni pikovi na nekim talasnim dužinama sa većim intezitetima.



Dijagram 22. OMF drugog sloja pokožice unutrašnjeg dela kože podlaktice sa pozitivnim prvim glavnim pikom na talasnoj dužini od 113.42 nm i intezitetom od 48.46, negativnim prvim glavnim pikom na talasnoj dužini od 125.50 nm i intezitetom od -40.30 kao i sporedni pozitivni pik na talasnoj dužini od 129.67 nm i intezitetom od 17.60 nm.

Nakon uklanjanja dva sloja pokožice snimana je koža sa istog dela unutrašnje podlaktice i dobijen je OMF dijagram veoma sličan OMF dijagramu kože nakon uklanjanja prvog sloja pokožice (27). Na OMF dijagramu ovog sloja kože se mogu uočiti nešto manje vrednosti inteziteta pikova na istim talasnim

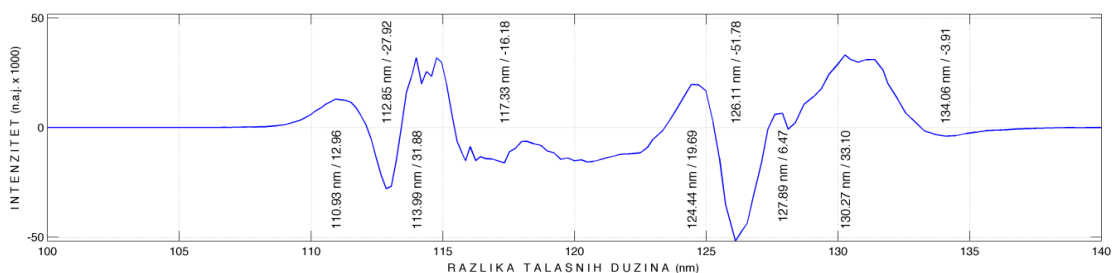
dužinama kao i OMF sloja kože posle uklanjanja prvog sloja kože. Dijagram OMF (27) kože sa koje su uklonjena dva sloja pokožice poseduje nešto ravniji dijagram i kod njega otsustvuju mali pikovi za razliku od dijagrama kože sa koje je uklonjen jedan sloj kože.



Dijagram 23. OMF dijagram kože nakon uklanjanja dva sloja pokožice pokazuje prvi glavni pozitivni dominantni pik na talasnoj dužini od 118.71 nm i intezitetom od 84.91. Iza njega je prvi glavni negativni pik na talasnoj dužini od 121.22 nm inteziteta kao i karakterističan širok zupčasti pik na talasnoj dužini 120.11 nm inteziteta 15.62.

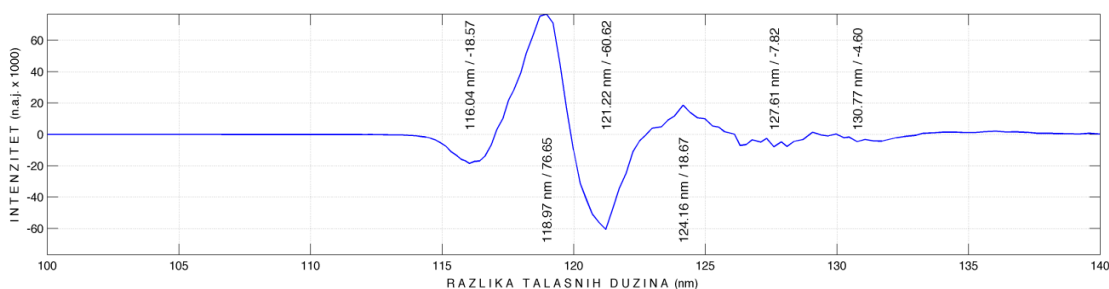
Potom je uklonjen sa istog mesta kože, unutrašnjeg dela podlaktice, naredni sloj pokožice da bi se dobio OMF dijagram sloja pokožice koji je ostao zalepljen za flaster (28). Karakterisanjem ovog sloja pokožice se omogućuje dobijanje informacija o stanju vode u dubljim živim ćelijama epidermisa.

OMF dijagram ovog sloja kože za razliku od prethodna dva dijagrama pokožica se karakteriše drugačijom dinamikom i svojstvima molekula vode na što ukazuje pojava drugačijih pikova različitog intenziteta na približno istim talasnim dužinama.



Dijagram 24. OMF dijagram sloja pokožice koji je zaostao zalepljen za flaster tokom trećeg skidanja pokožice sa kože unutrašnjeg dela podlaktice.

Za dijagram trećeg sloja pokožice su karakteristična dva negativna i dva pozitivna pika. Prvo sledi mali pomoćni široki pozitivni pik na talasnoj dužini od 110.93 nm inteziteta 12.96, zatim drugi glavni negativni pik na talasnoj dužini od 112.85 nm i intezitetom od -27.92, potom drugi glavni pik na talasnoj dužini od 113.99 nm i intenziteta 31.88, zatim sledi mali pomoćni pozitivan pik na talasnoj dužini od 124.44 nm i intenzitetom od 19.69, odmah iza ovog pika je prvi glavni negativni pik na talasnoj dužini od 126.11 nm i intenzitetom od 51.78 i potom sledi glavni prvi pozitivan pik koji je širok i na vrhu zaravnjen na talasnoj dužini od 130.27 nm i intenziteta 33.10. Potom je snimana koža nakon uklanjanja tri sloja pokožice i dobijen je OMF dijagram (29) sa nešto manjim pozitivnim glavnim pikom na istoj talasnoj dužini nego kod OMF dijagrama kože sa koje je skinuto dva sloja pokožice. Potom je karakterističan za ovaj OMF dijagram prvi glavni negativni pik koji je znatno veći od OMF dijagrama dobijenog od kože sa kojeg je skinuto dva sloja pokožice. Ostali pikovi su slični kod oba od ovih dijagrama.



Dijagram 25. OMF dijagram kože nakon skidanja tri sloja pokožice je sličan sa OMF dijagramom kože posle skidanja dva sloja pokožice.

Odlikuju ga nešto niži intenzitet za drugi glavni negativan pik koji je na talasnoj dužini od 116.04 nm i intezitet -18.57. Prvi glavni pozitivni pik je na talasnoj dužini od 118.97 nm i inteziteta 76.65. Zatim sledi prvi glavni negativni pik na talasnoj dužini od 121.22 nm sa intezitetom od 69.82. Potom odma sledi drugi pozitivan širi pik na talasnoj dužini od 124.16 nm i intezitetom od 18.67 i potom slede dva negativna pomoćna mala pika.

Zatim je ova ispitanica počela da pije samo flaširane tipove voda da bi ista procedura bila ponovljena nakon trideset šest dana vremena potrebnog za

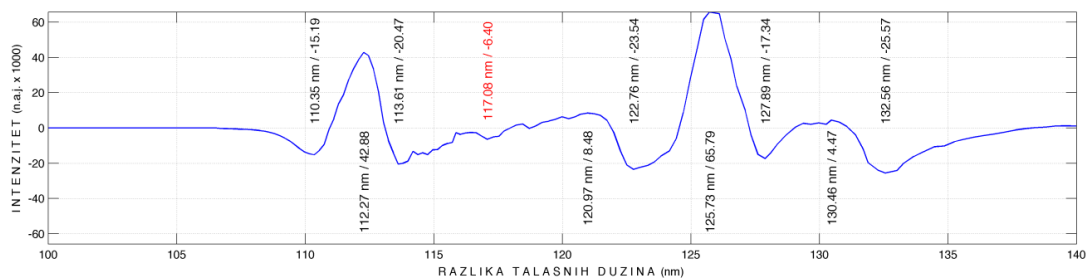
potpuno obnavljanje čitave pokožice od bazalnog sloja ćelija do površinskih keratinocita koji se ljušte sa površine kože.

Na (30) dijagramu su pretstavljene razlike u intezitetu talasnih dužina svetlosti dobijenih sa intaktne kože, nultom sloju pre skidanja prvog sloja pokožice kao prilikom prvog snimanja kod iste ispitanice. Dobijeni OMF dijagram (29) je upadljivo različit u odnosu na prethodno slikanje iste ispitanice, nedostaje mali glavni drugi pozitivni pik dok je glavni negativni pik malo pomeren ka većoj talasnoj dužini i duplo je manjeg inteziteta a veći pik duplo manji zupčast i razvučeniji.



Dijagram 26. Na OMF dijagramu površinskog intaktnog sloja kože unutrašnjeg dela podlaktice je karakterističan prvi glavni negativni pik na talasnoj dužini od 117.99 nm i intezitetom pika od -46.50 koji se prvi javlja i glavni pozitivni zupčasti pik na talasnoj dužini od 119.74 nm i intezitetom pika od 34.79. Prisutan je i niz malih pomoćnih pikova od kojih je najveći drugi negativni pik na talasnoj dužini od 122.76 nm i intezitetom od 15.27. Prvi glavni pozitivni pik je isto duplo manji nego kad je ispitanica pila Zrenjaninsku vodu. Zatim sledi mali negativni pik i drugi glavni pik koji nedostaje kod OMF dijagrama sa ranijeg ispitivanja. Zatim slede tri mala pomoćna pozitivna pika za razliku od prethodnog OMF dijagrama kad su bila prisutna 2 mala pomoćna negativna pika.

Potom je skinut prvi sloj pokožice, sa unutrašnjeg dela podlaktice, koji je karakterisan OMF metodom i dobijen je za njega karakterističan OMF dijagram (31). Dobijeni dijagram je upadljivo različit od onoga koji je dobijen snimanjem intaktne kože dok je ispitanica konzumirala Zrenjaninsku vodu. Očigledno je da su svi pikovi ovog OMF pomereni ka manjoj talasnoj dužini i da su pikovi nešto niži u odnosu na prvu seriju snimanja. Posebno je primetno da se umesto izrazitog negativnog pika kod ranijeg snimanja sada pojavljuje približno iste vrednosti izraziti pozitivan pik.



Dijagram 27. Na dijagramu je pretstavljen OMF prvog sloja pokožice koji je skinut sa intaktne kože. Primetno je da je drugi glavni pik širi i nalazi se na talasnoj dužini od 112.27 nm i intenziteta od 42.88. Prvi glavni pozitivan pik je na talasnoj dužini od 125.73 nm i intenziteta od 65.79. Primećuju se i četiri mala negativna pika.

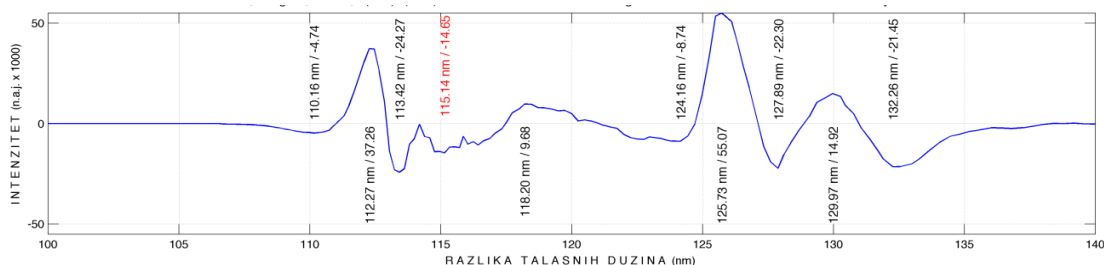
Nakon uklanjanja prvog sloja pokožice je slikana koža i urađen je OMF dijagram (32). Primetne su znatne razlike u ovom sloju kože nakon prelaska na flaširane tipove vode. Svi pikovi su pomereni prema većim talasnim dužinama. Primetno je prisustvo umesto malog negativnog pika mali pozitivan pik koji je malo pomeren prema većoj talasnoj dužini. Potom umesto dominantnog pozitivnog pika dominira glavni negativan pik. I gde je manji negativni pik kod ovog OMF dominira glavni pozitivni zupčast širok pozitivan pik koji dominira čitavim dijagramom. Umesto širokog malog pozitivnog pika kod ovog dijagrama su prisutni mali negativni pikovi.



Dijagram 28. OMF dijagram kože nakon uklanjanja prvog sloja pokožice. Primetan je drugi glavni pozitivni pik na talasnoj dužini od 117.08 nm i intenzitetom od 14.03. Zatim sledi uzak negativan pik na talasnoj dužini od 119.48 nm intenziteta -30.98. Dominantan je širok zupčast pozitivan glavni pik na talasnoj dužini od 122.76 nm intenziteta 29.25.

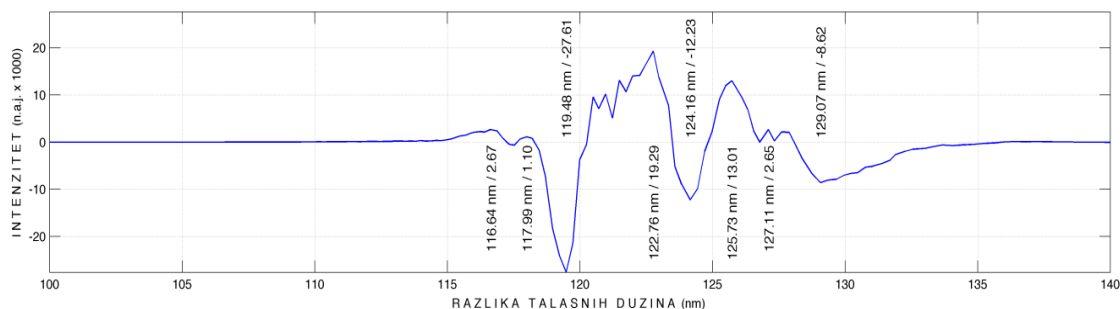
Na istom mestu unutrašnje kože podlaktice je uklonjen drugi sloj pokožice koja je snimljena i potom OMF metodom je dobijen dijagram na kojem su primetne razlike pre svega umesto drugog glavnog negativnog pika na dijagramu dobijenom kad je ispitanica pila Zrenjaninsku vodu je sada kad je prešla na flaširanu vodu prisutan glavni pozitivan pik približno na istoj talasnoj

dužini. Karakteristično je postojanje zadnjeg negativnog pika u ovom (33) dijagramu koji odsustvuje u ranijem dijagramu kad je ispitanica pila Zrenjaninsku vodu.



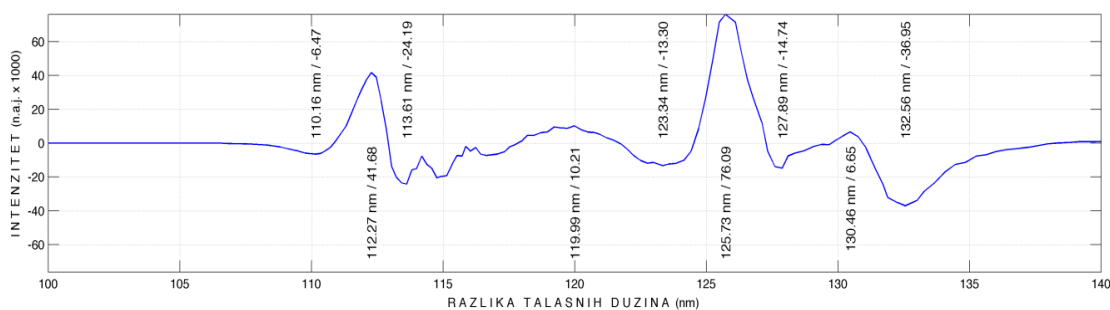
Dijagram 29. Na dijagramu je prikazan OMF drugog sloja pokožice koji je skinut sa kože unutrašnjeg dela podlaktice. Dominiraju dva pozitivna pika, prvi glavni na talasnoj dužini od 125.75 nm i intenzitetom od 55.07 i drugi glavni pozitivan pik na talasnoj dužini od 112.27 nm i intenziteta 37.26. Uočljiva su iza prvog glavnog pozitivna pika dva manja negativna pika i između njih jedan manji pozitivan pik.

Koža posle skidanja dva sloja pokožice lepljivim flasterom poseduje OMF dijagram (34) koji je očigledno drugačiji od OMF dijagrama dobijenog sa istog sloja kože dok je konzumirala Zrenjaninsku vodu. Uočljivo je da na ovom dijagramu nedostaje prvi glavni pozitivni pik dok je za razliku od prethodnog na ovom dijagramu prisutano više pikova, prisutan je manji ali na ovom dijagramu prvi glavni negativni pik za kojim sledi širok zupčasti pozitivni pik, drugi glavni negativni pik, drugi glavni pozitivni pik i završni mali negativni pik



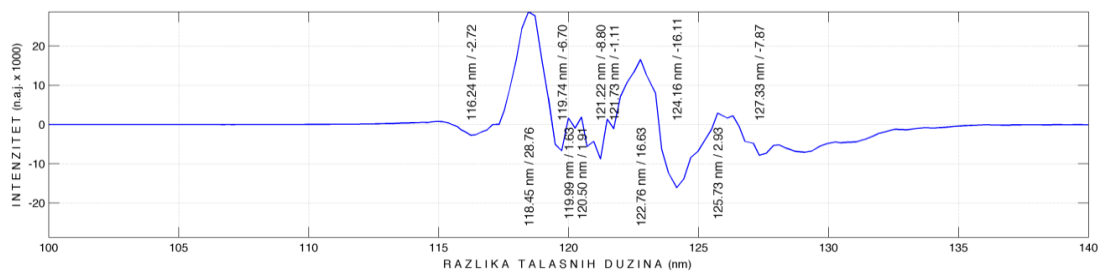
Dijagram 30. OMF dijagram kože unutrašnjeg dela podlaktice nakon skidanja trećeg sloja pokožice (37) poseduje nakon dva mala pomoćna pika izrazit uzak negativan pik na talasnoj dužini od 119.48 nm i intenzitetom od 27.61. Potom sledi širok glavni pozitivni pik na talasnoj dužini od 122.76 nm i intenzitetom od 19.29. Potom sledi drugi glavni negativni pik na talasnoj dužini od 124.16 nm i intenzitetom od -12.23. I na kraju dominira drugi glavni pozitivni pik na talasnoj dužini od 125.73 nm i intenzitetom od 13.01. i na kraju je negativan mali pik na talasnoj dužini 129.07nm i intenziteta od -8.62.

Najzad je uklonjen sa istog mesta treći sloj pokožice čiji je OMF pretstavljen na dijagramu (35). Očigledna je razlika između OMF dijagrama istog sloja kože za vreme dok je ispitanica pila Zrenjaninsku vodu i OMF dijagrama kad je ispitanica duže vreme pila flaširanu vodu. Uočljivo je da su intenziteti glavnog prvog i drugog pozitivnog pika većih vrednosti. Dijagramom dominiraju prvi i drugi pozitivni pik a i između njih širok pozitivan pik dok dva, prvi i drugi glavni pik izostaju a tri pozitivna pika su relativno malog inteziteta. Prvi glavni pik na ranijem OMF dijagramu je kod dijagrama (35) mnogo manji i za njim sledi najveći prvi glavni pik ovog dijagrama.



Dijagram 31. Na OMF dijagramu je predstavljena pokožica zaostala na lepljivom flasteru nakon uklanjanja trećeg sloja. Primetan je drugi glavni pozitivan pik na talasnoj dužini od 127.27 nm i intenzitetom od 41.88. Potom je primetan prvi glavni pozitivan pik na talasnoj dužini od 125.73 nm i intenzitetom od 76.00 a između njih se nalazi mali pomoćni širok pik na talasnoj dužini od 119.99 nm i intenzitetom od 10.21 i na kraju dijagrama se nalazi mali sporedni negativni pik na talasnoj dužini od 132.56 nm i intenziteta od -36.95.

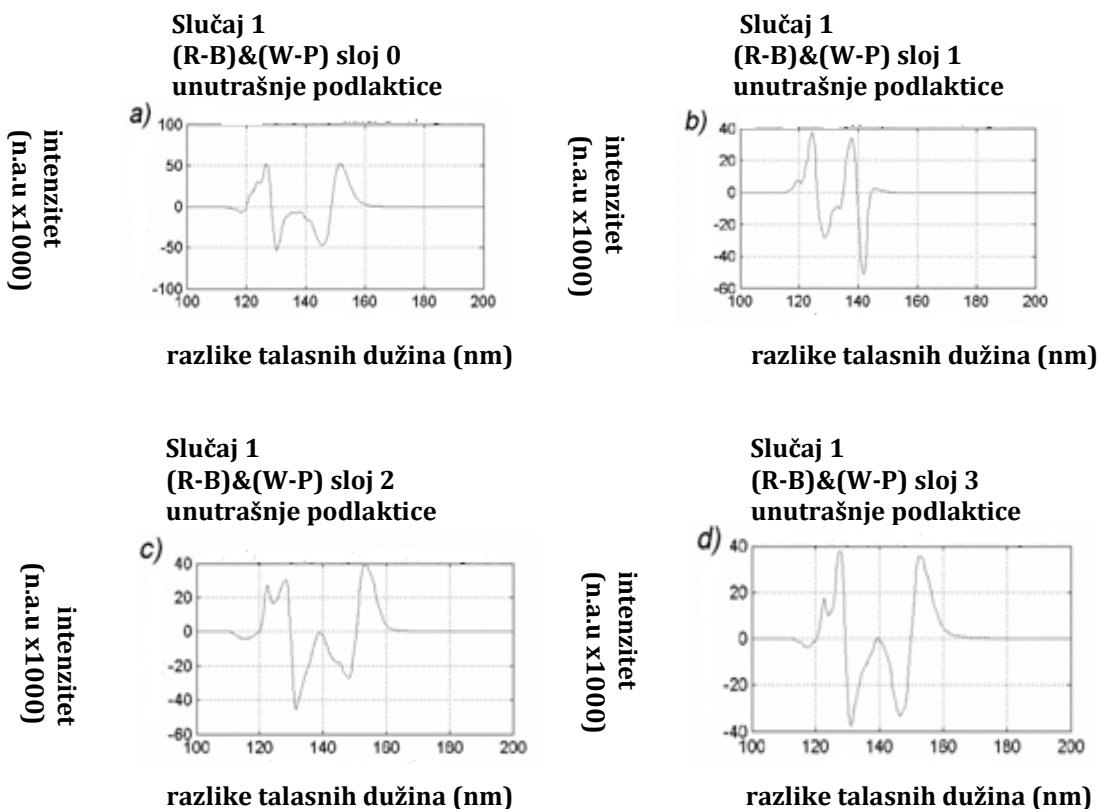
Na dijagramu (36) je prikazan OMF kože nakon uklanjanja tri sloja pokožice pokazuje da je na ovom dijagramu manji intenzitet pikova u odnosu na onaj kad je ispitanica pila samo Zrenjaninsku vodu. U ovom sloju kože voda pokazuje drukčiju dinamiku vodoničnih veza, što se pokazuje OMF, nego u istom sloju kože iste ispitanice kad je pila Zrenjaninsku vodu. Upadljivo je prisustvo dva pozitivna pika i između njih više malih pozitivnih i negativnih pikova dok je na ranijem dijagramu na istim talasnim dužinama prisutan jedan širi pozitivni i jedan negativni pik. Na talasnoj dužini gde je na prethodnom dijagramu prisutan široki mali pozitivan pik na ovom dijagramu je prisutan prvi glavni negativni pik.



Dijagram 32. OMF dijagram kože unutrašnjeg dela kože podlaktice nakon skidanja flasterom tri sloja pokožice pokazuje karakteristične pikove na 118.45 nm talasne dužine prvi glavni pozitivan pik intenziteta 28.76 zatim nekoliko pozitivnih i negativnih pikova malog intenziteta, nakon njih drugi glavni pozitivni pik na talasnoj dužini od 122.76 ima intenzitet od 16.63. Prvi glavni negativni pik je na talasnoj dužini 124.16 nm i intenziteta -16.11 pa zatim sledi mali sporedni pozitivan pik na talasnoj dužini od 125.73 nm i intenziteta 2.03.

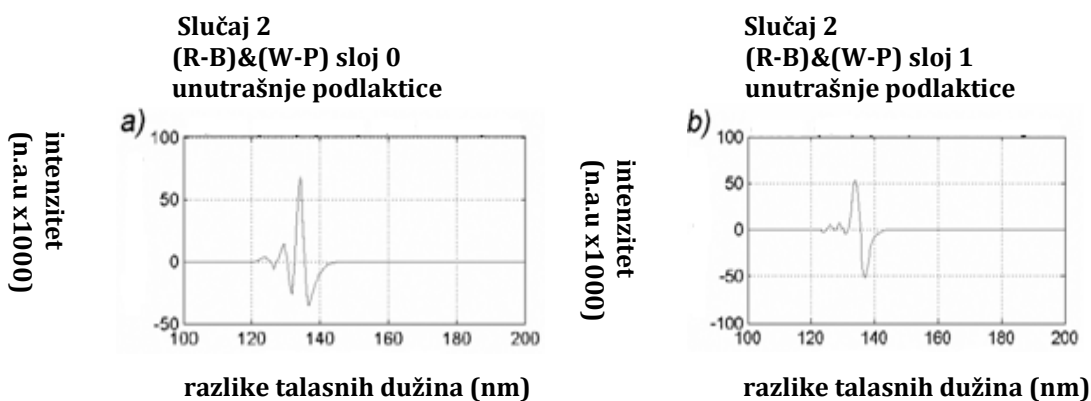
Svojstva kože unutrašnjeg regiona podlaktice, ispitanika koji su pili normalnu (flaširanu vodu) pokazuju sličnost konvolucionih spektara za razlike talasnih dužina na 132 ± 1.2 nm. Dok dobrovoljci koji su pili Zrenjaninsku vodu sve vreme poseduju pik na 140 ± 1.2 nm. Dobrovoljci koji su menjali vodu za piće od Zrenjaninske na flaširanu dva meseca, poseduju pik na 135 ± 1.5 nm. Promena talasnih dužina kod dobrovoljaca koji su pili flaširanu vodu i Zrenjaninsku vodu je za maksimum 10.4 nm i minimum 5.6 nm. Dobrovoljci koji su menjali tip vode za piće tokom dva meseca su sa talasnim dužinama između dobrovoljaca koji su pili Zrenjaninsku i flaširanu vodu. Ovo ukazuje da koža (dermis i subcutis) zadržavaju vodu duže od dva meseca. Pretpostavljamo da voda u dermisu ovih dobrovoljaca je mešavina flaširane i Zrenjaninske vode i prodire kroz bazalnu membranu do epidermisa. Naredni eksperimenti na bazi promene talasnih dužina će omogućiti saznanje koliko dugo voda ostaje u ljudskoj koži.

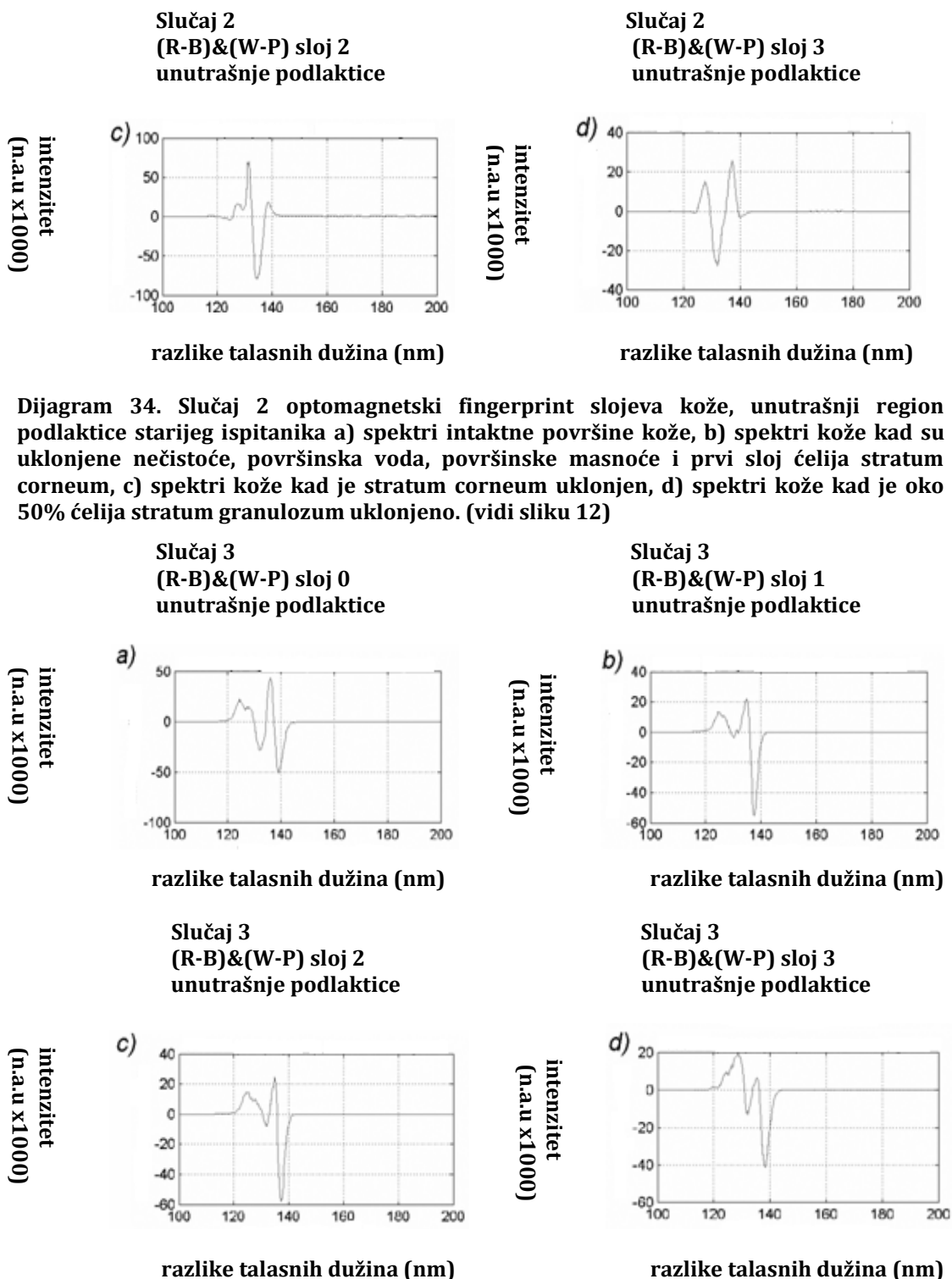
Ovde je pretstavljen optomagnetski spektar kože mlađeg i starijeg ispitanika. OMF dijagram (37 i 38) za region unutrašnje podlaktice. U koži dobrovoljaca postoji razlika u osobinama svakog sloja epidermisa. Međutim pik na 132 ± 1.5 nm razlike talasnih dužina postoji u oba slučaja.



Dijagram 33. OMF dijagram slojeva kože mlađeg ispitanika a) spektri za svakodnevnu površinu kože, b) spektri kože kada su uklonjeni nečistoća, površinske vode, površinske masnoće i prvi sloj ćelija stratum corneum, c) spektri kože kad je stratum corneum uklonjen, d) spektri kože kad je oko 50% ćelija stratum granulozum uklonjeno. (vidi sliku 12)

Dobrovoljci koji su menjali vodu za piće (od Zrenjaninske su prešli na flaširanu) dva meseca, su pokazali razlike u pikovima od 120 nm do 130 nm u poređenju sa dobrovoljcima koji su pili Zrenjaninsku ili flaširanu vodu. OMF razlike spektara su otkrivene za kožu unutrašnjeg dela podlaktice.





Dijagram 35. Slučaj 3 optomagnetski fingerprint slojeva kože, unutrašnji region podlaktice sredovečan dobrovoljac a) spektri svakodnevnog površine kože, b) spektri kože kad su uklonjene nečistoće, površinska voda, površinske masnoće i prvi sloj ćelija stratum corneum, c) spektri kože kad je stratum corneum uklonjen, d) spektri kože kad je oko 50% ćelija stratum granulozum uklonjeno. (vidi sliku 12)

Kad poredimo sve slučajeve za drugi sloj kože, gde koža zadržava vodu u voda lipid nanoslojevima našli smo razlike za dobrovoljce. Nađene su razlike između dobrovoljaca koji su pili flaširanu i Zrenjaninsku vodu OMF dijagram (40). Pik razlike talasnih dužina između 120 nm i 130 nm OMF dijagrami (40a) i (40b), dok dobrovoljci koji su menjali vodu za piće dva meseca (od Zrenjaninske na flaširanu) pik raste i onda opada OMF dijagram (8c).

**Slučaj 4
(R-B)&(W-P) sloj 0
unutrašnje podlaktice**



**Slučaj 4
(R-B)&(W-P) sloj 1
unutrašnje podlaktice**



**Slučaj 4
(R-B)&(W-P) sloj 2
unutrašnje podlaktice**

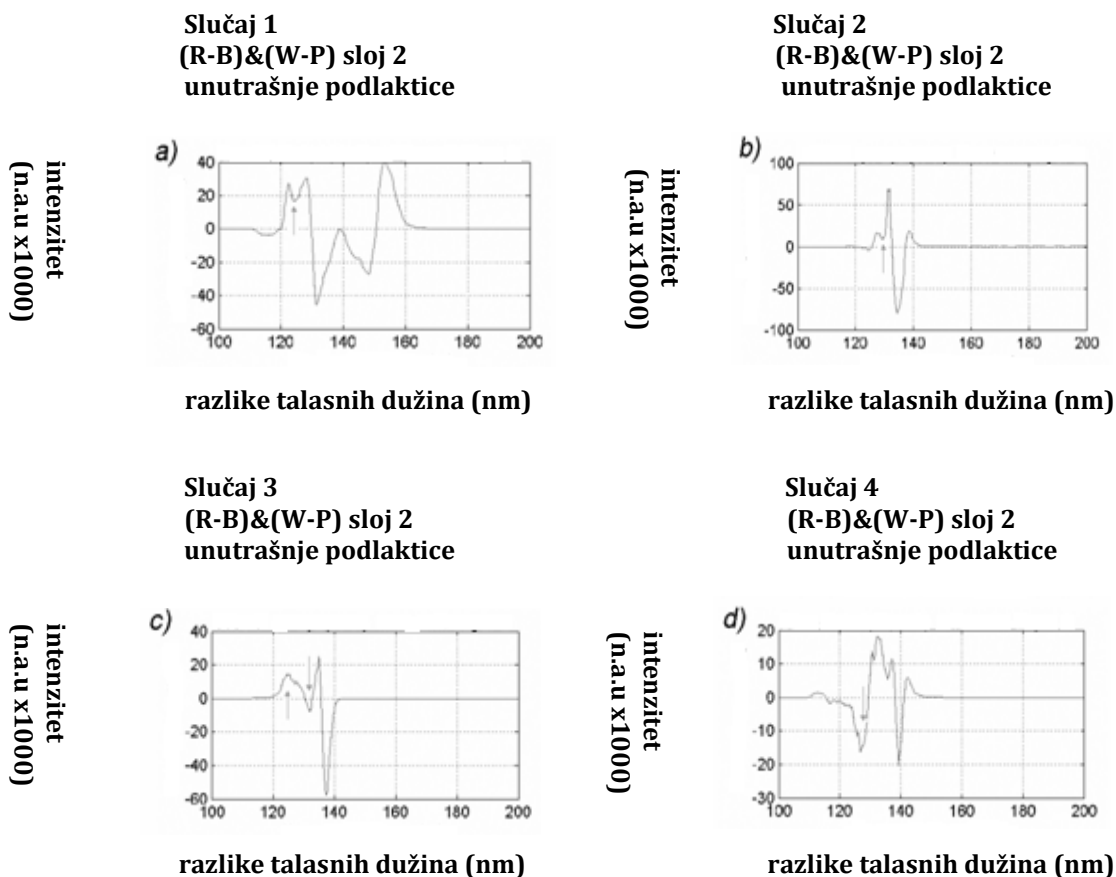


**Slučaj 4
(R-B)&(W-P) sloj 3
unutrašnje podlaktice**



Dijagram 36. Slučaj 4 optomagneti fingerprint slojeva kože, unutrašnji region podlaktice sredovečan dobrovoljac 43 g.: a) spektar intaktne površine kože, b) spektri kože kad su uklonjene nečistoće, površinska voda, površinske masnoće i prvi sloj ćelija stratum corneum, c) spektri kože kad je stratum corneum uklonjen, d) spektri kože kad je oko 50% ćelija stratum granulozum uklonjeno. (vidi sliku 12)

Međutim, u slučaju dobrovoljaca koji su pili Zrenjaninsku vodu sve vreme pik opada. OMF dijagram (40c).



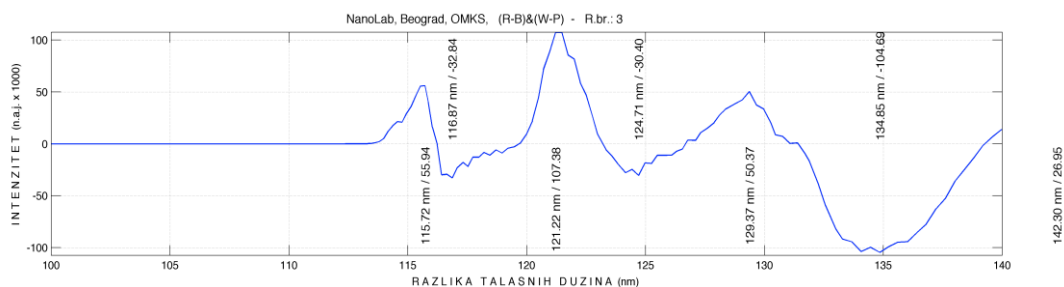
Dijagram 37. Optomagnetni fingerprint slojeva kože, unutrašnjeg regiona podlaktice 1-4: Spektri predstavljaju svojstva kože kad su uklonjeni komplektan stratum corneum i oko 20% stratum granulozum. U regionu od 120 nm do 130 nm pikova različitih talasnih dužina su slični: za slučaj 1 i 2 raste (gde je flaširana voda sve vreme), za slučaj 3 pik delimično raste i onda opada, menjali su Zrenjaninsku vodu sa flaširanom vodom dva meseca) i slučaj 4, pik opada (Zrenjaninska voda sve vreme).

Za istu grupu koja je pila istu vodu (izuzev najmlađeg ispitanika) bioimpedanca pokazuje male razlike za sve dobrovoljce za slojeve 0 i 1, dok za slojeve 2 i 3 pokazuju značajnu razliku za flaširanu i Zrenjaninsku vodu (slučaj 3-promena vode za piće od Zrenjaninske na flaširanu i slučaj 4 sve vreme piju Zrenjaninsku vodu).

8.2.2.2. OMF vode

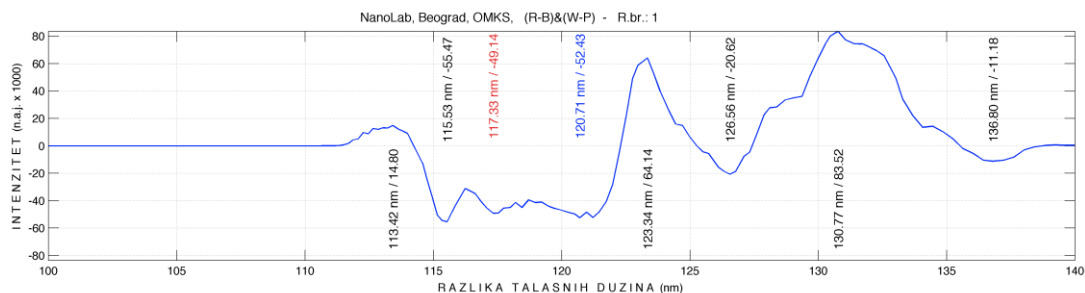
Metodom OMF su karakterisane vode koje su upotrebljavane u eksperimentima: Demi, Beogradska i Zrenjaninska česmenska. Dobijeni

dijagrami ukazuju na magnetske osobine valentnih elektrona i protona i slični su između svih ispitivanih voda. Na dijagramu (42) je prikazan OMF demi vode na talasnim dužinama između 100 i 140 nm. Karakteristični su prvi glavni pozitivan pik na 121.22 nm intenziteta 107.38. Njemu prethodi drugi glavni pomoćni pik na talasnoj dužini od 115.72 nm i intenzitetom od 55.94. Dok je iza glavnog pozitivnog pika na talasnoj dužini 129.37 nm široki pik sa intenzitetom od 50.37. Karakteristično je da se kod OMF dijagrama ove vode javlja još jedan pozitivan pik na talasnoj dužini od 142.30 nm i intenzitetom od 26.95. Negativni pikovi su manjeg intenziteta osim prvog glavnog negativnog širokog pika, koji dominira čitavim dijagramom na talasnoj dužini od 134.85 nm i intenzitetom od -104.69.



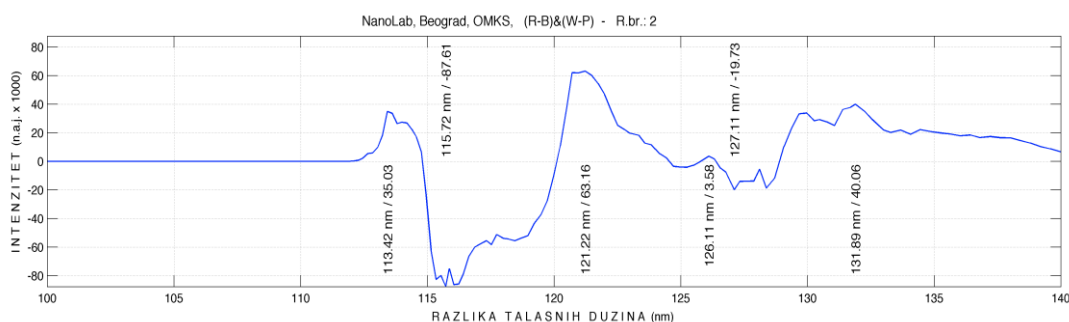
Dijagram 38. OMF dijagram demi vode sa tri pozitivna i tri negativna pika.

Dok su na kraćim talasnim dužinama dva mala negativna pika na talasnoj dužini od 116.87 nm sa intenzitetom od -32.84. i drugim pomoćnim pikom na talasnoj dužini od 124.71 nm i intenzitetom od 30.40. Na OMF dijagramu Beogradske vode (43) se može uočiti sličnost sa demi vodom ali postoje i osobenosti sa obzirom da Beogradska voda zbog svog sastava poseduje drukčiju mrežu vodoničnih veza.



Dijagram 39. OMF dijagram Beogradske česemske vode sa tri pozitivna i pet negativnih pikova.

Dijagramom dominira široki prvi glavni pozitivni pik na talasnoj dužini od 130.77 nm sa intenzitetom od 83.52. Zatim slede na kraćim talasnim dužinama drugi glavni pozitivan pik na talasnoj dužini od 123.34 nm i intenzitetom od 64.41 i manji pomoćni pik na talasnoj dužini od 113.42 nm i intenzitetom od 14.80. Negativni pikovi su druga glavna karakteristika OMF dijagrama ove vode. Na talasnim dužinama od 115.53 nm je pik intenziteta -55.47 potom odmah sledi drugi negativan pik na talasnoj dužini od -117.33 nm i intenzitetom od -49.14. a potom sledi i treći negativan pik na talasnoj dužini od 120.71 nm i intenzitetom od -52.34. Svi ovi pikovi slede jedan za drugim i čine plato koji dominira ovim dijagramom. Potom slede dva manja negativna pika: na talasnoj dužini od 126.56 nm i intenzitetom od -20.62 i na talasnoj dužini od 136.80 i intenzitetom od -11.18. OMF dijagram (44) prikazuje spektre česemske vode iz Zrenjanina za koji je karakterističan manji intenzitet pozitivnih i veći intenzitet negativnih pikova i ujednačenost pozitivnih pikova.



Dijagram 40. OMF dijagram česemske vode iz Zrenjanina sa četiri pozitivna i dva negativna pika.

Na ovom dijagramu dominira prvi glavni pozitivan pik na talasnoj dužini od 121.22 nm i intenzitetom od 63.16. Na početku dijagrama je drugi glavni pozitivan pik na talasnoj dužini od 113.42 nm i intenziteta 35.03 zatim pomoćni mali pik na talasnoj dužini od 126.11 i intenzitetom 3.58. I na kraju dijagrama je prvi široki pomoćni pik na talasnoj dužini od 113.89 nm i intenzitetom od 40.06. Karakterističan je za ovaj dijagram prvi glavni širok negativan pik na talasnoj dužini od 115.72 nm intenziteta -87.61 koga prati drugi glavni negativni pik na talasnoj dužini od 127.11 i inteziteta -19.73.

8.2.2.3. In vivo impedansna spektroskopija

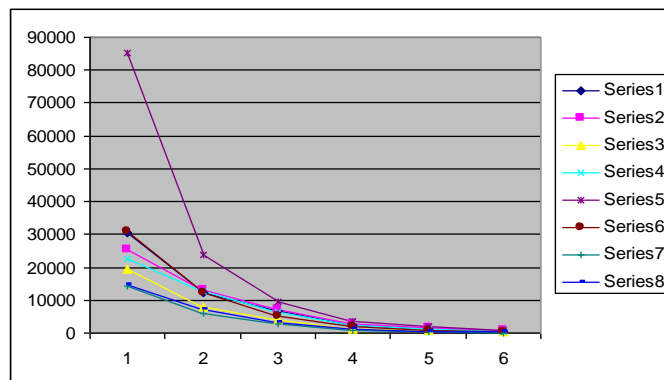
Metodom impedansne spektroskopije (analiza impedance) sprovedeno je ispitivanje nad 3 grupe sa ukupno 45 dobrovoljna učesnika. Prva grupa obuhvatala je 12 učesnika i pili su Zrenjaninsku vodu da bi pet meseci pili druge tipove voda i bili su u intervalu starosti od 23-77 god. U drugoj grupi su bili 6 učesnika koji su sve vreme konzumirali Zrenjaninsku vodu i bili su starosti 43-96 god. Treću grupu su činili ispitanici koji su pili Beogradsku vodu uzrasta od 21 g. do 41 g.

Obe grupe su ispitivane sa dve serije merenja u frekventnom opsegu od 50 Hz do 10 kHz i inicijalnim pobudnim naponom od 5V :

1. Prvom serijom merenja je ispitivana koža sa intaktnim stratum corneum-om (merenje nultog sloja kože).

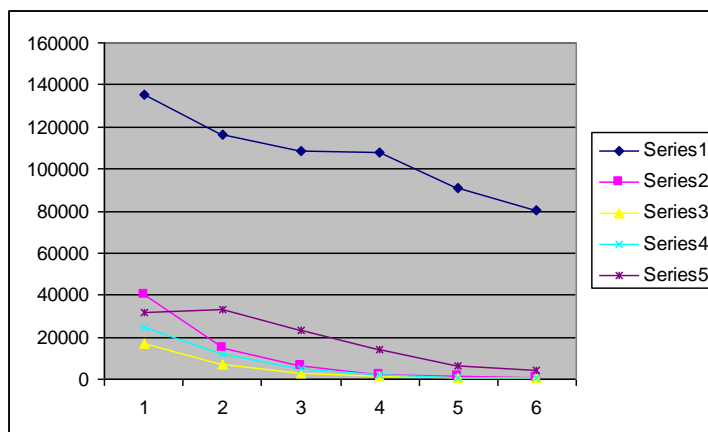
2. U drugoj seriji merenja je izvršeno uklanjanje stratum corneum-a u tri navrata pomoću flastera, brzim skidanjem sa iste lokacije. Stepem uklonjenosti slojeva nije bilo moguće utvrditi ali se smatra da je postupkom učinjen kvalitativan korak ka obezbeđivanju pristupa slojevima epiderma u kome se nalaze ćelije manjeg stepena terminalne diferenciranosti. Na osnovu merenja veličina ulaznog i izlaznog napona u naznačenom opsegu određena je vrednost impedance čije su promene u zavisnosti od frekvencije grafički prikazane sa komentarima na dijagramima (45 do 59)

Učesnici treće grupe njih 27 su pripadali intervalu starosne dobi od 21 do 41 godina i konzumirali su Beogradsku vodu. Učesnici su ispitivani u jednostrukoj seriji merenja koja su sprovedena u frekventnom opsegu od 10Hz do 50 kHz sa inicijalnim pobudnim naponom od 5V. Kod ove grupe je ispitivana samo koža sa intaktnim stratum corneumom i to u širem frekventnom opsegu radi sticanja uvida u mogućnosti detekcije varijabilnosti između grupa ispitanika koji su konzumirale različite tipove voda. Grafički prikaz dobijenih rezultata sa komentarima je dat na dijagramu (58).



Dijagram 41. bioimpedance ispitanika koji su konzumirali Zrenjaninsku vodu pa pet meseci pili druge flaširane vode, nulti sloj kože. Realni deo impedanse ReZ na Y osi u odnosu na T period naizmenične struje na X osi.

Može se uočiti na dijagramu promene impedance nultog sloja (48) da su vrednosti za impedancu konzistentni i da postoje odstupanja u zavisnosti od pola i uzrasta. Kod muškaraca i u starijim uzrastu je veća vrednost impedance, kao u odnosu na ispitanice ženskog pola. Dijagram impedance (49) ispitanika koji su pili Zrenjaninsku vodu pokazuju manju hidriranost kože mada ona značajno varira od starosti, pola i raznih sredinskih faktora.



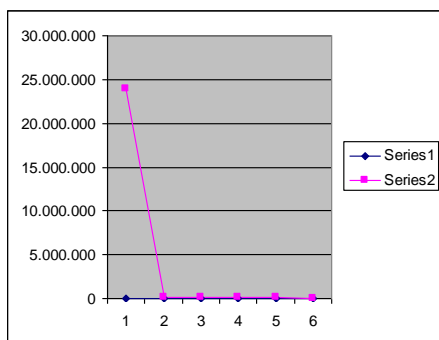
Dijagram 42. bioimpedance ispitanika koji su pili samo Zrenjaninsku vodu za nulti sloj kože. Realni deo impedanse ReZ na Y osi u odnosu na T period naizmenične struje na X osi.

Ispitanici koji su pili Zrenjaninsku vodu poseduju nešto više vrednosti za impedancu što je naročito uočljivo za muškarce. Prva kriva series 1 impedanca nultog sloja kože pokazuje višestruko veću vrednost impedance u svim slojevima kože, Vrednosti impedance za žene su dosta ujednačene i malo se razlikuju u zavisnosti od starosti i genetske strukture ispitanica. Donji živi

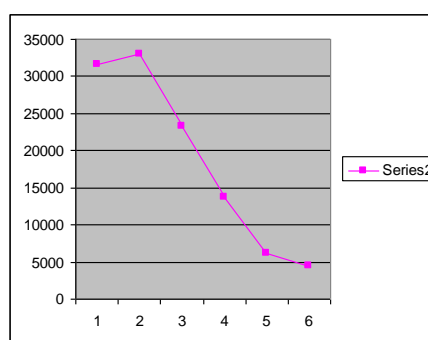
slojevi kože su kod ispitanica koje su konzumirale Zrenjaninsku vodu sa mnogo nižim impedancama u odnosu prema ispitanicima koji su pili Zrenjaninsku vodu.

Na dijagramima (47 i 48) su predstavljene dijagrami impedance ispitanice koja je pila Zrenjaninsku vodu, levo nultog sloja kože i desno kože nakon uklanjanja trećeg sloja kože koji ukazuju na višestruko povećanje impedance naročito u živim delovima kože nakon uklanjanja trećeg sloja kože. Uvećana impedanca kože ispitanice stare 96 g. ukazuje na smanjenje hidratacije naročito živih tkiva kože kao posledice starenja.

Za poređenje na dijagramima (49 i 50) impedance mlađe ispitanice 44 g. leva slika dijagram impedance nultog sloja i desno dijagram impedance nakon uklanjanja trećeg sloja ukazuju da je impedanca kože ove ispitanice mnogo puta manja od starije ispitanice što ukazuje da je hidratacija kože znatno veća kod mlađih ispitanika.

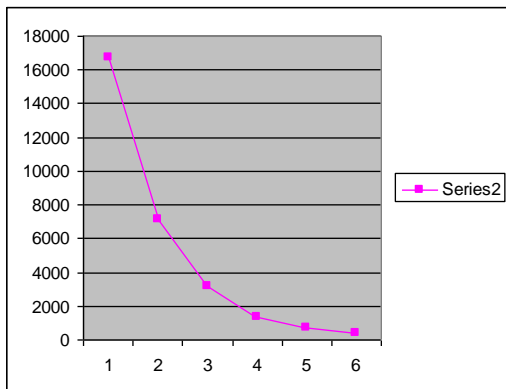


Dijagram 43. impedanse nultog sloja kože ispitanice stare 96 vodu.

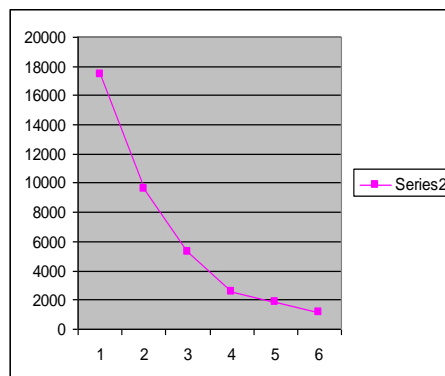


Dijagram 44. iste ispitanice g. koja je pila Zr. vodu nakon uklanjanja trećeg sloja kože.

Realni deo impedanse ReZ na Y osi u odnosu na T period naizmjenične struje na X osi.

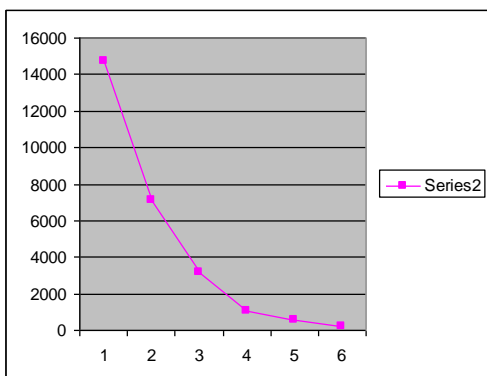


Dijagram 45. impedance nultog sloja kože ispitanice stare 44 g. koja je pila Zr. Vodu.

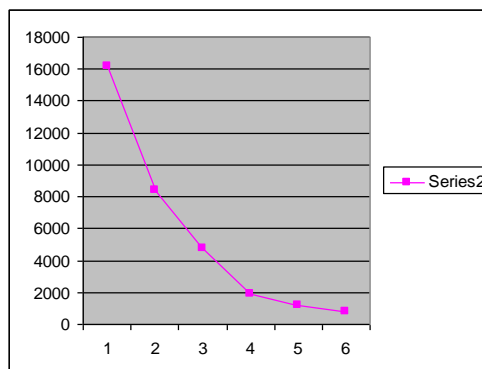


Dijagram 46. impedance iste ispitanice nakon uklanjanja trećeg sloja kože.

Realni deo impedance ReZ na Y osi u odnosu na T period naizmenične struje na X osi.

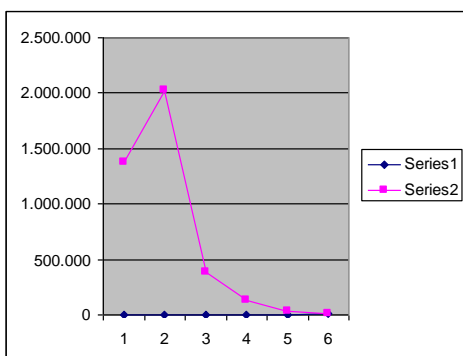


Dijagram 47. impedance nultog sloja kože ispitanice 55g. koja nije pila Zr. vodu.

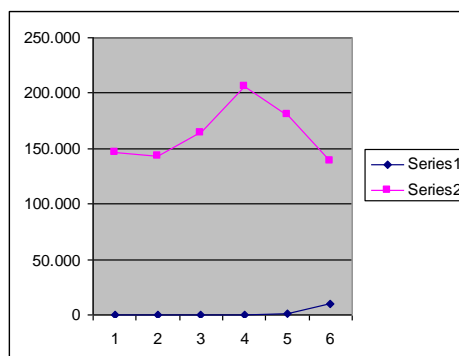


Dijagram 48. impedance iste ispitanice nakon uklanjanja trećeg sloja kože stare 55g.

Realni deo impedance ReZ na Y osi u odnosu na T period naizmenične struje na X osi.



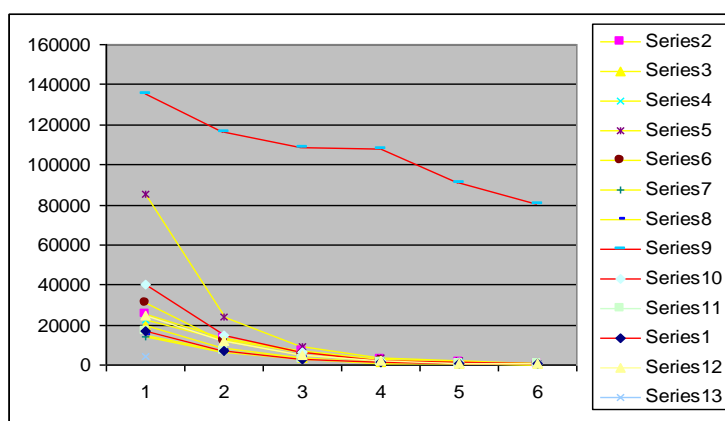
Dijagram 49. impedance nultog sloja kože ispitanika starog 55 g. koji nije pio Zr. Vodu.



Dijagram 50. impedance istog ispitanika nakon uklanjanja trećeg sloja kože.

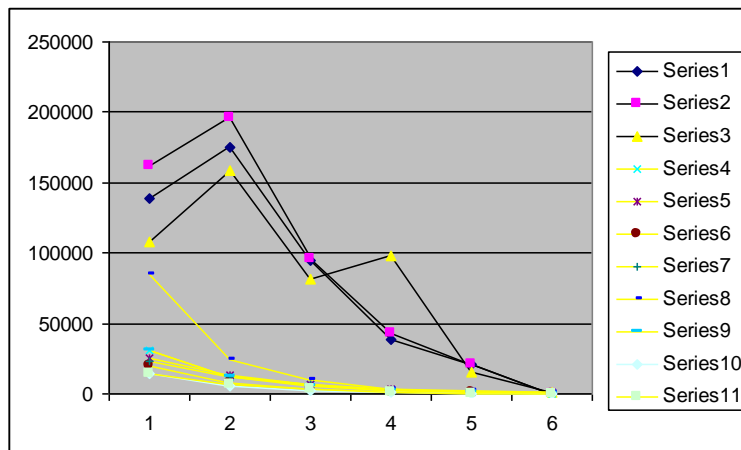
Realni deo impedanse ReZ na Y osi u odnosu na T period naizmjenične struje na X osi.

Iz dijagrama (55) je uočljivo da se impedanca kože uvećava sa starošću ispitanika što je naročito izraženo za dublje slojeve kože koji su živi (stratum granulozum, spinozum i bazale). Postoji značajna razlika, kao što se vidi iz dijagrama (58) između ispitanika različitog pola. Kod muškaraca je impedanca kože i sa stratum corneum i nakon njegovog uklanjanja višestruko veća nego kod žena iste starosti.



Zajednički Dijagram 51. sa impedancom ispitanika koji su pili Zenjaninsku vodu.

Realni deo impedanse ReZ na Y osi u odnosu na T period naizmjenične struje na X osi (pretstavljani narandžastom bojom) i druge flaširane tipove voda (pretstavljene žutom bojom). Promenom tipa vode za konzumiranje se značajno menja bioimpedanca nultog sloja kože, kod muških ispitanika postaje slična impedanci ženskih ispitanika, za razliku od muških ispitanika koji konzumiraju Zrenjaninsku vodu gde se uočava znatno povećanje impedance za razliku od svih ostalih ispitanika. Sa starenjem i posebno kod muških ispitanika se pojavljuje razlika u impedanci kože u zavisnosti od tipa vode za piće što je naročito uočljivo na dijagramu (56) gde su poređeni dijagrami nultog sloja kože između ispitanika koji su pili Zrenjaninsku ili ne Zrenjaninsku vodu i Beogradsku vodu.



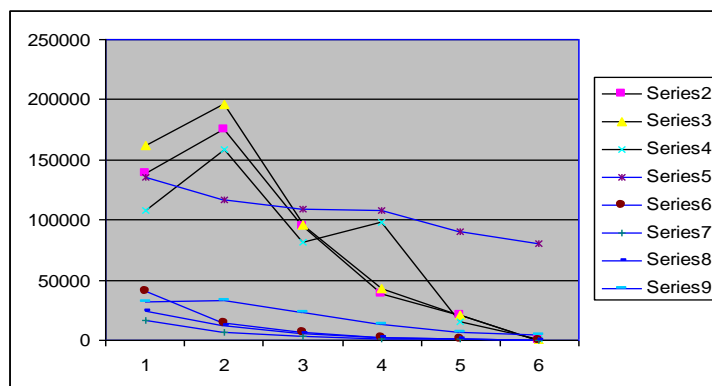
Dijagram 52. dijagram ispitanika koji su pili Beogradsku vodu (crna linija) i ispitanika koji su pili flaširane tipove voda (žuta linija), pokazuje značajne razlike, mnogo su kompaktniji grafici impedance ispitanika koji su pili flaširane vode nego onih koji su konzumirali Beogradsku vodu, takođe je impedanca donjih živih slojeva kože mnogo manja kod ispitanika koji su pili flaširane vode.

Realni deo impedanse ReZ na Y osi u odnosu na T period naizmenične struje na X osi.

Poređenjem impedance ispitanika koji su pili Beogradsku i Zrenjaninsku vodu se može uočiti da je impedanca kože ispitanika koji su pili Beogradsku vodu mnogo veća nego u slučaju ispitanika koji su pili Zrenjaninsku vodu. U izvesnim slučajevima neki ispitanici koji su pili Zrenjaninsku vodu imaju impedance kože koje su veoma slične impedancama kože ispitanika koji su pili Beogradsku vodu (61) ali je smanjenje impedance kože sa dubinom mnogo manje nego kod ispitanika koji su pili Beogradsku vodu tako da i dublji, živi, hidrirani slojevi kože pokazuju znatno veće impedanse kože nego mrtvi slojevi kože većine ispitanika ili dublji, živi slojevi kože ispitanika koji su pili Beogradsku vodu.

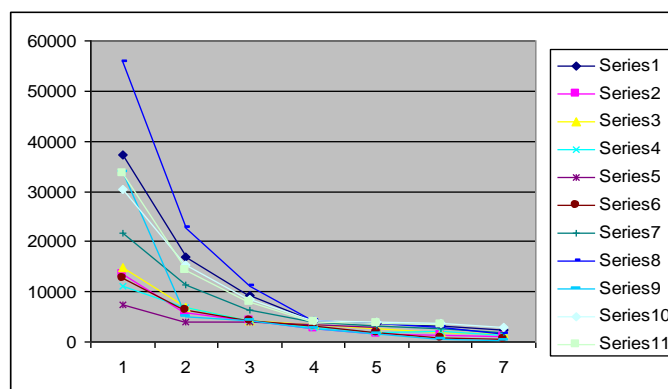
Na dijagramu (57) su prikazani grafici mlađih ispitanika 19-21 god koji su pili Beogradsku vodu, pokazuju manju impedancu kože i u dubljim živim slojevima kože se impedance izjednačuju slično ispitanicima koji su pili Zrenjaninsku ili flaširane tipove voda u mladosti su impedance kože niže a sa starenjem rastu. Takođe su kod ženskih ispitanika niže nego kod muških i taj se

trend nastavlja tokom starenja tako da je veća razlika impedance kože tokom starenja između muškaraca i žena.



Dijagram 53. ispitanika koji su pili Beogradsku vodu (crna linija) i ispitanika koji su pili Zrenjaninsku vodu (plava linija). Realni deo impedance ReZ na Y osi u odnosu na T period naizmenične struje na X osi.

Realni deo impedance ReZ na Y osi u odnosu na T period naizmenične struje na X osi.



Dijagram 54. grafik impedanci nultog sloja kože mladih ispitanika 19-21 godine koji su konzumirali Beogradsku vodu oba pola.

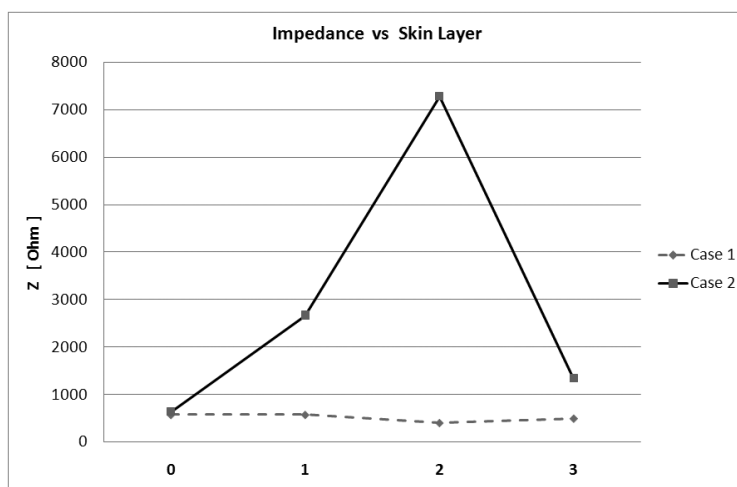
Realni deo impedance ReZ na Y osi u odnosu na T period naizmenične struje na X osi.

Merenje bioimpedance pokazuje razlike slojeva kože za mladu kožu i staru kožu. Stara koža ne zadržava u epidermisu dobro vodu. Dramatična situacija je u sloju stratum granulozum gde je razlika između stare i mlade kože dramatično značajna. OMF dijagram (40). Mlada koža dobro zadržava vodu u svim epidermalnim slojevima. Na površini kože impedanca je približno ista za mladu i staru kožu. Razlike postaju očigledne za stratum corneum, zato što ovaj sloj sadrži 8% celokupne vode u epidermisu. Ovaj rezultat takođe ukazuje na

ulogu pojedinačne gel faze u stratum corneumu. (Norlén 2001.) Domen gel faze može da podrži funkciju barijere, dok kontinuirani tečno kristalasti domen obezbeđuje elastičnost bitnu za savitljivost kože. (Bouwstra 1997.)

Važna funkcija kože je zaštita protiv gubitka vode. Transepidermalni gubitak vode (TEWL) je proces pasivne difuzije kroz kožu. Orožnali sloj je jako važan sloj koji ograničava stopu transporta vode ka spoljašnjosti. Jedinstvena organizacija hidrofилnih ćelija unutar lipida, hidrofobno okruženje čini sloj od 10 do 20 μm i efikasna je kao barijera

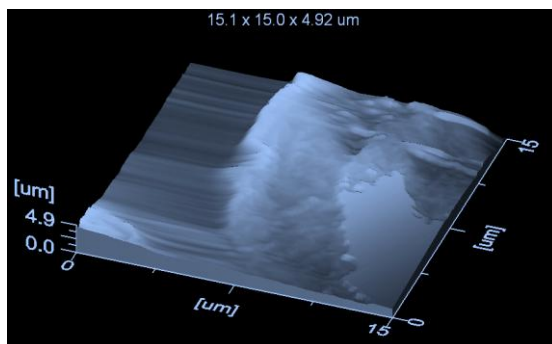
Danas postoje dokazi da je količina vode u epidermisu smanjena kod starijih osoba u poređenju sa vrednostima TEWL sredovečnih ljudi. (Gilchrest 1989.) Nađena je značajna razlika u prisustvu vode u stratum granulozum, dijagram (59), gde se može videti da stratum corneum takođe pokazuje kapacitet da zadrži vodu (sloj 1: slučaj 1 i slučaj 2).



Dijagram 55. Bioimpedanca (100 KHz) slojeva kože, unutrašnji region podlaktice, za slučaj 1 mlada koža i slučaj 2 stara koža: Značajna razlika u bioimpedanci je nađena kad je kompletan stratum corneum i oko 30% ćelija stratum granulozuma uklonjeno flasterom. Ovo je isti rezultat pronađen u OMF spektrima za region razlika talasnih dužina (OMF dijagrami 40 i 41). U principu, stara koža ne zadržava dobro vodu u epidermisu, i delimično u sloju stratum corneumu. Međutim mlada koža mnogo bolje uređuje i zadržava vodu u slojevima epidermisa.

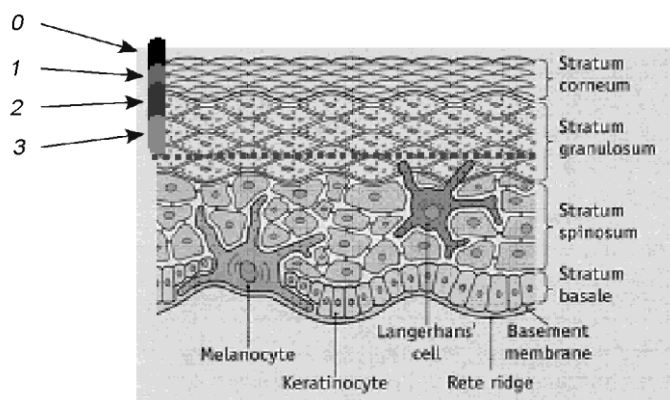
8.2.2.4. AFM

Debljina uklonjenih slojeva kože na površini flastera ispitana je mikroskopijom atomskih sila AMF NanoProbe JEOL JSPM 5200, Japan. Na slici 12 je prikazan AMF uzorka kože.



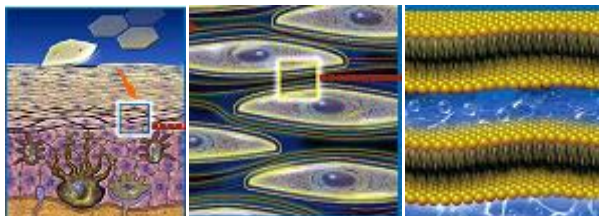
Slika 12. Uklonjen treći sloj pokožice (na lepljivoj površini flastera) karakterisan sa AMF. snimak dobijen snimanjem flastera posle uklanjanja trećeg sloja kože i predstavlja donji sloj stratum granulosuma.

Položaj slikanog sloja sa flastera je predstavljen na slikama 13 i 14, gde se vidi položaj slikanog sloja u odnosu na ostale slojeve kože.



Slika 13. Anatomija poprečnog preseka epidermisa sa glavnim slojevima (adaptirano od Gawkrödger 2003). Levo, brojana notacija: 0-površina kože sa nečistoćama, površinskom masnoćom i prvim slojem stratum corneum bez vode (oko 6 μm), 1- dublji deo stratum corneum sa veoma malim sadržajem vode (oko 5 μm), 2- voda u stratum corneum i prvi slojevi vode u stratum granulozum sa značajnom količinom vode (od 10 μm do 15 μm), 3- stratum granulozum, bogat sa vodom-a ako je koža u dobrom stanju (oko 20 μm). Stratum granulozum zadržava vodu u voda lipid slojevima, i samo u ovim delovima kože je moguće karakterisati vodu kao nezavisnu supstancu.

Slojevi lipid voda su prikazani na slici 10. gde su pretstavljeni nanoslojevi vode u stratum granulozum u kome se ove strukture formiraju i koje su naročito zavisne od vrste vode koja se unosi u organizam.



Slika 14. Epidermis ljudske kože (levo) i njeni slojevi (prilagođeno od Gawkrödger 2003) Kvadrat na prvoj slici ukazuje na stratum granulozum, koji je uvećan na drugoj slici (sredina), dok treća slika (desno) pokazuje lipidne slojeve i vodu između njih. Debljina vodenih slojeva je između 20 nm i 50 nm, dajući svojstva sloju tečno kristalaste vode. Voda je veoma uređena u stanju pseudo polimera.

Maksimalna debljina svih uklonjenih slojeva unutrašnje podlaktice ispitanika je 36.2 μm dok je minimum bio 30.4 μm . Od kojih jedna osoba nije menjala vodu starosti 44g. dok su ostale tri menjale vodu, jedna je bila starija 78g, druga je srednjih godina 51g. dok je treća bila mlađa 30g. Debljina slojeva kože ispitanice koja je pila Zrenjaninsku vodu je manja od starijih ispitanika koji su prešli na flaširane tipove vode. Najveću debljinu poseduju slojevi najmlađeg ispitanika koji je prešao na flaširanu vodu. Prosečna debljina uklonjenog sloja unutrašnjeg dela podlaktice koji je zaostao na flasteru je bio 4.92 μm (maksimalna debljina za sloj jedan je bila 10.2 μm dok je minimalna bila 4.2 μm za nulti sloj.

8.3. Diskusija

8.3.1. Diskusija rezultata iz eksperimenta sa pacovima sa rezultatima iz literature

Histopatološki nalazi životinja svih grupa i njihovih potomaka ne odstupaju od normalnih vrednosti što je bilo očekivano s obzirom da su se razlikovali samo po vodi koju su pili. Različite vrste voda koje se razlikuju po svom hemijskom sastavu i stoga organizaciji molekula vode deluju na živa bića u dužem vremenskom periodu i to na molekularnom nivou i nije za očekivanje da se nakon kratkog vremena pojave razlike na mikroskopskom nivou. Sve uočene promene na analiziranim organima su posledice žrtvovanja a ne vrste vode koje su konzumirale životinje. Naj uočljiviji su edem tkiva mozga, jetra koja je normalne morfologije poseduje neke krvne sudove koje su prepunjene krvlju, slezina je sa masom slobodnih eritrocita dok su koža i koštana srž normalnih morfoloških osobina.

Ako se sagledaju obavljene biohemijske analize prema svakom od navedenih parametara, može se uočiti da je nivo glukoze povećan kod svih jedinki, što može biti posledica stresa prilikom žrtvovanja nastala dejstvom glukokortikosteroidnih hormona nadbubrežne žlezde. Takođe povišen nivo glukoze se može javiti ukoliko su jedinke neposredno pre žrtvovanja uzimale hranu koja im je kao i voda uvek bila na raspolaganju. Vrednosti uree su bile niže od normalne kod svih grupa. Nizak nivo ovog parametra retko se javlja u kliničkoj praksi i može se povezati sa gladovanjem, portosistemskim šantovima i svim drugim stanjima u kojima je narušena funkcija kao i anabolički i katabolički, konkretno proteolitički procesi čijom aktivnošću se stvara urea kao metabolički produkt što je rezultat teških oštećenja jetre. Kreatinin je kod 15 od 31 uzoraka bio niži od referentne vrednosti, kao pokazatelj bitan je za procenu funkcije bubrega ali u slučaju njihove slabosti vrednosti kreatinina su povećane. Odstupanje od referentnih vrednosti kreatina su primećena kod pojedinih jedinki svih grupa pa se ne može povezati sa tipom vode koju su životinje pile. Snižene vrednosti kreatinina se mogu dovesti u vezu sa smanjenom mišićnom

aktivnošću i smanjenom mišićnom masom, obzirom da se kreatinin kao metabolit javlja tokom mišićne aktivnosti i razlaganja kreatina. Takođe velika odstupanja u vrednostima Na, K, Mg mogu biti uzrok slabije kontraktilne moći mišića. Ukupni holesterol povišen kod jedne, a smanjen kod druge jedinke od 31. Može biti posledica ishrane, neposrednosti obroka pre žrtvovanja. Povišeni holesterol i trigliceridi mogu se javiti kod oboljenja jetre ili kod poremećaja rada štitne žlezde. Niži nivo holesterola i triglicerida se javlja kod poremećaja funkcije jetre, portosistemskih šantova, malapsorpcije. Vrednosti ukupnih proteina i albumina su niže kod 8 od 31 jedinke. Niske vrednosti ovih parametar treba očekivati kod uslova malapsorpcije dostupnih proteina iz hrane, zatim u uslovima gladovanja proteinima oskudnom hranom, ali i kao posledica slabije proteolitičke aktivnosti koja se može javiti kod poremećaja funkcije jetre. Slabiju proteolitičku aktivnost možemo povezati i sa značajno poremećenim vrednostima mikro i makroelementa koji su veoma bitni u katalitičkoj aktivnosti enzima i koenzima. Ukupni bilirubin je povećan kod 15 od 31 jedinke, AST kod 29 od 31 jedinke, ALT kod 28 od 31 jedinke. Svi ovi parametri imaju istu genezu kao posledica poremećaja u funkciji jetre, poremećaji nivoa makro i mikroelementa koji su neophodni u uspostavljanju optimalne PH sredine za katalitičku aktivnost enzima u ćelijskim organelama i ćelijskom citosolu.

Vrednosti kalcijuma su niže kod 25 od 31 jedinke, fosfora 24 od 31 jedinke, dok je kod jedne jedinke od 31 nivo fosfora bio viši. Kalijum je bio viši kod 3, a niži kod 22 od 31 jedinke, viši nivo kalijuma direktno može biti posledica hemolize in vitro. Nivo natrijuma je bio niži kod 26 od 31 jedinke, a hlorida 20 od 31 jedinke. Nivo makro i mikroelemenata direktno može biti posledica deficita u dostupnoj hrani i vodi. Sva ova odstupanja biohemijskih parametara su prisutna kod svih grupa, roditelja i potomaka. Jetra je jedinstven organ organizma životinje zbog svoje lokalizacije i funkcija koje omogućavaju normalnu homeostazu. Delovanje različitih hepatotoksičnih supstanci dovode do mikromorfoloških, ultrastrukturnih, funkcionalnih promena i poremećaja jetre.

Ostupanja od graničnih vrednosti kod svih grupa životinja su posledica delovanja citotoksičnih materija. Kao što je prikazano na dijagramima za vrednost AST (10 i 11) i za vrednost ALT (13 i 14) postoji korelacija između tipova voda koje su životinje pile i procenta odstupanja od gornje granične vrednosti za ove parametre. Veće je odstupanje kod mužjaka jer su manje otporni na spoljašnje činoce sredine zbog njihove genetske konstitucije, ali variranje njihovih parametara u zavisnosti od tipa vode prati variranje i kod ženki u manjem stepenu. Kod potomaka svih grupa je manje odstupanje nego kod roditelja i potomci ne variraju značajno u zavisnosti od vode koju su pili. Treba primetiti da 1. grupa koja je pila klasterisanu vodu nije imala potomke i 6. grupa ženka koja je pila Zrenjaninsku vodu je pojela jednog potomka tako da u ove dve grupe nisu prikazani na dijagramima vrednosti za potomke. U slučaju ALT je odstupanje nešto drugačije, najveće je kod grupe 4 gde su jedinke pile Zlatiborsku vodu i to kod ženke a nešto su manje od ženke kod mužjaka koji je konzumirao Zrenjaninsku vodu. Ostale grupe su dosta slične po svom odstupanju osim 1. grupe koja najmanje odstupa. U 3. 5. i 6. grupi je kod ženki je najmanje odstupanje od normalnih vrednosti. U slučaju uree što je predstavljeno na dijagramu (3) vrednosti parametara su nešto drugačije. Ispod granice normalne vrednosti približno jednako odstupaju kod mužjaka svih grupa, dok kod ženki nešto manje odstupaju kod prve dve grupe. U slučaju potomaka kod muškog potomstva je odstupanje ovog parametra veće kod svih grupa od njihovih roditelja naročito kod potomaka iz 4 grupe. Žensko potomstvo odstupa od donje minimalne vrednosti ujednačeno kod svih jedinki koje su pile različite vode. Kod odstupanja svih parametara spod normalnih vrednosti prilog dijagram (4) kod ženki i mužjaka po grupama indicira na postojanje korelacije između tipova voda koje su konzumirali. Naj manje odstupanje je kod životinja koje su pile oplemenjene tipove voda dok kod sve tri poslednje grupe koje su pile vodovodsku odnosno Zlatiborsku vodu su odstupanja znatno veća naročito između ženki. Odstupanja kod mužjaka su manje zavisna od tipa vode i ujednačenija i osim kod treće grupe veća nego kod ženki. U literaturi i praksi se navodi činjenica da je česmenska voda neprikladna za laboratorijska ispitivanja u kliničkoj hemiji već je potrebno njeno prečišćavanje. (Bishop Fody Schoeff

2005.) U zavisnosti od kvaliteta vodovodske vode se upotrebljavaju razne tehnike prečišćavanja za uklanjanje organskih i neorganskih konstituenata vode da bi standardne laboratorijske procedure za merenje raznih parametara u telesnim tečnostima i njihovih egzaktnih koncentracija. Blaga odstupanja u metabolizmu pacova bi mogla biti posledica unošenja određenog tipa vode. Sinteze većine molekula koja se analiziraju u krvi se odvija u jetri, njihova biološka svojstva se u mnogome određuju njihovom interakcijom sa molekulima vode sa kojima je u okruženju. Metabolički procesi u organizmu su povezani svakako sa količinom vode u organizmu, kao i njenim stanjima u interakciji sa organskim i neorganskim konstituentima organizma. Vode različitih hemijskih sastava, i sa različitom strukturom bi mogle imati uticaj na mnogobrojne isprepletane metaboličke funkcije organizma kao i na njihove regulacione mehanizme. Vremenom izlaganja određenoj vrsti vode kod pacova, slično hemijskim analizama kliničkih parametara dolazi do grešaka u metabolizmu koji se sa vremenom akumuliraju i dovode do promena u organizmu. Starenjem dolazi do narušavanja faktora održavanja homeostaze organizma, njegovog imunog i hormonalnog sistema pa promene izazvane raznim sredinskim uticajima mogu biti maskirani naročito na makroskopskom nivou, kao što je morfologija ili biohemijski parametri. Promene u organizmu se dešavaju u početku na molekularnom i atomskom nivou njihove organizacije, tako da su uticaji različitih faktora spoljašnje sredine maskirani. Različiti uticaji spoljašnje sredine u interakciji sa genetskom konstitucijom organizma određuju stepen održavanje homeostaze organizma.

8.3.2. Diskusija dobijenih rezultata sa ljudima sa rezultatima iz literature

Merenja impedance sprovedena na 45 učesnika ukazuju na zavisnost ponašanje kože pod dejstvom naizmeničnog električnog polja od slojevitosti njene strukture. Impedanca kože ispitanika je pokazala zavisnost od sloja kože u zavisnosti od starosnog doba i pola. Orožnali delovi epidermisa pokazuju manji opseg varijabilnosti nego dublji slojevi. Merenjem impedance se otkriva postojanje manjih razlika između orožnalih ćelija, nego kod živih ćelija koje pripadaju dubljim delovima kože. Žive ćelije pokazuju veću biofizičku

raznovrsnost prolaska struje, jer sadrže veliku količinu vode i heterogenije su po svojoj strukturi. Individualne specifičnosti kože se mogu odrediti jasnije u opsegu frekvencija od 10 kHz jer na njima u odzivu učestvuju i dublji slojevi. Snimanjem koje je sprovedeno na frekvencijama do 10 kHz je omogućeno merenje svojstava samo stratum corneum. Rezultati svih ispitivanih grupa ukazuju da se merenjem impedance kože može utvrditi biofizičko stanje kože. Rezultati istraživanja ukazuju da je impedanca zavisna od hidratacije kože i stanja vode u korneocitima i nanolipidnim slojevima između njih. Pošto je bioimpedanca kože u zavisnosti od nosilaca naelektrisanja, viskoznosti jonskog rastvora koja je u zavisnosti od temperature, različite vrste voda koji su ispitani pili daju u grubim crtama različite otpornosti kože. (Grimnes Martinsen 2008.) Kako je hidratacija stratum corneuma glavni faktor za svojstva provodljivosti, stanje vode u korneocitima i lipidnim nanolamelama, pored vazdušne vlage, zavisi pored ostalih faktora i od vode koja se unosi u organizam. Kod ispitanika sve tri grupe, što se vidi na dijagramima (47-54), se može uočiti odstupanje provodljivosti unutar i ispod barijere kože, što ukazuje na stanje kožne barijere. Stanje kožne barijere pa i njenih svojstava otpornosti su određeni i organizacijom nanolipidnih slojeva na šta utiče način njihovog formiranja u gornjim slojevima stratum granulozuma gde se počinju istiskivati Oblandova telašca i gde se počinju formirati nanolipidne membrane u interakciji sa molekulima vode čija organizovanost presudno utiče na ovaj proces i stanje hidratacije kožne barijere. Osim dijelektričnih svojstava membranskih sistema disperzija frekvencija izlaznih struja varira i od difuzije jona kao i njihovom interakcijom sa intracelularnim i ekstracelularnim elektrolitima, obe se odvijaju na frekvencijama između 10 Hz i nekoliko desetina MHz što je prikazano na ovim dijagramima. Kod ispitanika svih grupa debljina i sastav kože bitno variraju, pa se zato javljaju varijacije u impedanci ispitanika koji su istog pola približno istog uzrasta i unosili su sličan tip vode u organizam, što se može uočiti na dijagramima impedance (45-59). Pošto temperatura moduliše transepidermalni gubitak vode, što za posledicu ima difuziju jona koji utiču na impedancu ona bi mogla biti i rezultat mikrocirkulacije krvi u dermisu pošto je spoljašnja temperatura kod merenja svih ispitanika bila ista. Kao što se vidi iz

dijagrama (45-59) bioimpedanca može da se koristi za registrovanja promena u ćelijskoj strukturi i ekstraćelijskim membranskim strukturama kože koje su uzrokovane starenjem. Kod starijih ispitanica impedanca, intaktne obezmaščene kože, pokazuje veću otpornost orožnalog sloja kože nego kod osoba koje su mnogo mlađe, dok je otpornost dubljih slojeva kože što se vidi na dijagramima (52) i (54) znatno povećana, otpornost dubljih živih ćelija kože što se navodi i u literaturi. (Grimnes Martinsen 2008.) Površinski slojevi kože zbog upijanja vazdušne vlage poseduju manju otpornost nego ćelije na granici ismeđu stratum granulozum i stratum corneum što potvrđuje profil sadržaja vlage u epidermisu kao i postojanje slojeva korneocita s malom hidratacijom na granici sa živim ćelijama koji sprečava prodor vode u dublje slojeve kože da ne bi došlo do poremećaja ravnoteže elektrolita u organizmu. Kako se navodi u literaturi, vode sa različitim mineralnim sastavima odnosno različitim organizacionim stanjima mogu uticati na obrazovanje i funkcionisanje kožne barijere. Na dijagramima (52) i (54) gde su pretstavljeni ispitanici koji su pili flaširanu odnosno Zrenjaninsku vodu se vide neznatne razlike impedance koje ukazuju da su krive nešto većih vrednosti a nagibi krivih veće kod ispitanika koji su promenili vrstu vode i prešli na flaširanu vodu. Ove razlike u impedanci kao posledica konzumiranja različitih vrsta voda su izraženije i više primetne na dijagramima od (51) do (58) gde su nagibi krivih, njihove vrednosti i kompaktnost različite između ispitivanih grupa i ukazuju da je funkcija kožne barijere zavisna i od mineralnog sastava vode koja se konzumira odnosno od njenih strukturnih svojstava. Električna provodljivost, odnosno otpornost kože je veoma zavisna od mnogih faktora tako da ne može dati jasne informacije o interakciji molekula vode sa biomolekulima, jonima ili stanju vode u nanolipidnim strukturama stratum corneum. Razlika između dve grupe dobrovoljaca postaje očiglenija u stratum corneumu jer ovaj sloj sadrži 8% svih voda epidermisa. (Koruga Miljković Ribar Matija Kojić 2010) Ovaj rezultat ukazuje na ulogu jedne gel faze u stratum corneumu. Domen gel faze može da podrži funkciju barijere dok tečno kristalni kontinuirani domen može da obezbedi fleksibilnost neophodnu za savitljivost kože. (Norlén 2001.)

Svrha ovih istraživanja je razumeti optomagnetske spektre kožnih tkiva i na osnovu opsega i odnosa paramagnetnih i dijamagnetnih domena i njihove dinamike ustanoviti svojstva molekula vode u tkivima naročito epidermalnom sloju kože i njihov uticaj na biomolekule.

Metoda opto-magnetnog fingerprinta je sprovedena na 20 ispitanika i dala je rezultate koji omogućavaju određen stepen klasifikacije voda koje su ispitanici pili prema uticaju na kožnu barijeru posebno na nanolipidne strukture. Sve promene u refleksiji uzorka su se odvijale u karakterističnoj oblasti, talasnih dužina od 100 do 160 nm (ili spektralnog prozora) u kojoj su sadržane sve specifične opto-magnetske informacije koje omogućuju klasifikaciju uzoraka. Najizrazitije veličine na dijagramu su odnosi maksimalnog i minimalnog refleksionog intenziteta, koji kao magnetna osobina utiče na odnos paramagnetnih i dijamagnetnih osobina uzoraka. Sledeća bitna veličina, koja se može uočiti na dijagramu, je površina ispod dela dijagrama sa pozitivnim vrednostima odnosno negativnim, koja označava paramagnetnu, dijamagnetnu oblast. Na ovaj način je u dijagramu uskladištena informacija o refleksionim osobinama kože (u okviru ispitivanog opsega vrednosti talasnih dužina) koje postoje u širokom opsegu vrednosti i pružaju uvid u nepredvidivu dinamiku ponašanja kože i specifičnih stanja vode u njoj, koja odslikava velike fiziološke i anatomske razlike u kožnoj barijeri. Koža je zaista nespecifičan sistem koji je anizotropan u svim pravcima sa raspoređenim parametrima električnih i magnetnih osobina, specifičnih opsega frekvencija ($> 1\text{kHz}; > 10\text{kHz}$) odnosno gradijenta magnetnog polja $\Delta\text{grad}F_{\text{mag}} \approx 2-75^\circ$. OMF spektar zdrave kože ispitanika pokazuje brojne specifičnosti u zavisnosti od toga koju su vodu pili. Pikovi su različito raspoređeni u odnosu na razlike intenziteta talasnih dužina što ukazuje na različite interakcije svetlosti i materije koje nastaju u različitim fizičkim i hemijskim opsezima struktura i sastava. Na osnovu tipičnih dijagrama moguće je razlikovati kožna tkiva ispitanika koji su pili različite vrste voda. OMF može biti korišćen kao uspešan metod za kvantitativno opisivanje magnetnih svojstava tkiva i po mogućnosti klasifikovanje različitih tkiva kože na bazi njihovih optomagnetnih svojstava. (Koruga Tomić Ratkaj Matija 2006.) Kako se

pojavljuje veliki broj mogućih kombinacija talasnih dužina, konvolucionni spektri mogu izdvojiti različite osobine materijala koje su na određen način povezane sa prostornom raspodelom elektrona, elektronskih orbitala, kao i intenzitetom veze (kovalentna, vodonična, jon-dipol i dr.). Ovaj metod zapravo predstavlja optomagnetnu digitalnu spektroskopiju materijala, sa rezolucijom od 1 nm u plavoj i do 2 nm u crvenoj svetlosti. Svetlosne karakteristike izvora različito su modifikovane, ali svaki od ovih ekrana ima neku spektralnu karakteristiku osobenu za kožu, jer ovaj metod radi na molekularnom nivou i karakterizuje polimernu prirodu komponenti kože. OMF dijagram kože sadrži amplitude polarizovane i nepolarizovane svetlosti i položaj maksimuma odnosno minimuma u konvolucionim dijagramima zbog različitih konformacionih stanja biomolekula zbog njihove interakcije sa vodom i strukturnim stanjima nanolipidnih struktura. Polarizovana bela svetlost otkriva fine razlike između biopolimera i lamelarnih struktura kože koji su nastali usled interakcije sa vodom različitog jonskog sastava odnosno različite dinamike paramagnetskih i dijamagnetskih svojstava. Posmatranje slika, dobijenih snimanjem kože, golim okom ne otkriva nikakve razlike između njih. Međutim korišćenjem kompjuterske analize piksel po piksel, brojanjem i spektralnim konvolucionim algoritmom nađene su značajne razlike i dati su u odgovarajućim dijagramima (16-39).

U datim dijagramima možemo primetiti broj pikova, pozicije pikova (talasne dužine) distribucija pikova (gore i dole) i intenzitet individualnog pika. Na osnovu ovih karakteristika je moguće uočiti razlike u koži usled konzumiranja različitih vrsta voda. Intenziteti kao i razlike u talasnim dužinama se razlikuju između različitih slojeva kože nakon uklanjanja jednog dva ili tri sloja pokožice, kao i na uklonjenim pokožicama koje su zaostale na flasterima. Generalno gledano ispitanici koji su sa Zrenjaninske vode prešli da piju flaširanu vodu poseduju povećane vrednosti pozitivnih pikova i njihovih površina u poređenju sa onima koji su nastavili da piju Zrenjaninsku vodu. Takođe se može primetiti povećanje vrednosti i negativnih pikova u nultom kao i ostalim slojevima kože nakon uklanjanja jednog drugog i trećeg sloja pokožice. Kod

ispitanika koji su pili flaširane tipove voda se primećuje trend povećavanja intenziteta pozitivnih i negativnih pikova sa dubinom kože dok se dijagrami pokožice ujednačuju. Kod ispitanika koji su pili Zrenjaninsku vodu su manji intenziteti pozitivnih pikova u svim slojevima kože i intenziteti svih pikova su postojani u svim slojevima kože, takođe slojevi pokožice koji su zaostali na flasterima pokazuju heterogenost. Kod ispitanika koji su pili flaširane tipove voda se dijagrami flastera ujednačuju tako da svi nalikuju jedni drugima. Dijagrami svih ispitanika se razlikuju, kao i dijagrami slojeva kože i slojeva pokožice koja je zaostala na flasterima. Može se primetiti da je kod mlađih ispitanika intenzitet kao i površina pikova u svim slojevima kože postojana neznatno se menjaju u zavisnosti od slojeva kože. Kod mlađih muških ispitanika se intenzitet pikova sa slojevima kože smanjuje a u isto vreme se menja njihov odnos, opadaju vrednosti i površine pozitivnih pikova dok u trećem sloju kože negativni pikovi postaju veći od pozitivnih. Kod ženskih ispitanika su u svim slojevima intenziteti i površine pikova postojani sa dubinom slojeva kože. Kod starijih ispitanika vrednosti pikova ostaju približno isti mada nakon uklanjanja prvog sloja pokožice naglo padaju da bi kasnije bili dosta ujednačeni. Na površinskim slojevima keratinocita se uočavaju najmanje promene između ispitivanih grupa što nije iznenađujuće sa obzirom da su površinski slojevi keratinocita pod uticajem spoljašnje vlage. Ovaj površinski sloj kože je i pod uticajem vode iz donjih slojeva kože, u slučaju konzumiranja Zrenjaninske vode mnogo je veći drugi glavni negativni pik nego ako piju flaširane vode, zatim sporedni drugi pozitivni i negativni pik nestaju, drugi glavni negativni pik se pomera ka većim talasnim dužinama a intenzitet drugog glavnog pozitivnog pika raste. U nanolipidnim slojevima ispitanika, koji su menjali tip vode za piće se uočavaju najveće promene u paramagnetskim i dijamagnetskim svojstvima kao posledica interakcije molekula vode sa lamelarnim lipidnim strukturama za čije je formiranje od presudnog značaja organizacija vode u stratum granulozum. U dubljim slojevima pokožice nakon uklanjanja površinskih slojeva je primećen veći intenzitet i površina pozitivnih pikova, smanjenje površine i intenziteta negativnih pikova. Kod ispitanika koji su pili Zrenjaninsku vodu pikovi se pomeraju ka većim talasnim dužinama a kod ispitanika koji su pili

flaširane vode se povećavaju intenziteti i pozitivnih i negativnih pikova. Sporedni pozitivni pikovi su kod ispitanika koji su pili Zrenjaninsku vodu pomereni ka većim talasnim dužinama dok je kod ispitanika koji su pili flaširanu vodu sporedni negativni pikovi pomereni ka manjim talasnim dužinama. U donjim slojevima kože nakon uklanjanja tri sloja pokožice se primećuje da je glavni pozitivni pik manji kod ispitanika koji su pili Zrenjaninsku vodu dok su svi ostali pikovi glavni i sporedni veći kod ispitanika koji su pili flaširanu vodu. Kao posledica konzumiranja raznih voda javlja se različiti odgovor u tkivu pokožice, kod ispitanika koji su pili Zrenjaninsku vodu su OMF dijagrami kože, više haotični manjih dijamagnetskih vrednosti naročito u nanolipidnim slojevima između keratinocita. Epidermis kože ispitanika koji su promenili vodu za piće pokazuje OMF dijagrame koji ukazuju na veće pravilnosti naročito u nanolipidnim slojevima kao i veću dinamiku paramagnetskih i dijamagnetskih svojstava. Promena talasnih dužina dobrovoljaca koji su promenili tip vode ukazuje da koža dermis i subkutis zadržavaju vodu duže od tri meseca pretpostavljamo da je voda u koži mešavina Zrenjaninske i flaširane vode i prodiru kroz bazalnu membranu. Interakcija vode i lipida naročito u stratum granulozum i stratum corneum su naročito fundamentalni za svojstva kože. Vodonične veze vode čine mrežu sa prisutnim polarnim grupama lipida. Ovi lipidi koji se oslobađaju u stratum granulozum i čine dvoslojeve u stratum corneumu se sastoje uglavnom od ceramida, holesterola i slobodnih masnih kiselina. Na površini kože polarni lipidi su sposobni da formiraju lamelarne i heksagonalne faze u prisustvu viška vode odgovarajuće strukture. (Wertz 2000.) Tečna uređena faza poseduje oba svojstva gel faze i tečnokristalaste faze. Ove mešavine faza i osobine slojeva kože zavise od mnogo faktora od kojih su dominantni: starost, pol tip kože, ishrana i tip vode.

Važna funkcija kože je zaštita od gubitka vode iz organizma. (Garidel 2006.) TEWL je proces pasivne difuzije, pokrenut negativnim pritiskom isparavanja vodene pare, kroz kožu. Orožnali sloj je izuzetno važan faktor koji ograničava stopu transporta vode ka spoljašnjosti. Jedinstvena organizacija hidrofilnih ćelija unutar lipidnog, hidrofobnog okruženja čini keratinozni sloj

10-20 μm posebno efikasnim kao barijeru. Voda koja se zadržava u epidermisu se smanjuje kod starijih ispitanika u poređenju sa TEWL vrednostima u odnosu na ispitanike srednje dobi. Nađeno je da značajna razlika postoji između ove dve grupe ispitanika u stratum granulozum. Postoji razlika u svojstvima kože koji su promenili Zrenjaninsku vodu i prešli na flaširanu vodu. Značajna razlika je nađena u središnjem delu stratum granulozum, gde postoje voda lipidi nanoslojevi. Ovi rezultati ukazuju na važnost nano slojeva vode koji su prisutni u epidermisu i tipu vode za piće koji se reflektuje u svojstvima ljudske kože. Debljina epidermisa je prosečno oko 200 μm i debljina joj varira u zavisnosti od lokacije na telu, i može biti do 2 mm debela. Međutim ova debljina takođe varira u skladu sa količinom vode koju epidermis zadržava. Sa starenjem ovi slojevi postaju tanji i gube sposobnost da zadržavaju vodu. Bazalne ćelije, kroz proces prometa, postaju sploštenije i formiraju sloj stratum spinozum sa oko 20 slojeva ćelija koje leže na sloju bazalnih ćelija. Debljina sloja stratum corneuma je od 60 μm do 150 μm , i zadržava oko 35% epidermalne vode. U narednom deljenju ćelija organele kao što su jedro i mitohondrije počinju da se dezintegrišu. Ćelije se sve više ispunjuju keratinskim vlaknima i sadrže manje intercelularne vode od bazalnih i spinosnih ćelija. Međutim ovaj sloj zvan stratum granulozum, je oko 5 μm debeo i poseduje veoma uređenje lipid-voda nanoslojeve, od 5 do 20, u zavisnosti od stanja kože. Slojevi vode su tanki od 20 do 50 nm. Dramatična situacija u slojevima stratum granulozum gde je razlika mlade i stare kože izuzetno značajna. Takođe ovi rezultati ukazuju na ulogu pojedinačne gel faze u stratum corneum. Domeni gel faze bi mogli podržati funkciju barijere, gde kontinuirani tečno kristalasti domen bi mogao da obezbedi fleksibilnost neophodnu za savitljivost kože. Interakcija lipida i vode je fundamentalna za sva telesna tkiva, ali za kožu poseduje specijalan značaj. Svaki molekul vode je u mogućnosti da se veže za četiri suseda. Vodonične veze vode čine mrežu sa polarnim grupama lipida. Lipidi stratum corneuma se sastoje uglavnom od ceramida, holesterola i masnih kiselina. Na površini kože polarni lipidi su sposobni da formiraju lamelarne ili heksagonalne faze u prisustvu viška vode. Tečna uređena faza poseduje oba svojstva: gel faze i tečne kristalaste faze.

Mešavine faza i svojstva slojeva kože su zavisni od mnogih faktora ali su dominantni: starost, pol i tip kože.

OMF voda koje su korištene u eksperimentima pokazuju uočljive razlike svoje paramagnetne/dijamagnetne dinamike. Demi voda pokazuje pikove većeg intenziteta kako pozitivnih tako i negativnih dok su kod Beogradske vode nešto niži naročito prvi pik dok pozitivni pikovi kod ove vode rastu ka većim talasnim dužinama dok negativni pikovi obrnuto opadaju. Zrenjaninska voda pokazuje različita svojstva, pozitivni pikovi su nešto manji i dosta ujednačeni a negativni pikovi opadaju, prvi negativan pik ove vode je upadljivo najveći od svih dijagrama, drugi glavni pik je daleko manjeg intenziteta dok pomoćni pikovi ne postoje. Odnos dijamagnetskih i paramagnetskih svojstava vode je povezan sa sastavom ispitivanih voda, u slučaju demi vode su izraziti i pozitivni i negativni pikovi koji rastu ka većim talasnim dužinama, površine pozitivnih oblasti dijagrama su najveći od svih dijagrama. Beogradska voda pokazuje manji intenzitet pozitivnih oblasti dok negativne rastu, dok kod Zrenjaninske vode su dominantne negativne oblasti dok je pozitivna najmanja od svih ispitivanih voda. Ova dinamika paramagnetskih i dijamagnetskih osobina različitih tipova ukazuje na različitu dužinu vodoničnih veza i stvaranje i razrušavanje klastera kao posledica njihove razgradnje i stvaranja u interakciji sa konstituentima. (Koruga Miljković Ribar Matija Kojić 2010.)

NIR Spektroskopija vodenog sistema sa vodom kao zajedničkim imeniocem obezbeđuje dobijanje informacija na molekularnom nivou. Kao što se vidi iz dijagrama 16-18 i akvagrama sa slika 8 i 10. Različite konfiguracije vode karakteristične za demi, Beogradsku i Zrenjaninsku vodu, sa dimeri, trimeri, različite asocijacije molekula vode, solvatacioni omotači kako je poznato doprinose veoma specifično NIR spektru vode. Kako su ove konfiguracije veoma osetljive na sastav i naelektrisanje rastvorenih molekula ili klastera dobijaju se podaci (akvafotomi sa karakterističnim apsorpcionim trakama) NIR spektar vode je nađeno da sadrži značajne informacije o rastvorku. NIR vode spektralni obrazac opisuje matriks vode u veoma velikim detaljima i u odnosu na ostale molekule u rastvoru. Interakcija voda svetlost opisuje spektralni obrazac i

reflektuje ostatak molekula u rastvoru kao vodeno ogledalo na molekularnom nivou. (Tsenkova 2007.) Akvagram Beogradske vode ukazuje na postojanje karakteristične mreže vodoničnih veza koja je zavisna od njenih rastvoraka. Zrenjaninska voda je osobena po većem sadržaju organskih i neorganskih materija što se na spektrima može uočiti pod raznim poremećajima kroz izrazite pikove ne samo slobodnih molekula vode, trimera vode nego kroz izrazito povećanje većih nepravilnih struktura vode, solvacionih omotača i malog broja malih klastera i slobodnih molekula vode.

9. ZAKLJUČAK

9.1. Uočen je mnogo veći značaj vode u odvijanju bioloških procesa nego što se do sada smatralo. Zbog toga je potrebno pored genomike i protinomike uvesti u nauku pojam aquaomiku.

Sa uvećanjem aktivnosti ljudske populacije povećava se nivo degradacije vode. Voda postaje od sve većeg interesa zbog njene sve veće oskudice, potrebno je obezbediti njen kvantitet i kvalitet, kako voda postaje oskudnija i vrednija. Kvalitet vode je potrebno poboljšati, ne samo na tradicionalan način uklanjanjem organskih materija, živih bića, ili popravljanjem njenog hemijskog sastava nego i poboljšanjem i održavanjem njene strukture odnosno delovanjem na mrežu vodoničnih veza koja je u stalnoj interakciji sa rastvorcima i spoljašnjim poljima sila. Od vode je zavisna sav živi svet na zemlji i najvažniji je konstituent pored ugljenikovih jedinjenja u živim bićima. Sve ćelije i organi zavise od vode i pravilne hidratacije od koje zavisi njihovo funkcionisanje, zdravlje ili bolest. Proučavanje vode sa različitih aspekata i njihove interakcije sa različitim površinama kao i interakcije molekula vode između sebe nameće potrebu da se proučava struktura i funkcija vode na njenom molekularnom nivou.

Naučna disciplina genomika je zasnova na potrebi proučavanja na molekularnom nivou genoma organizama, genetskog mapiranja, heteroze, epistaze i drugih interakcija između lokusa i alela unutar genoma. Istraživanje pojedinačnih gena nije u domenu genomike osim ako je cilj genetička kontrola i funkcionalna informaciona analiza da se rasvetli uticaj gena, mesto i odgovor na unutrašnju mrežu genoma.

Slično proteomika koja se bavi istraživanjem strukture i funkcije proteina, analogna je sa genomikom i kovanica je od reči protein i genom. Posle genomike, proteomike je sledeći stepen u istraživanju bioloških sistema. Mnogo

je komplikovanija od genomike uglavnom dok je genom organizma više ili manje konstantan proteini se razlikuju od ćelije do ćelije od trenutka do trenutka. Proteomika obuhvata praćenje proteoma u pogledu vrste ćelije, bolesnog ili zdravog stanja ili pak tokom različitih faza razvitka organizma. Proteom je podložan neprestanim promenama kroz interakcije s genomom ili spoljašnjim činiocima. Usko su povezane sa biotehnologijom i kompjuterskim tehnologijama. Proteomika i genomika su interdisciplinarne nauke koje povezuje biologiju, hemiju i računarstvo.

Nakon naučnih saznanja o vodi, vodoničnim vezama i njenoj prirodi, samoorganizaciji molekula vode i njenoj simulaciji ukazuje se potreba za proučavanjem životnih fenomena, u osnovi kojih je intrakcija molekula vode sa genomom i proteomom živih bića, aquaomika, kovanica od aqua i genomika odnosno proteomika. Ova nova naučna disciplina bi proučavala interakcije molekula vode sa biomolekulima (pre svega genomom i proteomom) i drugim neorganskim molekulima, jer na nivou molekularne organizacije živih bića počinju najranije patološke promene, pa bi njihovo otkrivanje i lečenje u najranijoj fazi, kao i razumevanje mehanizma njihovog nastanka bili od naročitog značaja za poboljšanje kvaliteta života ljudi.

9.2. Došlo se do novih saznanja o transpornim putevima vode u koži, pri čemu je uloga bazalne membrane objašnjena

Kožna barijera počinje sa bazalnom membranom, njena funkcija nije samo da obezbedi potporu, pričvršćivanje i funkcionisanje kao i učestvovanje u fiziologiji germinativnih ćelija nego i da učestvuje u regulaciji prolaska vode ka gornjim ćelijama epidermisa. Molekuli vode samo difuzijom mogu da prođu kroz pore bazalne membrane, koja je spora, i na taj se način razdvajaju dobro hidratizani dermis od slabo hidratiziranog epidermisa. Sa promenom fiziologije organizma kad se ukaže potreba za bržom hidratacijom gornjih ćelija epidermisa organizacija molekula vode je od suštinskog značaja za brzi prolazak vode kroz ovu barijeru. U bazalnoj membrani se takođe vrši strukturisanje vode

što omogućuje lakši prolaz molekula vode kroz akvaporine i tesne spojnice epidermalnih ćelija u slučaju potrebe organizma.

9.2.1. Ostalo

Dermis sa svojom molekularnom organizacijom predstavlja rezervoar vode čitavog organizma ne samo epidermalnih slojeva kože. Voda u epidermisu ne samo da postaje vezana od strane proteoglikana i hijaluronske kiseline nego se i strukturise na kolagenskim fibrilima. Na taj način struktuisana voda lakše preko pora difunduje kroz bazalnu membranu.

Kroz sloj germinativnih ćelija, koje naležu na bazalnu membranu, voda prolazi na dva načina: transcelularno preko akvaparona 3 i paracelularno preko tesnih spojnica. Oba načina prolaska su zasnovana na prolazu individualnih molekula vode na kontrolisan način i odvijaju se osmotskim procesom. Geometrijski pravilne male skupine molekula vode klasteri, lakše prolaze kroz ove prepreke, nego veće nepravilne nakupine molekula vode. Na granici germinativnog sloja epidermalnih ćelija i mrtvih orožnalih keratinocita voda ima značajnu ulogu u obrazovanju nanolipidnih lamela koje okružuju keratinocite i imaju suštinski uticaj na drastično smanjenje količine vode u površinskom orožnalom sloju epidermisa. Ovaj deo epidermisa je sa najmanjom količinom vode da ne bi došlo do prodora vode iz spoljašnjosti kroz kožnu barijeru što bi narušilo elektrohemijsku homeostazu organizma. TEWL svakako zavisi od stanja nanolipidnih slojeva u epidermisu, njegovog obrazovanja u interakciji sa molekulima vode, koja zavisi od lokalne mreže vodoničnih veza i njene dinamike.

9.3. Definisana je biološka vrednost vode kao rezultat multi faktorske systemske analize uloge vode u funkcionisanju organizma

U zavisnosti od nivoa organizacije živih bića mogu se sagledati različiti aspekti biološke vrednosti vode. Na makroskopskom nivou biološka vrednost

vode je svakako zavisna od prisustva živih bića u njoj, koji mogu dovesti do bolesti odnosno poremećaja biološke homeostaze u organizmu i možemo je iskazati kao biološka vrednost vode. Na ovom nivou voda u živim bićima ima ulogu transportnog medijuma, pa sa sobom može doneti patogene organizme, učestvuje u različitim metaboličkim procesima, poseduje svojstva bitna za termoregulaciju, učestvuje u podmazivanju. Na makroskopskom i mikroskopskom nivou organizacije i funkcionisanja organizma od hemijskog sastava vode zavise fiziološke funkcije organizma, bilo da je koncentracija rastvorenih jona veća ili manja od optimalne za odvijanje fizioloških funkcija organizma, tj. njena hemijska vrednost.

Od hemijskog sastava vode svakako zavisi unos mikroelemenata u organizam, mada se najveća količina unosi u organizam ishranom, rastvorene materije u vodi u povećanim koncentracijama deluju kao otrovi. Voda na ovom nivou učestvuje u metabolizmu, razgrađuje se iznova sintetiše, transportuje različite metabolite i predstavlja medijum u kom se odvijaju enzimske reakcije.

Na molekularnom nivou vrednost vode se ispoljava kroz njenu organizovanost i dinamiku njenih vodoničnih veza koja utiče na procese hidratacije, dehidratacije, rastvorljivosti i jednostavno njenih anomalnih osobina koje su suštinski značajne za odvijanje svih životnih procesa. Na ovom nivou voda učestvuje ne samo u funkcionisanju nego i obrazovanju struktura živih bića, pa se usled interakcije sa faktorima spoljašnje sredine pojavljuju prvi znaci narušavanja na molekularnom nivou što su najraniji početci bolesti.

9.4. Dadata je nova sistemska analiza uloge vode kod starenja i došlo se do novih saznanja o ulozi vode kod starenja

Starenjem se menja količina vode u ćelijama organizma, narušava se kroz interakciju sa raznim spoljašnjim i unutrašnjim faktorima, njena organizovanost. Voda unutar ćelije oko bioloških polimera, postaje sve više u vezanom stanju, manje izmenljiva sa okolnom bulk vodom pa zajedno sa ostalim

mehanizmima starenja utiče na smanjenje proliferativne sposobnosti ćelija, sposobnosti da održi svoju homeostazu, smanjene sposobnosti da odstrani toksične materije, da unesu hranljive materije i kiseonik kao i sposobnosti da komunicira sa ostalim ćelijama organizma. Unošenjem klasterisane odnosno vode koja brže može proći kroz akvaporine ili kroz ćelijske spojnice se omogućuje efikasnije regulisanje životnih funkcija ćelije pa usled toga produžiti životni vek organizma. Posledica smanjenja količine vode u ćeliji vodi ne samo do nakupljanja toksičnih materija, pre svega aktivnih radikala, nego i povećanja konkurencije za molekule vode između različitih molekula, zbog te konkurencije dolazi do nepravilne konformacije, molekuli prilikom nepotpune interakcije sa vodom zauzimaju stanje sa većom slobodnom energijom odnosno ne odgovarajućom konformacijom, što vodi u nefunkcionalnost i smrt. Brzina interakcije vode i proteina je od suštinskog značaja ne samo za njegovu konformaciju nego i za funkcionisanje jer su njegove funkcije povezane sa procesima hidratacije i dehidratacije da bi obavio neku funkciju.

9.4.1. Ostalo

Tokom embrionalnog razvića, nakon rađanja i kasnije tokom odrastanja dolazi do opadanja količine vode u organizmu i tkivima kao i promena odnosa ćelijske i vanćelijske vode. Za intezivne razvojne procese u embrionalnim ćelijama i njihovu proliferativnu aktivnost struktura vode i njena brza izmenljivost su od krucijalnog značaja. Ćelije embriona kao i tkiva posteljice posebno njen sloj trofoblast strukturišu vodu koja se nalazi u krvi majke bez obzira kako je narušena njena struktura odnosno klasterisanost. Tokom embrionalnog razvoja sa diferencijacijom tkiva embriona i posebno nakon rođenja energetska cena održanja molekula vode u organizovanom stanju, pored destruktivnih uticaja spoljašnje sredine koji je narušavaju je suviše velika i preusmerava se ka mehanizmu održanja vrste odnosno jedinke ili prosto dužine života same jedinke.

Organizovanost molekula vode i dinamika njenih vodoničnih veza su u molekularnoj osnovi nastanka bolesti koje započinju narušavanjem funkcija

ćelije na molekularnom nivou remeteći normalno funkcionisanje njenih konstituenata. Voda ima ključnu ulogu u komunikaciji između ćelija organizma, njeno narušavanje pod dejstvom faktora spoljašnje sredine ima udela u narušavanju procesa ćelijske komunikacije, mehanizam proliferacije i apoptoze, hormonalni i imuni sistem. Voda kao ključni deo ćelije ima udela u prenošenju i realizaciji komunikacije, prenosa informacija tokom replikacije DNKa, prenošenja informacija na proteine, njihovo funkcionisanje, i razne signalne procese unutar same ćelije njihovo narušavanje dovodi do nekontrolisane deobe, smrti ili disfunkcionalnosti.

9.5. Primena opto-magnetnog fingerprinta kod karakterizacije slojeva kože i vode u slojevima

OMF spektar pokazuje sprovedena istraživanja kože, in vivo, novom nanotehnološkom metodom. OMF snimci ukazuju na to da koža predstavlja biofizički sistem izuzetnog opsega raznolikosti, čija su ispitivanja ukazala na nove bazične osobine ispoljene pod uticajem različitih vrsta voda. Opto-magnetni spektri su omogućili uvid u skup informacija karakterizacijom u opsegu vidljive svetlosti i ukazali na opseg razlika talasnih dužina od 100-160 nm kao ključan u donošenju procene biofizičkog stanja kože. OMF metodom se dobijaju informacije o biofizičkim promenama slojeva kože pod uticajem voda različitih mineralnih sastava i klasterizacije. Na ovaj način se mogu dobiti informacije za određivanje biološke vrednosti vode. Rezultati istraživanja svojstava ljudske kože za region unutrašnje podlaktice se uočavaju razlika dva tipa voda za piće što ukazuje da tip vode poseduje uticaj na svojstva kože. Otkrivene su značajne razlike u središnjem delu stratum granulozuma, kad su uklonjeni kompletni stratum corneum i oko 50% ćelija stratum germinativum, gde nastaju voda lipid pod slojevi, što ukazuje na važnost prisustva nanoslojeva vode u epidermisu i tip vode koja se pije što se reflektuje na svojstva kože čoveka. Za ovaj region i OMF spektar i bioimpedanca pokazuju razlike u svojstvima kože za dva različita tipa voda za piće. Ovo jasno ukazuje da tip vode za piće utiče na svojstva kože. Pošto OMF metod može veoma dobro

determinisati paramagnetska/dijamagnetska svojstva kože što ukazuje da ovaj metod i molekularni pristup istraživanja svojstava kože može biti obećavajuće polje istraživanja u biomedicini, posebno dermatologiji i ocenjivanju biološke vrednosti vode za piće.

9.6. Primena AFM u karakterizaciji skinutih slojeva kože

Koža mlađih ispitanika zadržava dobro vodu u svim epidermalnim slojevima. Na površini kože, impedanca kao i OMF su približno slični između mlade i stare kože, razlike postaju očigledne u središnjem delu stratum granulozum, zato što ovaj sloj sadrži između lipidnih dvoslojeva vodu koja je u uređenim nanoslojevima. Sa starenjem dolazi do narušavanja funkcije barijere kože usled narušavanja organizacije nano voda lipidne strukture što dovodi do stanjivanja ovog sloja. AFM metodom se može utvrditi topologija i debljina uzoraka kože u zavisnosti od tipa vode koja je konzumirana. Vode različitih tipova koje se konzumiraju dovode do povećanja ili smanjenja debljine stratum granulozum u delu obrazovanja slojeva nano voda lipidni dvosloj što dovodi do narušavanja funkcije barijere kože i uopšte svojstava kože.

9.7. Identifikacija različitog ponašanja slojeva kože sa aspekta paramagnetizma dijamagnetizma u prisustvu različitog tipa vode u datom sloju

Metodom OMF je moguće karakterisati različite slojeve kože, ustanoviti u njima dinamiku dijamagnetizma i paramagnetizma vode. U zavisnosti od građe kože voda se ponaša na razne načine u zavisnosti od sloja u kome se nalazi tokom sazrevanja i diferencijacije korneocita. U zavisnosti od organizacije molekula vode koji se konzumira, slojevi korneocita daju različite OMF spektre na osnovu kojih se mogu dobiti podaci o biološkoj vrednosti vode. Različiti nanolipidni slojevi u epidermisu kože pod uticajem različitih tipova voda pokazuju da dolazi do specifičnog odgovora ovih slojeva na prisustvo voda različite organizacije.

9.8. Ispitivanja uticaja voda različitog sastava na potomstvo (pacova)

Različiti tipovi voda imaju uticaja na embrionalni razvoj jedinki, pored ostalih faktora determinišu pre svega plodnost a zatim utiču i na sam embrionalni razvoj. Mogućnost embriona kao i same posteljice su ograničenih kapaciteta da strukturisu vodu pa je razviće jedinke pod uticajem različitih vrsta voda. Nakon rađanja mladunci pacova poseduju veću osetljivost metadolizma na različite vrste voda kako zbog samog izlaganja različitim tipovima voda tako i zbog dužeg izlaganja tokom života. Strukturisane vode pokazuje značajnu normalizaciju parametara krvi, tako da mladunci poseduju znatno normalnije parametre krvi, za razliku od nestrukturisane vode koja nema uticaja na normalizaciju parametara krvi.

9.8.1. Ostalo

Metodom impedance kože se može u grubim crtama odrediti stanje vode u njenim slojevima. Ova metoda nam može dati informacije pre svega o količini vode u koži kao celini i u njenim pojedinim slojevima. Ljudi različite starosti, pola i kao posledica njihovog različitog genotipa i sredinskih faktora mogu imati različite količine voda u slojevima kože odnosno različitu otpornost. Metoda impedance kože je komplementarna OMF metodi i zajedno ukazuju na biološku vrednost vode u koži. Karakterisanje epidermalnog sloja kože bioimpedancom kao i OMF može poslužiti za uspostavljanje biološke vrednosti vode koja se pije u koži. Karakterizacijom epidermalnog sloja kože OMF spektrom i bioimpedancom može se ustanoviti biološka vrednost vode koja se pije u koži.

Ispitivanje biohemijskih parametara krvi pacova, grubo ukazuju na uticaj različitih tipova voda na biohemijske funkcije u organizmima, pre svega fiziologiji jetre i endokrinog sistema. Vode različite strukturisanosti utiču na metaboličke funkcije organizma na molekularnom nivou. Metabolizam je pod uticajem različitih faktora, kako sredinskih tako i naslednih, pošto je uticaj vode

maskiran svim ovim različitim faktorima odgovor organizma na razne tipove voda je nespecifičan.

Pacovi su pili različitu količinu vode u zavisnosti od njene strukturisanosti. Najmanje su pili stabilizovanu strukturisanu vodu, mnogo su više pili nestabilisanu strukturisanu vodu dok su najviše pili vodovodske vode pogotovo Zrenjaninjsku vodu. Strukturisana voda je u manjoj količini zadovoljila žeđ i omogućila hidrataciju organizma dok je Zrenjaninske vode potrebno više da bi životinje zadovoljile žeđ i postigle hidrataciju svog organizma.

Naučni doprinos teze:

1. Skup primenjenih metoda OMF, AMF i bioimpedance pružio je značajnu količinu međusobno komplementarnih informacija o biofizičkim stanjima kože kao posledice unošenja različitih vrsta vode. Svi podaci koji su sakupljeni primenom raznih metoda (bioimpedanca 150 str., OMF 164 str. i AMF 172 str.) ukazali su na određene specifičnosti kože kao biološkog uzorka i njene interakcije sa vodama različitog mineralnog sastava i strukture koje ranije nije bilo moguće sagledati a koje su, dodatno, ukazale na promene koje je potrebno uvesti u eksperimentalni i naučni postupak kako bi rezultati istraživanja predstavljali objektivniji prikaz stvarnog biofizičkog stanja kože. Metodom OMF kao što se vidi iz dijagrama (16-41) se mogu uočiti razlike između optičkih svojstava kože kako starijih i mlađih ispitanika, muških i ženskih ispitanika tako i ispitanika koji su pili Zrenjaninjsku i flaširane tipove voda gde je uočena najveća razlika u stratum granulozum u intenzitetu kao i razlici u talasnim dužinama što ukazuje na razliku ne samo mineralnog sastava nego i dinamici molekula vode i njenih asocijacija. Za ovaj region i OMF spektar i bioimpedanca (dijagrami 45-59) pokazuju razlike u svojstvima kože za dva različita tipa voda za piće. Ovo jasno ukazuje da tip pijaće vode utiče na svojstva kože. Ovi fenomeni su prvi put primećeni i moguće je karakterisati kožu u zavisnosti od tipa voda koje su konzumirane.

2. Sagledavanje interakcije molekula vode na graničnim površinama, ponašanja voda sa različitim strukturama, uticaj vode koja se konzumira na organizaciju voda unutar ćelije odnosno organizma omogućuju novi uvid u vrednovanje voda, ne samo da postoje biološke i hemijske karakteristrike voda nego se u svetlu novih saznanja o vodi na molekularnom nivou, prirodi vodoničnih veza u formulu za određivanje vrednosti voda treba razmatrati i strukturu vode odnosno njenu klasterizaciju. Pronađeno je da novim metodama OMF i akvafotomiksom, na osnovu interakcije vidljive odnosno infracrvene svetlosti sa valentnim elektronima je moguće uočiti razlike u spektrima Zrenjaninske, Beogradske i Demi vode kao posledice njihovih različitih mineralnih sastava i vodenih struktura što se po prvi put uočilo u OMF dijagramima (42-43) gde se može uočiti zavisnost dijamagnetskih/paramagnetskih osobina različitih tipova voda u zavisnosti od njihovog mineralnog sastava. Na akvagramima (8 i 10) Prvi overtone vode na 1300 do 1550 nm pokazuje razlike u mreži vodoničnih veza kao posledice različitog mineralnog sastava kao i različite prošlosti vode iz Beograda i Zrenjanina. Ovi metodi po prvi put omogućuju egzaktnu karakterizaciju voda na nano nivou.

3. Voda kao rezultat multi systemske analize može biti uključena u razmatranje i kao faktora koji utiče na starenje organizma. Zajedno sa različitim mehanizmima, genetskim i stohastičkim priroda vodoničnih veza omogućuje molekulima vode da budu jedan od glavnih mehanizama na molekularnom nivou koji u sprezi sa ostalim mehanizmima deluje ne samo na razviće nego i starenje organizma u celini kao posledice disfunkcionalnosti ćelija, kancerogeneze, pojave bolesti i na kraju smrti. Različiti tipovi voda utiču na nastajanje i funkcionisanje lipidno vodenog kompleksa tj. lamelarnih membrana u stratum granulozum i stratum corneum, što utiče na njegovu funkciju kao i starenju kože. Postoji zavisnost između dužine unošenja vode određene strukture i odnosa paramagnetizma/dijamagnetizma u tkivima kože čoveka pre svega epidermalnoj komponenti lipidnih lamela u lipidno vodenim nanoslojevima. Prvi put je otkriveno da je stratum granulozum kod ispitanika koji su pili Zrenjaninsku vodu tanji, što se dešava i sa starenjem organizma,

dok je kod ispitanika koji su pili flaširane tipove voda deblji, a najdeblji kod mladog ispitanika koji je konzumirao flaširane vode.

4. Uvođenjem nove naučne discipline aquaomike se omogućuje precizniji uvid u interakciju genotipa i vode u prenosu informacija na proteine i njihove interakcije sa molekulima vode da bi ostvarili svoju biološku funkciju. Ovaj novi pristup u svetlu novih saznanja o vodi omogućuje uvid o dejstvu raznih polja sila na proces prenosa informacija na raznim nivoima i vremensku i prostornu organizaciju proteoma u ćeliji i čitavom organizmu. Naj raniji znaci pojave patoloških stanja su mogući da se otkrivaju i prate na nivou atoma i molekula kao i interakcija sa raznim poljima sila koja ih može izazivati remeteći proces prenošenja informacija od DNK-a do proteina i njihovu interakciju sa okolinom. Što se po prvi put može primetiti u OMF dijagramima kože ispitanika na dijagramima ispitanika (16 do 49) a naročito stratum germinativuma na dijagramu 49.
5. Vode sa različitim strukturama pokazuje različite biološke efekte, različitu hidrataciju, drukčiju interakciju sa vezanom vodom bioloških struktura i biološkim tečnostima. Kao posledica hidratacije, njene brzine i efikasnosti tkiva životinja i koža ljudi su sa različitim sadržajem vode, odnos vezane i slobodne vode je različit usled različitih struktura voda koje se konzumiraju tako da su više ili manje slični mlađim tkivima. Razlike u biološkoj vrednosti Zrenjaninske, Beogradske i flaširanih tipova voda su prvi put otkriveni, što se naročito vidi na OMF dijagramu (41) gde je prvi put otkriveno da u prozoru od 100-160 nm prvi pik, nakon skidanja trećeg sloja kože, kod ljudi koji su pili Zrenjaninsku vodu opada dok sa prelaskom na flaširane tipove voda raste.
6. Razviće životinja se odvija različito kod jedinki u zavisnosti od tipa vode koje su konzumirali, što je u vezi sa strukturom vode, odnosno dinamikom stvaranja i razgradnje klastera vode što je praćeno promenom dijamagnetizma i paramagnetizma vode tj. njene organizacije i dinamike jonsko vodenog kompleksa. Pacovi koji su konzumirali različite tipove voda su više pili ne strukturisane vode iz vodovoda nego oplemenjene vode što se može uočiti iz

tabela (6-10). U različitim stadijumima razvića pacovi konzumiraju različite količine voda, što je po prvi put otkriveno tokom ovih istraživanja.

10. LITERATURA

Ågren, J.; Zelenin, S.; Håkansson, M.; Eklöf, A.-K.; Aperia, A.; Nejsum, L. n.; Nielsen, S.; Sedin, G., Transepidermal Water Loss in Developing Rats: Role of Aquaporins in the Immature Skin, *Pediatric Research*: April 2003 - Volume 53 - Issue 4 - pp 558-565

Bandic J, Koruga Dj, Mehendale R, Marinkovich S, US Pat. App. No. PCT/US2008/050438, Publication No: WO/2008/086311, Publication Date: July 17, 2008.

Beitz E., Agre P, Aquaporins, *Handbook of Experimental Pharmacology* 190, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2009, Berenden H. J. C., Discussion, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B359* (2004) 1266-67.

Berrelheim F. A., Ali S., White O., and Chylack L. T., Freezable and Non-Freezable Water Content of Cataractous Human Lenses, *Investigative Ophthalmology* 6 Visual Science / January 1986 Vol. 27

Bielfeldt S., Schoder V., Ely U., van der Pol A., Sterke J. de, and Wilhelm K.-P., Assessment of Human Stratum Corneum Thickness and its Barrier Properties by In-Vivo Confocal Raman Spectroscopy, Paper presented at the 25th IFSCC Congress 2008, Barcelona, Spain.

Binnig G, Quate CF, *Phys Lett Rev*, 1986; 56(9):930-3.

Bishop M.L., Fody E.P., Schoeff L.E., *Clinical Chemistry*, Lippicott Williams&Wilkins, 2005.

Bouwstra J.A, Thewalt J, Gooris GS, *Biochemistry*, 1997; 36(25):7717-25.

Brandner J. M., Pores in the epidermis: aquaporins and tight junctions, *International Journal of Cosmetic Science*, Volume 29, Number 6, December 2007.

Caffarena E. R. and Grigera J. R., On the hydrogen bond structure of water at different densities, *Physica A342* (2004) 34-39.

Cameron I. L., Kanal K. M. and Fullerton G. D., Role of protein conformation and aggregation in pumping water in and out of a cell, *Cell. Biol. Int.* **30** (2005) 78-85.

Chaplin, M.F., (2004) The importance of cell water, *Science in society*, 24, 42-45.

Charras GT, Horton MA, *Biophys J*, 2002; 82(6):2970-81.

Chuong CM, Nickolo_ BJ, Elias PM, *Exp Dermatol*, 2002; 11(2):159-87.

Chuong CM, et al., *Exp Dermatol*, 2002; 11:159-87.

Coderch L, Lopez O, de la Maza A, *Am J Clin Dermatol*, 2003, 4, 2, 107-29.

Corcery, R.W., 2002. The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids. *Coll. Surf. B* 26, 3-20.

Crepaldi, G., and Nosadini R., R. 1988. Diabetic cardiopathy: Is it a real entity? *Diabetes/Metabolism Rev.* 4:273-288.

Das C., Olmsted P. D. and Noro M. G., Water permeation through stratum corneum lipid bilayers from atomistic simulations, *Soft Matter*, 2009, 5, 4549-4555.

Dillon S. R. and Dougherty R. C., Raman studies of the solution structure of univalent electrolytes in water, *J. Phys. Chem A* **106** (2002) 7647-7650.

Duančić, V. 1983. *Osnove histologije čovjeka*. Medicinska knjiga Beograd-Zagreb.

Dumas M., Sadick N. S., Noblesse E., Juan M., Lachmann-Weber N., Boury-Jamot M., Sougrat R., Verbavatz J. M., Schnebert S., Bonte F., Hydrating skin by

stimulating biosynthesis of aquaporins, *Journal of Drugs in Dermatology*, June, 2007

Dzhemukadhze N.K.. Comparative Phosphatase Histochemistry in Skin Glands of Laboratory and Wild Norway Rats (*Rattus norvegicus*). *Doklady Akademii Nauk*, 2007, Vol. 412, No. 1, pp. 134–136.

Falkenberg C. V. and Georgiadis J. G., Water and solute active transport through human epidermis: Contribution of electromigration, *International Journal of Heat and Mass Transfer* Volume 51, Issues 23-24, November 2008, Pages 5623-5632.

Echlin P, knjiga *Low-Temperature Microscopy and Analysis*, New York and London: Plenum Press, 59-99, 1992.

Eisenbeiss C, Welzel J, Eichler W and Klotz K. 2001, Influence of body water distribution on skin thickness: measurements using high-frequency ultrasound. *Brit J Dermatol*;144:947-951

Fan B. T., Lapluye G. and Gavach C., Potential study of basement membrane, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* Volume 900, issue 2, 30 June 1987, pages 183-190.

Fenske, D.B., Thewalt, J.L., Bloom, M., and Kitson, N., 1994. Model stratum corneum intercellular membranes: ²H NMR of macroscopically oriented multilayers. *Biophys. J.* 67, 1562-1573.

Foot, A. L.; Jonathon D. C. (20 March 2007). "Metacognition in the Rat". *Current Biology* **17** (6): 551-555.

Forbes R.M. Cooper A.R. Mitchell H. H. The composition of the human body as determined by chemical analysis, Downloaded from www.jbc.org by guest, on February 17, 2010

Forslind, B., 1994. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm. Venereol.* 74, 1-6.

Frank, M., and Horowitz S. B.. 1975. Nucleoplasmic transport and distribution of an amino acid in situ. *J. Cell Sci.* 19:127-139

Garidel P., Structural organisation and phase behaviour of a stratum corneum lipid analogue: ceramide 3A, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, 8, 2265–2275 | 2265

Garidel P. and Funari S. S., Molecular Association of Phytosphingosine Ceramides of Type III as Investigated by Synchrotron X-Ray,

http://hasyweb.desy.de/science/annual_reports/2005_report/part1/contrib/47/14140.pdf

Gawkrodger,D.J., *Dermatology*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2003.

Gilchrest,B.A., *J.Am Acad. Dermatol.*, 21, 610- 618, 1989.

Gingras S, Turgeon C, Brochu N, J. *Steroid Biochem Mol Biol*, 2003; 87(2-3):167-79

Givens M H. Macy Icie G., *The chemical composition of the human fetus*, Downloaded from www.jbc.org by guest, on February 19, 2010

Gleeson J. T., Erramilli S., and Gruner S. M., Freezing and Melting Water in Lamellar Structures, *Bphyscal Journal* Volume 67 August 1994 706-712

Gojło E., Smiechowski M., Panuszko A.and Stangret J., Hydration of carboxylate anions: Infrared spectroscopy of aqueous solutions, *J. Phys. Chem. B***113**(2009) 8128-8136

Grimnes M. G., Henriksen S., Karlsen I., *Innov J.,Techn Biol Med*, 1996; 17(3):217-22.

Grimnes S., Martinsen Ø. G., *Bioimpedance & bioelektricity*. Oxford U.K. 2008.

Grimnes M. G, S., Haug E, *Skin Res and Tech*, 1999; 5:179-81.

Gutmann V., Fundamental considerations about liquid water, *Pure Appl. Chem.* **63** (1991) 1715-1724.

Guyton, Medicinska fiziologija, Medicinska knjiga Beograd 2010.

Halle B. and Davidovic M., Biomolecular hidration: from water dynamics to hydrodynamics, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100 (2003) 12135-12140.

Harvey F., Lodish I. [et al.]. *Molecular cell biology*. W.H. Freeman and Comany. New York 2004.

Hasse S, Kothari S, Rokos H, In vivo and in vitro evidence for autocrine DCoH/HNF-1alpha transcription of albumin in the human epidermis. *Exp. Dermatol.*, 2005, 14(3):182-7.

Horowitz, S. B., and Pearson T. W. 1981. Intracellular monosaccharide and amino acid concentrations and activities and mechanisms of insulin action. *Mol. Cell. Biol.* 1:769-784.

Howard, L. D., and Wondergem R. 1987. Effects of anisotomic medium on cell volume, transmembrane potential and intracellular K⁺ activity in mouse hepatocytes. *J. Membr. Biol.* 100:53-61.

Institute of Zoology, Veterinary School Hannover, Deutschland. The hairlet follicle in the wild Norway rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) its morphology and function. *Ann Anat* 1993 feb;175(1):71-6

Ise N. Konishi, T. and Tata, B.V.R. "How Homogeneous are Homogeneous Dispersions? Counterion-Mediated Attraction between Like-Charged Species", *Langmuir* 15 (1999): 4167-4184.

Israelachvili J, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press (1985-2004).

Ivorra A., Solla A., Palacios L., Villa R., Hotter G., Aguilo J., Bioimpedance dispersion width as a parameter to monitor living tissues, *Physiol. meas.* 26. (2005) 1-9

Junqueira LC, Carneiro J. Histologie. 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 1991

Kemenade. van P.M, Water and ion transport through intact and damaged skin, ISBN 90-386-0760-1

Kanerva L., Elsner P., E. Wahlberg Jan, Handbook of occupational dermatology, Springer-Verlag Berlin Haidelberg 2000.

Karadaglić, Đ. 2000. Dermatologija I tom. Vojno-izdavački zavod. Versa press. Beograd.

Khijniak E, Pollack GH, Adv Colloid Interface Sci, 2006; 127:19-27.

King L.S., Yasui M. i Agre P., Aquaporins in health and disease, Molecular medicine today, february 2000 (vol. 6)

Kirschner K. N. and Woods R. J., Solvent interactions determine carbohydrate conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98** (2001) 10541-10545.

Kozono D., Yasui M., Landon King S., and Agre P., Aquaporin water channels: atomic structure and molecular dynamics meet clinical medicine, *J. Clin. Invest.* 109:1395–1399 (2002).

Koruga Đ. int. konf. YUCOMAT-2008, 28,45 (2008).

Koruga Đ., Miljković S., Ribar S., Matija L., Kojić D., Water Hydrogen Bonds Study by Opto-Magnetic Fingerprint Technique, *Acta Physica Polonica* Vol. 117 No. 5 (2010)

Koruga Dj, Tomić A, Ratkaj Z, Matija L, *Mat Sci For*, 2006; 518, 491.

Koruga Dj, Tomic A, System and Method for Analysis of Light-Matter Interaction Based on Spectral Convolution, US Pat. App. No.61/061,852, 2008, PCT/US2009/030347, Publication No: WO/2009/089292, Publication Date: July 16, 2009.

Kostić A. Đ. Osnovi embriologije. Zavod za izdavanje udžbenika Socijalističke Republike Srbije. Beograd. 1968.

Kuempel, D., Schwartzendruber, D.C., Squier, C.A., Wertz, P.W., 1998. In vitro recostitution of stratum corneum lipid lamellae. *Biochim. Biophys. Acta* 1372, 135-140.

Landmann, L., 1986. Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane fusion process, a freeze-fracture study. *J. Invest. Dermatol.* 87, 202-209.

Laforenza U, Gastaldi G, Polimeni M, Tritto S, Tosco M, Ventura Ulderico, Scaffino M F, Yasui Masato, Aquaporin-6 is expressed along the rat gastrointestinal tract and upregulated by feeding in the small intestine, *BMC Physiol.* 2009; 9: 18.

Ling, G. N. A physical theory of the living state: the association-induction hypothesis. Blaisdell Publishing Co., New York 1962.

Ling G. N., *Life at the cell and below-cell level. The hidden history of a functional revolution in Biology*, (Pacific Press, New York, 2001).

Lipowsky R. and Grotehans S., Hidration vs Protrusion Forces Between Lipid Bilayers, *Europhys. Lett.*, 23 (8), pp. 599-604 (1993)

Lu, D., Willard D., Patel I. R., Kadwell S., Overton L., Kost T., Luther M., Chen W., R. Woychik P., Wilkison W. O., and Cone R. D. 1994. Aguti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating hormone receptor. *Nature.* 371: 799-802.

LuY., ParkerK.H andWangW., Effects of osmotic pressure in the extracellular matrix on tissue deformation, *R. Soc. A* 15 June 2006 vol. 364 no. 1843 1407-1422

Mae Wan Ho, *The Rainbow and the Worm*, World Scientific Publishing Co.Pte. Ltd, Singapore 2008g.

Maiti S., P. K. and Bagchi B., Anisotropic and sub-diffusive water motion at the surface of DNA and of an anionic micelle CsPFO, *J. Phys.: Condens. Matter* **17**(2005) S4317-S4331.

Makarov V., Andrews B. K., Smith P. E. and Pettitt B. M., Residence times of water molecules in the hydration sites of myoglobin, *Biophys. J.* **79** (2000) 2966-2974. V. 35. 34. Pal.

Marrink S.-J. and Berendsen H. J. C., Simulation of Water Transport through a Lipid Membrane, *J. Phys. Chem.* 1994, **98**, 4155-4168

Matija L., "Nanotehnologije na bazi fullerena i ugljeničnih nanotuba", *Tehnika-Novi materijali*, **12** (2), 1-18, 2003.

Matija Lidija, Uvod u nanotehnologije, Beograd : Nauka-DonVas, 2010 g

McIntosh, T.J., Stewart, M.E., Downing, D.T. 1996. X-ray diffraction analysis of isolated skin lipids: reconstitution of intercellular lipid domains. *Biochemistry* **35**, 3649-3653.

Membrino M. A., Transdermal delivery of therapeutic compounds by iontophoresis, Dissertation University of Florida 2002

Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**:599-605.

Murray A. Lamarche Katzand Margaret, Fiber Matrix Descriptors from Permeability Data Without Requiring Membrane Thickness: Theory, Results, and Optimization *Microcirculation* Vol. 1, No. 2 , Pages 111-119 1994

Nel AE, Mädler L, Velegol D, et al, *Nature Materials*, 2009; **8**:543-57.

Norlén, L., Skin barrier formation: The membrane folding model. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 823-829. 2001.

Pantić V.R: Embriologija, šesto izdanje, Savremena Administracija dd, Beograd 1995.

Pantić V. Embriologija. Naučna knjiga Beograd. 1980

Parker, S. Grzimek's Encyclopedia of Mammals: Volume 3. New York: McGraw-Hill Publishing Company. 1990.

Papić-Obradović M, Water in human Embryogenesis and Aging, int. konf. Yucomat-2010, 29, (2010)

Parsegian, V. A., Brenner and S. L.. 1976. The role of longrange forces in ordered arrays of tobacco mosaic virus. Nature (London) 259:632-635.

Pashley, R. M. 1981. Hydration forces between mica surfaces in aqueous electrolyte solutions. J. Colloid Interface Sci. 80:153-161.

Pashley, R. M. 1981. DLVO and hydration forces between mica surfaces in Li', Na+, K+ and Cs' electrolyte solutions: a correlation of double layer and hydration forces with surface cation-exchange properties. J. Colloid Interface Sci. 83:531-546.

Pashley, R. M., and Israelachvili J. N., 1984. DLVO and hydration forces between mica surfaces in Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ and Ba²⁺ chloride solutions. J. Colloid Interface Sci. 97:446-455.

Pollack G. H. Cameron I. L. and Wheatley D. N., In *Water and the cell*, (Springer, 25 Dordrecht, 2006) pp 1- 52.

Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće, Sl. list SRJ", br. 42/98 i 44/99

Raković Dejan, Osnovi Biofizike, Beograd IASC & IEFPG, Beograd 2008 g.

Robinson W. G. and all, Water in biology chemistry and physics: experimental overwies and computational methodologies, World Scientific Publishing Co, Pte, Ltd, 1996

Rezus Y. L. A. and Bakker H. J., Observation of immobilized water molecules around hydrophobic groups, *Phys. Rev. Lett.* **99**(2007) 148301.

Sakuraoka K., Tajima S., Seyama A, Y., Teramoto K., Ishibashi M., Analysis of connective tissue macromolecular components in Ishibashi rat skin: Role of collagen and elastin in cutaneous aging, *Journal of Dermatological Science* Volume 12, Issue 3, September 1996, Pages 232–237

Sandby-M, Poulsen T, Wulf HC, *Acta Derm Venereol*, 2003; 83:410-413.

Shoulders M. D. and Raines R. T., Collagen Structure and Stability, *Annu. Rev. Biochem.* 2009. 78:929–58

Silva C.L., Topgaard D., Kocherbitov V., Sousa J.J.S., Pais A.A.C.C., Sparr E. b, Stratum corneum hydration: Phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1768 (2007) 2647–2659.

Slominski A, Wortsman J, *Endocrine Reviews*, 2000; 21(5):457-87. Spring, K. R. Routes and mechanisms of fluid transport by epithelia. *Annu. Rev. Physiol.* 60:105–119, 1998.

Stojiljković, S. Stojiljković M., Bojanić, V Stojiljković N. i Radenković S. Uloga akvaporina u poremećajima bilansa vode, *Acta Medica Medianae* 2007;46(4):66

Sulyok E., Physical Water Compartments: A Revised Concept of Perinatal Body Water Physiology, *Physiol. Res.* 55: 133-138, 2006

Suh Eun-Jung, Woo Young-Ah, and Kim Hyo-Jin 2004. Determination of Water Content in Skin by using a FT Near Infrared Spectrometer. College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul, 136-714, Korea.

Tang V. W. i. Goodenough D. A, Paracellular Ion Channel at the Tight Junction, *Biophysical Journal* Volume 84 March 2003 1660–1673.

Tapio Nikkari, Comparative chemistry of sebum, *The journal of investigative dermatology* 62: 257-267, 1974.

Toskić-Radojičić M., Modeli lipidne barijere kože, *Vojnosanit Pregl* 2002; 59(2): 177-182. Troschin, A. S. *Problems of cell permeability*. Pergamon Press, Oxford 1966.

Tsenkova Roumiana, Aquaphotomics: extended water mirror approach reveals peculiarities of prion protein alloforms *Nir News* Vol. 18 No. 6 September 2007

Tsenkova Roumiana, Aquaphotomics: the extended water mirror effect explains why small concentrations of protein in solution can be measured with near infrared light, *Nir News* Vol. 19 No. 4 June 2008

Tsukita, S., and Furuse M.. 2000. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J. Cell Biol.* 149:13–16.

Uitto J, *Clin Geriatr Med*, Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-associated alterations in collagen and elastin. 1989; 5(1):127-47.

Velkova, V., Lafleur, M., 2002. Influence of the lipid composition on the organization of skin lipid model mixtures: an infrared spectroscopy investigation. *Chem. Phys. Lipids* 117, 63-74.

Vlatković Branko. *Histologija*, Medicinska knjiga Beograd-Zagreb. 1979. Voet D., Voet J. G., *Biochemistry*, 2004.

Zavitsas A. A., Properties of water solutions of electrolytes and nonelectrolytes, *J. Phys. Chem.* B105(2001) 7805-7815.

Ziboh V.A, Cho Y, Mani I, Xi S, *Arch. Pharm. Res.*, 2002; 25:747-58. Zouboulis CC, *Dermato Endocrinology*, 2009; 1:5, 250-2.

Zweifach, B. W.: *Current Concepts of Microcirculatory Behavior*. 3rd Europ. Conf. Microcirculation (Jerusalem 1964), also in *Bibl. Anat.* 7 (1965), 2-8. (Karger/Basel/New York).

Zweifach B. W., Permeability aspects of blood tissue exchange, Investigative Ophthalmology Volume 4 Number 6 December 1965.

Watson Patricia E., Watson Ian D., and Bait Richard D., Total body water volumes for adult males and females estimated from simple anthropometric measurements, The American Journal of Clinical Nutrition 33: JANUARY 1980, pp. 27-39.

Wertz, P. W., 2000. Lipids and barrier function of the skin. Acta Derm. Venerol.; Supp. 208, 7-11.

Wertz, P.W., 1996. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. Adv. Drug Del. Rev. 18, 283-294. West MD. The cellular and molecular biology of skin aging. Arch Dermatol 1994; 130:87-95.

Wiggins. P., Life depends upon two Kinds of water. PLoS ONE 1(2008) e1406. Wiggins Ph. M., Role of Water in Some Biological Processes, Microbiological Reviews, Dec. 1990, p. 432-449 Vol. 54, No. 4

Wilfried Meyer, Klaus Neurand, Anke Schnapper SEM demonstration of elastic fibres in the integument of small and densely-haired mammals Folia Morphol. Vol. 59, No. 4, 2000 g.

Willard, D. H., Bodnar W., Harrise C., Keifer L., Nichols J. S., Blanchard S., Hoffman C., Moyer M., Burkhart W., Weiel J., Luther M. A., Wildison W. O., Rocque W. J. 1995. Aguti structure and function: characterization of a potent alpha-melanocyte stimulating hormone receptor antagonist. Biochemistry. 34: 12341-12346.

Worley K. C. and Gunaratne P., Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.

Xiao P and Imhof RE, 3D Mathematical Modelling for Dynamic Water Diffusion Through Stratum Corneum.

Zavitsas A. A., Properties of water solutions of electrolytes and nonelectrolytes, J. Phys. Chem. B 105(2001) 7805-7815.

Ziboh VA, Cho Y, Mani I, Xi S, Arch. Pharm. Res., 2002; 25:747-58. Zheng et al., Langmuir, 2007; 23:11890-5. Zouboulis CC, Dermato Endocrinology, 2009; 1:5, 250-2.

11. PRILOZI

11.1. Podaci o vodi

U tabeli (19) su prikazane vrednosti osnovnih parametara Zrenjaninske vode koje se određuju u higijenskom zavodu Zrenjanin. Parametri biološke i hemijske ispravnosti se uobičajeno koriste za određivanje kvaliteta vode, ostala masa molekula vode se jednostavno posmatra kao prost rastvarač.

Tabela 19. Analiza osnovnih parametara Zrenjaninske vode koji se rutinski određuju

PARAMETAR	JM	UZORAK	MDK
temperatura	°C	17.4	tempreatura izvorišta ili niže
Boja		50	5 stepeni kobalt platinske skale
Miris		bez	bez
Ukus		bez	bez
Mutnoća	NTU	0.50	5
Ph vrednost	Ph	7.77	6.8-8.5
Utrošak KMnO ₄	mg/l	35.47	8
Amonijak (NH ₃)	mg/l	1.22	1
Rezidualni hlor slobodni	mg/l	1	0.5
Hloridi (Cl)	mg/l	20.43	200
Nitriti (NO ₂)	mg/l	0.06	0.03
Nitrati (NO ₃)	mg/l	-	50
Ostatak isparenja	mg/l	759	-
Elektr. provodljivost	mS/cm ²	1217	1000
Gvožđe Fe	mg/l	0.51	0.3
Mangan Mn	mg/l	-	0.05
Ortofosfati kao (P)	mg/l	0.64	0.15

Prikazani su parametri koji se ne standardno određuju u Zrenjaninskoj vodi. Hemijski parametri su ispod MDK ali se ne razmatra uticaj rastvorenih supstanci na strukturu vodoničnih veza molekula vode, kao i na biološki učinak takve dinamičke strukture vodoničnih veza molekula vode.

Tabela 20. Detaljna analiza sastava Zrenjaninske vode.

PARAMETAR	JM	SIROVA VODA
Boja, kvalitet	/	j. žuta
Mutnoća, kvalitet	/	
Miris, kvalitet	/	bez
Boja na 436 nm	cm ⁻¹	1.9
Mutnoća, kvantitet	FNU	4.1
Mutnoća, kvantitet	FNU	1.3
Temperatura uzorka	°C	7.9
Električna provodljivost na 20 °C	mS/cm ²	116
Električna provodljivost na 25 °C	mS/cm ²	129
Rastvoreni O ₂	mg/l	< 0.5
pH, u laboratoriji	/	7.86
pH, prilikom uzorkovanja	/	7.72
pH, odstupanje od ravnoteže	/	0.14
Kiselost do pH 4.3	mmol/l	14.7
Kiselost do pH 8.2	mmol/l	/
Alkalitet do pH 4.3	mmol/l	/
Alkalitet do pH 8.2	mmol/l	0,48
Ukupna tvrdoća	mmol/l	1.18
Ukupna tvrdoća u nemačkim stepenima	° dH	6.6
Desetilatrazin (metabolit)	µg/l	< 0.03
Bromacil	µg/l	< 0.03
Hlortoluron	µg/l	< 0.05
Karbetamid	µg/l	< 0.1
Hloridazon	µg/l	< 0.05
Cianazin	µg/l	< 0.05
Desmetrin	µg/l	< 0.05
Diuron	µg/l	< 0.05
Izoproturon	µg/l	< 0.05
Lenacil	µg/l	< 0.05
Linuron	µg/l	< 0.05
Metabenzthiazuron	µg/l	< 0.05
Metamitron	µg/l	< 0.1
Metobromuron	µg/l	< 0.05
Metoksuron	µg/l	< 0.05
Monolinuron	µg/l	< 0.05
Fenmedifam	µg/l	< 0.1
Prometrin	µg/l	< 0.05
Procimidon	µg/l	< 0.1
Propazin	µg/l	< 0.05

Sebutilazin	µg/l	< 0.02
Simazin	µg/l	< 0.02
Desetilsimazin (metabolit)	µg/l	< 0.05
Terbutrin	µg/l	< 0.05
Terbutilazin	µg/l	< 0,02
Desilterbutilazin (metabolit)	µg/l	< 0.05
Triadimefon	µg/l	< 0.05
Triadimenol	µg/l	< 0.1
Alahlor	µg/l	< 0.05
Dihlorbenzamid (metabolit)	µg/l	< 0.05
Heksazinon	µg/l	< 0.05
Metalaksil	µg/l	< 0.05
Metazahlor	µg/l	< 0.03
Metolahlor	µg/l	< 0.05
Metribuzin	µg/l	< 0.03
Pendimetalin	µg/l	< 0.02
Indeks zasićenosti	/	0.34
Kapacitet rastvaranja kalcijuma	mg/l	/
Kapacitet izbacivanja kalcijuma	mg/l	21
Amonijak	mg/l	1.5
Nitrati	mg/l	< 0.5
Nitriti	mg/l	< 0.01
Hloridi	mg/l	11.6
Sulfati	mg/l	<1
Fosfati, ukupni	mg/l	1.6
Silicijum	mg/l	8.1
Sulfidi	mg/l	< 1
TOC	mg/l	11
SAK 254 nm	cm ⁻¹	49.3
Metan	µg/l	12000
Hemijski elementi		
Gvožđe	mg/l	0.29
Mangan	mg/l	0.032
Kalcijum	mg/l	23.29
Magnezijum	mg/l	14.2
Natrijum	mg/l	291
Kalijum	mg/l	1.2
Aluminijum, ukupni	mg/l	< 0.02
Aluminijum, rastvoreni	mg/l	/
Antimon	mg/l	< 0.001

Arsen	mg/l	0.083
Olovo	mg/l	< 0.001
Bor	mg/l	1.10
Kadmijum	mg/l	0.0001
Hrom	mg/l	0.001
Bakar	mg/l	0.01
Nikl	mg/l	0.001
Selen	mg/l	0.001
Živa	mg/l	0.00005
Uran	mg/l	0.0001
Volatilni halogen ugljovodonici		
1,2 dihloretan	µg/l	< 0.3
Trihloreten	µg/l	< 0.1
Tetrahloreten	µg/l	< 0.1
Suma tri- i tetrahloretena	µg/l	0.0
Dihlormetan	µg/l	< 10
Tetrahlornitrometan	µg/l	< 0.1
Trihlornitrometan	µg/l	< 0.1
1,1,1-trihloreten	µg/l	< 0.1
Cis-1,2 dihloretan	µg/l	< 5
Trans-1,2-dihloreten	µg/l	< 5
1,1,-dihloreten	µg/l	< 5
1,1,-dihloreten	µg/l	< 1
1,1,2-trihlortrifloreten	µg/l	< 0.1
Hloroform	µg/l	< 0.3
Bromdihlormetan	µg/l	< 0.1
Dibromhlorometan	µg/l	< 0.1
Bromoform	µg/l	< 0.1
Suma trihlormetana	µg/l	0.0
Sintetički kompleksi		
NTA (nitrilotriacetat)	µg/l	< 0.5
EDTA (etilendinitrilotetraacetat)	µg/l	< 0.5
DTPA (dietilentriaminpentaacetat)	µg/l	< 1
ADA (beta-Alanindiacetat)	µg/l	< 1
PDTA (1,3-propediamintetracetat)	µg/l	< 1
Pesticidi		
Ametrin	µg/l	< 0.05
Atrazin	µg/l	< 0.02
Propahlor	µg/l	< 0.05
Trialat	µg/l	< 0.05
Trifluralin	µg/l	< 0.05

Policiklični aromatični ugljovodonici		
Naftalin	ng/l	< 20
Acenaftilen	ng/l	< 30
Acenaften	ng/l	< 20
Fluoren	ng/l	< 10
Fenantren	ng/l	< 10
Antracen	ng/l	< 10
Fluranten	ng/l	< 10
Piren	ng/l	< 10
Benzo(a)antracen	ng/l	< 10
Krizen	ng/l	< 10
Benzo(b)fluoranten	ng/l	< 10
Benzo(k)fluoranten	ng/l	< 10
Benzo(a)piren	ng/l	< 5
Dibenz(ah)antracen	ng/l	< 10
Benzo(ghi)perilen	ng/l	< 10
Indeno(1,2,3-cd)piren	ng/l	< 10

Parametri vode iz Beograda ukazuju da je hemijska i bakteriološka ispravnost Beogradske vode zadovoljavajuća, ispunjava zakonske uslove da bi bila bezbedna za piće i kuvanje.

Tabela 21. analiza uzorka vode koji se rutinski određuju - Torlak

PARAMETAR	JM	UZORAK	MDK
pH-vrednost	-	7.65	6.8-8.5
El. provodljivost	μS/cm ²	472	do 1000
Boja	°Pt-Co	0	5
Mutnoća	NTU	0.20	1
Amonijak	mg/l	<0.02	0.1
Gvožđe	mg/l	<0.1	0.3
Mangan	mg/l	0.24	0.05
Fosfati	mg/l	0.05	1.5
Sulfati	mg/l	29	200

Tvrdoća	°d	44.8	/
Organ. nat.	mg/l	3.16	8
Alkalitet	mg/l	248.27	/
Hloridi	mg/l	20.4	200
As	µg/l	0	10
Nitriti	mg/l	<0.01	0.03
Nitrati	mg/l	0,35	50

11.2. Podaci o pacovima

Koža pacova, kao i svih sisara, je građena od tri sloja: epidermis, dermis i hipodermis debela je prosečno 500 µm što je posledica manje razmere organizma. Veoma očigledna razlika između kože čoveka i pacova je gustina odnosno kompaktnost kože. Stratum corneum kod pacova je mnogo krtiji nego kod čoveka. Koža pacova sadrži sloj mišića (panniculus carnosus) koji je odsutan kod čoveka izuzev platizme koja je raspoređena preko ventralnog dela vrata. Kod ljudi korneocite su normalno pomerene između susednih redova. Za razliku od njih korneocite pacova su raspoređene u kolonama. (Meyer, Neurand, Schnapper 2000.) Jedna od odlika kože pacova je veliki broj folikula dlaka kojih je 3000-25000/cm² dok je kod čoveka ovaj broj oko 300 folikula/cm². Karakteristika kože obrasle dlakama je odsustvo znojnih žlezda koje se nalaze u koži koja je gola i gusta kao rep i noge. Kao posledica veće komunikacije mirisnim žlezdama koža pacova poseduje veću aktivnost ATP aze čiji je sadržaj u svim delovima kože umeren. (Dzhemukadhze 2007.) Duž dermo epidermalne spojnice se nalazi submikroskopska tanka membrana 35 nm koja prati bazalnu konturu epidermalnih ćelija. Epidermalni i dermalni filamenti ne mogu biti viđeni izuzev kod embriona i trake nisu asocirane sa amorfnim materijalom. Takozvana dermalna membrana za razliku od bazalne membrane koja je deblja i asociranog je materijala. Kožu pacova posebno odlikuje elastična mreža, kao

kod svih malih sisara sa gustom dlakom, koju odlikuju uniformni tanki elastični fibrili, koji su homogeno distribuirani između folikula dlaka kroz celu kožu, gde formiraju tipičnu elastičnu podlogu sa horizontalnim fibrilima za koje se kače i pričvršćuju za folikule dlake specijalno za gornji deo srednjeg epidermisa i raspoređeni su u graničnoj zoni između dermisa i hipodermisa kao i kod čoveka. Prednost tako specifičnih elastično protkanih dlakinih folikula u dermisu je da ćelije dlake mogu da se pokreću zajedno i simultano preko čitavog tela tako da se ostvaruje brža i bolja izolacija. Primarni dlakini folikuli se uspravljaju njihovim arrector pili muscle za vreme veoma niske temperature. Sekundarni dlakini folikuli mogu bez mišićne aktivnosti pratiti te pokrete. Kad se arrector pili muscles opuste svi dlakini folikuli se vraćaju u njihovu pređašnju poziciju. Elastični fibrili su veoma tanki i razgranati, nalaze se u relativno tankom dermisu (200-500 μm). (Meyer, Neurand, Schnapper 2000.) Fina elastična mreža građena je neprekidno u gornjem ili srednjem dermisu. Ta specifična isprepletana elastična mreža je jasno pričvršćena za prisutne primarne i sekundarne dlakine folikule. Uniformna tanka elastična vlakna su homogeno distribuirani između dlakinih folikula kroz čitav dermis i dlakini folikuli su spojeni jedan sa drugim elastičnim fibrilima pružaju se čitavom dužinom kože. Folikuli dlaka se grupišu potpuno okruženi elastičnom mrežom vlakana, koji se pričvršćuju u vezivnom tkivu za omotače vezivnih folikula. Normalno neupadljiv duboki dermis kod pacova je jasno krupno mrežast i karakteriše ga veoma labava mrežasta elastična struktura. Ovaj deo dermisa je integrisan u vezivno tkivo hipodermisa sa nejasnom granicom između dva sloja kože. Elastični fibrili su blisko isprepleteni sa elastičnim omotačem mišića kože. Elastična vlakna u dermisu kod pacova izgledaju mnogo horizontalniji. Količina elastičnog tkiva je povezana sa gustom dlake. Na abdomenu elastična vlakna su veoma obilna i formiraju širu strukturu sličnu ploči. (Meyer, Neurand, Schnapper 2000.) Ekrine klupčaste ili znojne žlezde u pravom značenju te reči (gl. sudoriferae ecrinae) se nalaze samo kod čoveka i majmuna primata, za razliku od pacova koji poseduju apokrine klupčaste žlezde (gl. sudoriferae apocrinae). (Vlatković. 1979.) Pacovi poseduju pored normalno prisutnih dlaka i dlačice kao i vibrise (taktilne dlake). Folikul dlačice pacova se razlikuje od ostalih folikula u položaju

i strukturnim karakteristikama. Kao element odbrane (tylotrich) folikuli dlaka su grupisani i folikuli dlačica su grupisani na ivici diska dlake. Dlakin folikul dlačice, koji proizvodi najfiniju nit dlake, je obuhvaćen aktivnom unilobularnom lojnom žlezdom. Arrector pili muscle je odsudan, ali folikule su snabdevene sa kopljastim nervnim nastavcima i Ruffinievim završetcima. Aksoni kopljastih završetaka su obuhvaćeni poput sendviča Schwann ćelijama i u kontaktu su sa bazalnom laminom spoljašnje epidermalne korice omotača. Ruffinijevi završetci unutar omotača od fibrila vezivnog tkiva koji opasuju folikulu u nivou lojne žlezde. Odgovarajući stimulusi za nadraženje nervnog vlakna mogu biti ostvareni tankim fibrilima dlačica. Pritisak tkiva, izazvan savijanjem centralne odbrambene (tilotrich) dlake, koji je transformisan preko lojne žlezde i tankog spoljašnjeg epitelijalnog omotača korena, mogu ekscitovati nerve folikula dlačica. Dlačice funkcionišu i kao mehanoreceptori.

Glavnina mase sebuma je mešavina relativno nepolarnih lipida od kojih je većina sintetisana de novo iz žlezda. Sastav sebuma je upadljivo karakteristika vrste. Sebum odraslog čoveka sadrži dva puta više saponifikovanog materijala u odnosu na nesaponifikovan materijal, dok su kod ostalih vrsta sisara pa i pacova skoro iste. Više od pola ljudskog sebuma je sastavljeno od triglicerida i slobodnih masnih kiselina, dok sebum glodara sadrži manje od 10% slobodnih masnih kiselina dok nemaju trigliceride. Prosečna molekulska težina triglicerida čoveka odgovara dužini lanaca C₅₄₋₅₅. Slobodne masne kiseline nisu prisutne u lojnim žlezdama, ali se formiraju od triglicerida aktivnošću lipaza kad je sebum u blizini površine kože. Alifatički monohidroksilni alkoholi su prisutni kod svih uzoraka sebuma, oni grade tip I diestar voskove i monoestar voskove. Dužina lanaca ovih alkohola je uopšte relativno velika, sebum odraslog čoveka je C_{10-C₂₄} maksimum C₂₀ a pacova C_{14-C₃₂} maksimum C₂₄. Monoestarski voskovi su najčešća nepolarna komponenta i sadržaj je mali u sebumu pacova, molekulske težine 592 što odgovara dužini lanca od 40 atoma ugljenika, dok je kod čoveka ugljenični lanac kraći i prosečne molekulske težine 562. Pacovi u sebumu poseduju diester voskove tipa I koji sadrže holesterol na mestu alifatičkog alkohola, dok kod čoveka nisu pronađeni.

Voskovi pacova poseduju veću proporciju razgranatih i nezasićenih lanaca. Otkriveno je prisustvo konstituenta II tipa voskova, alkan 1,2 diola, dok kod čoveka ovi diester voskovi nisu otkriveni. Slične hemijske strukture i molekulske težine triglicerida i diester voskova ukazuju na slična fizička svojstva. Trigliceridi su korisni za kožu, dok su diester voskovi blagotvorni za dlake. Slobodne masne kiseline se oslobađaju iz triglicerida (ali ne i iz voskova) i poseduju antifungalna i antimikrobna svojstva. Diester voskovi su nešto manje polarni od triglicerida i stoga poseduju bolju zaštitu od kvašenja krzna i ne raskidaju se na isti način kao trigliceridi. Seba pacova sadrži razgranatije masne kiseline dok seba čoveka sadrži zasićene i nezasićene ugljovodonične lance u alifatičkim alkoholima. Sterol estri odraslog čoveka sadrže veliku količinu mononezasićenih lanaca i relativno malu koncentraciju razgranatih lanaca. Sterol estri pacova poseduju relativno veliku koncentraciju razgranatih lanaca i mali procenat mononezasićenih lanaca u odnosu na druge. Dvostruke veze mononezasićenih masnih kiselina se nalaze na $\Delta 6$ u sebumu čoveka, lojne žlezde pacova sadrže ove veze u mononezasićenim masnim kiselinama na mestu $\Delta 9$. Dvostruka veze je specifična za nekoliko klasa lipida (trigliceridi i stoga slobodne masne kiseline) na mestu $\Delta 6$, a za diester voskove i izvesne sterol estre je karakteristično $\Delta 9$ mesto. Sebum odraslog čoveka sadrži manje sterol estra, formira se na površini kože, za razliku od sebuma pacova kod kog se formira u lojnoj žlezdi. Ljudski sebum sadrži relativno visoku koncentraciju skvalena koji je odsutan u sebumu glodara pa i pacova. U drugu ruku ljudski sebum sadrži veoma malo holesterola slobodnog ili esterifikovanog u poređenju sa sebumom glodara. Glavno mesto za sintezu skvalena u ljudskoj koži je lojna žlezda dok je sinteza sterola uglavnom u keratinizovanom epidermisu. Površina ljudske kože siromašna lojnim žlezdama poseduje malo skvalena i visok sadržaj slobodnog holesterola i obrnuto kada je koža bogata lojnim žlezdama sadrži veliku količinu skvalena i veoma malo ukupnog holesterola koji je uglavnom esterifikovan. Slobodni holesterol nastaje uglavnom u epidermisu dok esterifikovani holesterol i skvalen nastaju u lojnim žlezdama. Seba pacova sadrži znatno više sterola od lipida u poređenju sa površinom ljudske kože. U lipidima kože pacova steroli su uglavnom esterifikovani i njihove masne kiseline

sadrže veću proporciju razgranatih lanaca. Kod čoveka holesterol sebuma uglavnom dolazi iz epidermisa dok kod pacova iz lojnih žlezda. (Institute of Zoology, Veterinary School Hannover, 1993.)

11.3. Podaci o ljudskoj koži

11.3.1. Komponente epidermisa

Pojam keratin predstavlja zajednički naziv za više od 30 različitih vrsta, relativno nereaktivnih, vlaknastih polipeptida koji se nalaze u ćelijama epidermalnih struktura a koje grade filamenta (8-15 nm) iz porodice keratinskih intermedijernih filamenta i koji učestvuju u građi citoskeleta. Klasifikacija epitelnih keratina je pokazala da se oni mogu grupisati prema naelektrisanju ili molekularnoj masi u dve grupe molekula: neutralno-baznu grupu kojoj pripadaju teži molekuli, i kiselu grupu kojoj pripadaju lakši molekuli. Molekuli keratina su dimeri ove dve grupe polipeptida. Postupak uparivanja polipeptida je za svaki tip keratina zapisan u zasebnom, jedinstvenom genu koji se aktivira u delimično diferenciranom obliku keratinocita po njihovom dospeću u stratum spinosum. Molekuli su, pritom, upareni tako da pripadaju istom rangu u svojim podgrupama: najveći molekul iz kisele grupe je pridružen najvećem molekulu iz bazne grupe. Osim toga, mapiranje primarnih struktura je pokazalo postojanje nekih zajedničkih genskih sekvenci kod kiselih keratina koji su tako nazvani keratini tipa 1, dok su iste sličnosti uočene kod neutralno-baznih keratina koji su nazvani tipom 2. Svaki ćelijski/tkivni tip ekspresuje bar jedan keratin tipa 1 koji biva pridružen odgovarajućem keratinskom partneru tipa 2, što se naziva konceptom keratinskih parova. Tako su za svaku vrstu ćelija epitelnog tkiva keratinski intermedijarni filamenta organizovani kao hetero-polimeri kod kojih inhibicija ekspresije jednog partnerskog lanca rezultuje u inhibiciji drugog partnerskog lanca. Procese epidermalne proliferacije prati ekspresija para K5&K14 dok procese terminalne diferencijacije (maturacije) prati ekspresija parova K1&K2 i K10&K11. KIF su izduženi proteini bogati alfa heliksima koji formiraju višestruke zavojnice oblikovane u skupove vlaknaca nazvane

tonofilamenti. Metodama imunolokalizacije i skenirajuće elektronske mikroskopije dokazana je trodimenzionalna organizacija ovih filamenata u ćeliji, a takođe i između susednih ćelija, preko dezmozomalnih struktura. Po sintezi, keratin se kondenzuje u vlakna, ili tonofilamente, koja se potom grupišu u sekundarne strukture ili protofilamente (slika 2). Tonofilamenti se u među ćelijskom prostoru ugrađuju u amorfnu proteinsku matricu koju su prethodno formirale granule keratohijalina. Ugradnjom tonofibrila u matriks keratohijalina nastaju dezmozomi koje povezuju susedne ćelije i sprovode raspodelu opterećenja, održavajući pritom konstantno rastojanje od 20 nm između susednih ćelija. U epidermisu različitih tkiva nalaze se različiti tipovi keratina (bilo da je u pitanju dlan i taban, slojeviti epitelijum jednaka, cerviksa ili jednostavno epitelno tkivo epidermalnih žlezda itd.). Svim tim tkivima keratini predstavljaju glavni strukturni protein. Različiti slojevi epidermisa sadrže različite količine keratina, krećući se od približno 30% u sloju stratum bazale do čak 80% koliko ih ima u sloju stratum corneum (SC). Keratini su i jedna od osnovnih komponenti skeletnog sistema ćelije. Pripadaju klasi od intermedijalnih filamenata koja broji 5 različitih vrsta zastupljenih u različitim tipovima ćelija. Tri od ukupno pet vrsta intermedijarnih flamenata nalaze se u tkivu kože: keratini, vimentini i dezmini. Vimentini su glavni proteini ćelijskog skeleta i nalaze se u ćelijama vezivnog tkiva; dezmini su odgovorni za održavanje spojeva između miofibrila mišićnog tkiva. (Worley, Gunaratne 2006.)

Ceramidi su naziv za grupu molekula koja se sintetišu u endoplazmatskom retikulumu, potom transportuje do Goldžijevog aparata u kome se transformišu u cerebrozide, gangliozide ili sfingomijelin. U unutrašnjosti ćelije igraju ulogu u brojnim signalnim putevima ali se kao istaknuta uloga smatra učešće u diferencijaciji keratinocita. Unutar ćelijski ceramidi čine veliki procentualni udeo lipidnog sadržaja ćelija SC-a, kao i glavni sastojak egzocitoznog sadržaja lamelarnih telašaca u vanćelijski prostor SC-a. Smatra se da lamelarna telašca igraju glavnu ulogu u mehanizmu retencije vode u koži. Procesi terminalne diferencijacije okončavaju se u SC-u degradacijom

fosfolipida u glicerol i slobodne masne kiseline, kao i degradacijom glukozilceramida u ceramide. Glavni lipidni sastojci SC-a su: holesterol, slobodne masne kiseline i ceramidi. Prema nekim autorima ove komponente egzistiraju u ekvimolarnom odnosu dok prema drugima ceramidi sačinjavaju približno 50% lipida SC-a, dok su holesterol i slobodne masne kiseline manje zastupljeni. Ono u čemu se autori slažu jeste da promene u koncentracionim odnosima bilo koje od ovih komponenti ugrožavaju funkciju barijere. Ceramidi SC-a predstavljaju heterogenu grupu, najmanje osam ceramidnih vrsta koje se međusobno razlikuju po sastavu polarne grupe na početnom kraju molekula i srednjoj vrednosti dužine lanaca masnih kiselina (vezanih za polarnu grupu amidnim vezama). Osim pomenutih vrsta postoje još najmanje dve vrste ceramida koje su kovalentno vezane za proteinsku ovojnica korneocita. Keratinska ovojnica je struktura bogata lipidima i obavlja svaki korneocit, a organizovana je u lamelarne dvoslojeve koji nastaju enzimski kontrolisanom fuzijom lamelarnih telašaca (granula) sekretovanih od strane ćelija SC-a. Uloga pH u homeostazi epidermalne permeabilnosti je povezana sa obezbeđenjem optimalne sredine za rad enzima uključenih u obradu ekstracelularnih lipida koji grade nano dvoslojeve.

Precizno poreklo kisele sredine u ovom sistemu još uvek nije razjašnjeno, ali može poteći od egzogenih izvora poput mlečne kiseline u znoju, slobodnih masnih kiselina u sebumu ili od metabolita kožne mikroflore. Veza pH statusa sredine sa imunološkim osobinama kože postaje jasnija kada se ima u vidu da "prijateljski" mikroorganizmi kože imaju sklonost ka kiseljoj sredini dok "neprijateljski" mikroorganizmi imaju sklonost ka neutralno baznoj sredini. Novija istraživanja dokazuju in vitro i in vivo epidermalnu sintezu albumina koji su u stanju vezati i transportovati nezasićene masne kiseline, kalcijum, triptofan, teške metale (Cu, Ni), vitamine B6 i B12, kao i folnu kiselinu. (Hasse, Kothari, Rokos 2005.)

Funkcija barijere humanog epidermisa zavisi od enzimski kontrolisanog unakrsnog vezivanja proteinskih i lipidnih molekula koje se odvija u terminalnim stadijumima diferencijacije keratinocita. Tokom ovog procesa tzv. "biološki

lepkovi" katalizuju posttranslacione modifikacije proteina, formiranjem izopeptidnih veza ili unakrsnim vezivanjem sa proteinima preko (glutamil) lizin veza ili kroz inkorporaciju primarnih amina na specijalnim peptidno vezanim glutaminskim ostacima. Takva vrsta unakrsnog vezivanja ne samo da daje proteinske molekule visoke molekularne mase, već su ovi proteini visoko otporni na mehaničke perturbacije i proteolizu. Osobina permeabilnosti ljudske kože je u mnogome zasnovana na kvalitetu i kvantitetu lipidnih oblasti koje su upakovane u prostor između korneocita SC-a. Endogeno proizvedene masne kiseline mogu se naći ne samo u membranama epidermalnih ćelija, već i u lipidima lociranim između slojeva ćelija SC-a i u hidro-lipidnim filmovima na samoj spoljašnjoj površini kože. Ovi biomolekuli su ključni doprinosioci povezanosti strukture i funkcije epidermisa. (Coderch Lopez de la Maza Clin 2003.) Međutim, masne kiseline nisu povezane samo sa terminalnim stadijumima ćelijskog ciklusa, već učestvuju i u signalnim procesima tokom proliferacije i diferencijacije keratinocita u dubljim slojevima epidermisa, pa čak i dermisa i takođe su povezani sa imunološkim odgovorom kože. Perturbacije u masno-kiselinskom sastavu kože mogu dovesti do pojave oboljenja i narušavanja lipidno kožne barijere. Glavni znak poremećaja barijerne funkcije predstavlja porast gubitka vode sa površine kože. Uloga ultraljubičastog zračenja u metabolizmu lipida je nedovoljno poznata. Postoje dokazi da pojačano dejstvo ultraljubičastog zračenja na kožu može dovesti do povećanja nivoa lipida u SC-u, što se donekle vezuje za poboljšanje barijerne funkcije. Suprotno tome, koža izložena starenju i koža izložena foto-starenju, ispoljava abnormalnu barijernu homeostazu i ne samo smanjenje ukupnog sadržaja lipida u SC-u već i dramatičan pad u stepenu sinteze holesterola. (Bouwstra, Thewalt, Gooris 1997.). Masne kiseline u epidermisu mogu poteći od egzogenih izvora, uključujući i način ishrane. Zaista, koža je aktivan metabolički sistem za polinezasićene masne kiseline. Načini ishrane u kojima nedostaju polinezasićene masne kiseline (linoleinska kiselina) mogu dovesti i do povećanog transepidermalnog gubitka vode i do pojave ljuspaste kože. Arahidonska kiselina, čiji lanac sadrži 20 ugljenikovih atoma može biti u koži metabolisana putem ciklooksigenaze ili lipooksigenaze, uz pojavu propratnih metabolita

poput prostaglandina i hidroksieikozatetraenoičnih kiselina. Neki od ovih metabolita mogu intereagovati sa signalnim sistemima u epidermalnim ćelijama koje se nalaze u fazi proliferacije i diferencijacije, modulišći tada aktivnosti nekih enzima i apoptotske procese. (Ziboh VA, Cho Y, Mani I, Xi S, 2002.)

11.3.2. Diferencijacija i ravnoteža epidermalnih ćelija

Bazalne keratinocite se transformišu u korneocite u roku od približno 30 dana. U svakom od slojeva kroz koje prolaze, epidermalne ćelije sintetišu, na vremenski uređen način, proteine karakteristične za sloj u kome se nalaze ali i one potrebne za prelazak na viši stepen diferencijacije. Međutim, mitozu praćena maturacijom i diferencijacijom nije jedini mogući ishod za epidermalne keratinocite. Genetsko oštećenje indukovano ultraljubičastim zračenjem može pokrenuti apoptozu koja se odvija u roku od nekoliko sati od trenutka nastanka oštećenja. Koža nastoji da se zaštiti od ultraljubičastog zračenja koncentracijom prenetog melanina u jedra oštećenih keratinocita. Sudbinu i zdravstveno stanje keratinocita određuje ravnoteža faktora koji potstiču mitozu i diferencijaciju sa jedne strane i faktora koji potstiču apoptozu sa druge strane. Glavni molekularni pokazatelj epidermalne diferencijacije jeste ekspresija određenih keratinskih parova. Proliferativne bazalne keratinocite ekspresuju K5 i K14 dok keratinocite u ranoj fazi maturacije ekspresuju K1, K10, K6 i K16 kod epitelnih ćelija spoljašnjeg korenskog omotača dlakinog folikula, nokatne osnove i epitela oralne mukoze, dok supra-bazalna ekspresija K6 i K16 može nastati kod hiperproliferacije epidermisa, što je slučaj kod nekih obolenja i zarastanja rana. Joni kalcijuma su se pokazali kao značajan upravljački činilac u diferencijaciji ćelije, regulaciji ćelijskog ciklusa. Skoro četvorostruka razlika u koncentraciji kalcijuma između bazalnog sloja i SC svedoči o ulozi kalcijuma u potsticanju diferencijacije. Dodatak kalcijuma keratinocitama *in vitro* zaustavlja rast proliferativnih ćelija, istovremeno indukujući ekspresiju molekularnih markera diferencijacije koji su K1-K2, filagrin, involucrin i lorikrin. Kalcijum reguliše i ekspresiju proteina koji formiraju međućelijske veze u dezmozomima, adherinima i pukotinastim kanalima. Ovi spojevi nisu samo mehanička veza

ćelija već i kanali prenosa molekula informacija. Osim toga oni su neophodni i za odvajanje bazalnih ćelija od bazalne membrane. Osim kalcijuma, diferencijacija može biti modulirana hormonima i vitaminima, primera radi retinoidnom kiselinom, vitaminom D3, hormonima tiroidne žlezde i steroidnim hormonima. Ćelije kože poseduju jedarne receptore za nekoliko steroidnih hormona uključujući glukokortikoide, estrogen, andogene i progesteron što ilustruje činjenicu da je funkcija keratinocita regulirana mnoštvom međusobno prepletenih signalnih puteva. (Gingras Turgeon Brochu 2003). Kada keratinociti dođu do stratum granulozuma njihova najistaknutije odlika postaju granule bogate proteinima i lipidima. Proteinske granule, nazvane keratohijalinske granule, sadrže profilagrin i sjedinjuju se u stratum granulozumu da bi se potom dispergovale u stratum corneumu nakon čega slede defosforilacija, maturacija i proteoliza do flagrina. U gornjim epidermalnim slojevima je prisutna još jedna vrsta lipidnih granula, nazvana Oblandove granule (ili Odlandova telašca), koje svojim lipidnim sastavom doprinose ekstra ćelijskoj matrici SC-a. U stratum granulozumu počinju da se obrazuju lamelarna telašca između ćelija, od lipida koje sadrže Oblandova telašca. Formiranje voda lipidnih nanoslojeva (slika 4) je od ključnog značaja za funkcionisanje kožno lipidne barijere. U stratum granulozumu sa formiranjem nanolipidnih lamela dolazi do smanjenja sadržaja vode u narednim slojevima keratiniziranih ćelija što omogućuje zadržavanje vode u telu i očuvanju elektrolitske ravnoteže i optimalne hidratacije tela.

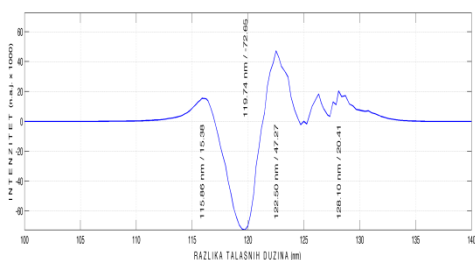
11.4. Metode

11.4.1. Optomagnetni fingerprint

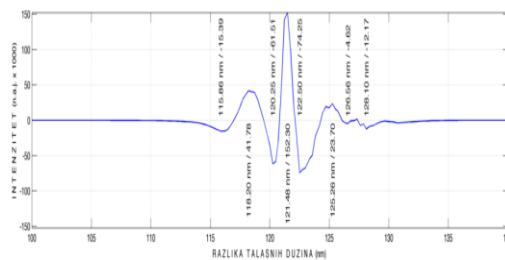
OMF dijagrami ispitanika koji su konzumirali Zrenjaninsku vodu pa su prešli na flaširane tipove voda različitog pola i starosti.

OMF diagram (60-67) ispitanika muškog pola starosti 61g. koji je pio samo Zrenjaninsku vodu. Na dijagramu je predstavljena razlika intenziteta svetlosti na talasnim dužinama od 100 do 140 nm. Promene intenziteta svetlosti su se odvijale u delu talasnih dužina od 115 do 139 nm. Nakon uklanjanja sloja

pokožice koža pokazuje drugačija svojstva i dinamiku molekula vode. Zarobljena voda u nano lamelama poseduje oštiri pozitivan prvi glavni pik na talasnoj dužini od 121.48 nm sa intenzitetom od 125.30 za razliku od intaktne kože sa emulzijom vode i masti na površini, deskvamacijom keratinocita i narušenom nanolamelarnim strukturama čija voda pokazuje širi glavni pik na talasnoj dužini od 119.74 nm i intenzitetom od -72.56 i malim širokim pozitivnim pikom na talasnoj dužini od 128.10 nm i intenzitetom od 47.27.

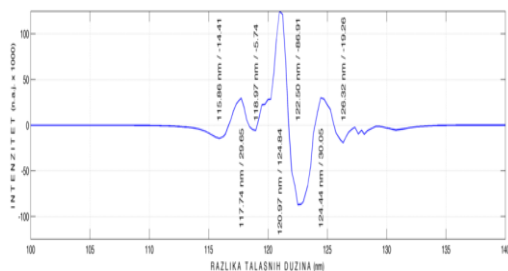


Dijagram 56. OMF intaktne kože pre uklanjanja prvog sloja pokožice sa jednim negativnim širim pikom i odmah iza njega manjim pozitivnim pikom.

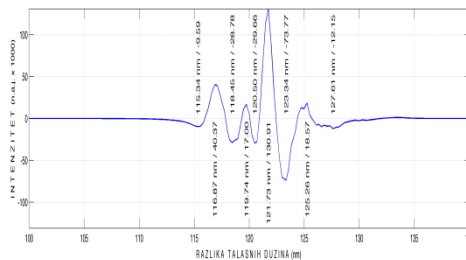


Dijagram 57. OMF kože nakon skidanja prvog sloja pokožice pokazuje dominantan uzak pozitivni pik a pored njega dva manja negativna pika a iza njih dva mala pozitivna pika.

Voda u slojevima kože sa kojih su skinuta dva odnosno tri sloja kože pokazuju dalju promenu svojstava molekula vode. U živim ćelijama kože i međućelijskim prostorima slobodna i vezana voda za razne jone i biomolekule pokazuje drukčiju dinamiku dijamagnetizma i paramagnetizma nego u slojevima kože sa mrtvim keratinocitima i lamelarnim strukturama sa zarobljenom vodom između njih.

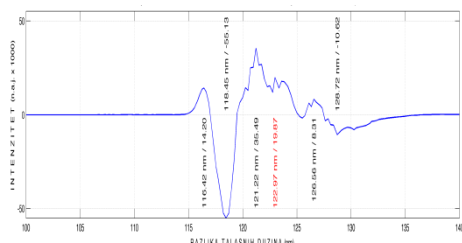


Dijagram 58. OMF uklonjenosti dva sloja pokožice je prisutan uski pozitivan pik na talasnoj dužini od 120.97 nm i intenzitetom od 124.84. Potom sledi širi negativni pik na talasnoj dužini od 122.50 sa intenzitetom od -86.91.

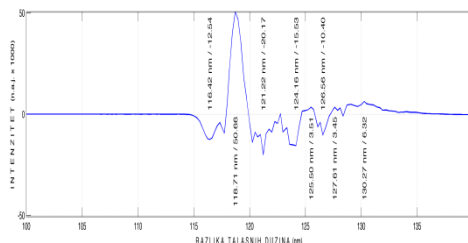


Dijagram 59. OMF kože nakon uklonjenosti tri sloja pokožice pokazuje na talasnoj dužini od 121.73 nm pozitivan pik intenziteta 130.91, zatim sledi negativan pik na talasnoj dužini od 123.34 nm i intenzitetom od -73.37.

Isti ispitanik je potom prešao na konzumiranje flaširane vode naredna trideset šest dana i potom je ponovljeno slikanje kože uz skidanje slojeva pokožice. Primetne su razlike u OMF dijagramima (64), (65) kože kad je ispitanik prešao na konzumiranje flaširanih tipova vode.

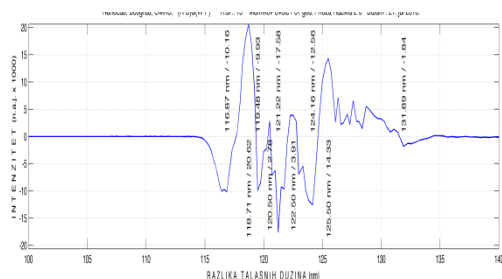


Dijagram 60. OMF intaktne kože pokazuje prvi glavni negativni pik na talasnoj dužini od 118.55 nm i intenzitetom od -55.13. Prisutan je razvučeni prvi glavni pozitivni pik na talasnoj dužini od 121.22 nm i intenzitetom od 35.49 odmah iza negativnog pika.

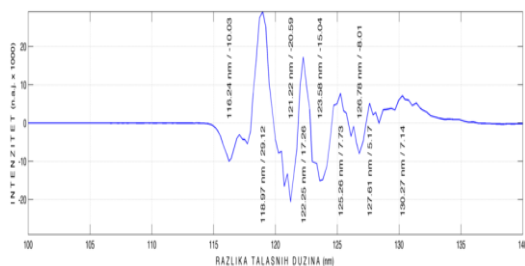


Dijagram 61. OMF kože sa koje je skinut prvi sloj pokožice na talasnoj dužini od 118.71nm i intenzitetom od 50.66 je dominantni glavni pozitivni pik. Potom sledi više malih pozitivnih i negativnih malih pikova.

Na površinskom intaktnom delu kože nakon konzumiranja flaširanih tipova voda, OMF dijagram pokazuje pomeranje prema kraćim talasnim dužinama, dominantni negativni pik se sužava i postaje znatno kraći glavni pozitivni pik postaje izrazito nazubljen i nešto niži.



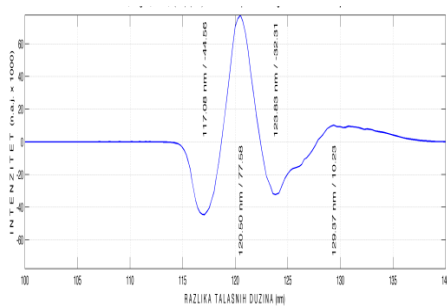
Dijagram 62. OMF kože nakon uklanjanja dva sloja pokožice sa dominantnim glavnim pozitivnim pikom na talasnoj dužini od 118.71 nm i intenzitetom od 20.62 i potom nizom oštih malih pozitivnih i negativnih pikova od kojih se izdvaja drugi glavni pozitivni pik na talasnoj dužini od 125.50 nm i intenzitetom od 14.33.



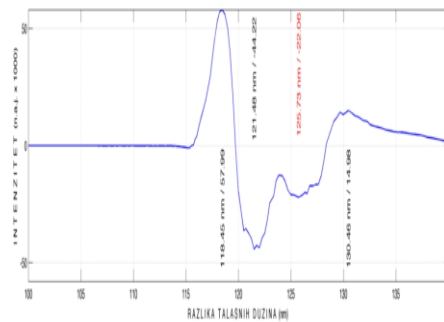
Dijagram 63. OMF kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice karakterističan je prvi glavni pozitivan pik na talasnoj dužini od 118.54 nm i intenzitetom od 29.12. Potom slede uski, oštri, mali i nazubljeni pozitivni i negativni pikovi.

Kao posledica promene tipa vode za piće se menja OMF dijagram u koži nakon uklanjanja dva odnosno tri sloja pokožice u oba sloja kože nakon konzumiranja flaširanih tipova voda pikovi postaju manjeg intenziteta oštiji, mnogobrojniji i zupčasti u odnosu na OMF kože kad je konzumirana Zrenjaninska voda.

OMF dijagram (68) ispitanika muškog pola starosti 24 g, koji je pio samo Zrenjaninsku vodu je znatno drugačiji od starijeg ispitanika za iste slojeve kože. OMF dijagrami kože se razlikuju između različitih jedinki različite starosti i pola što se vidi iz prikazanih dijagrama.



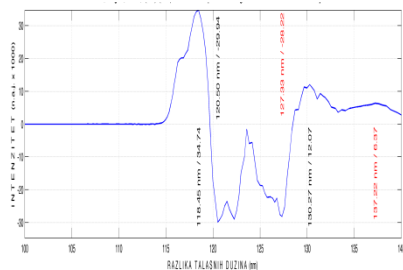
Dijagram 64. OMF dijagram intaktne kože kojeg karakteriše glavni pozitivan pik na talasnoj dužini od 120.50 nm i intezitet 77.58. Ovom piku prethodi prvi glavni negativni pik na talasnoj dužini od 117.06 nm intenziteta -44.56 i sledi negativni pik na talasnoj dužini od 123.83 nm intenziteta -32.31. Potom sledi mali pozitivan pik na talasnoj dužini od 129.27 nm i intenziteta 10.23.



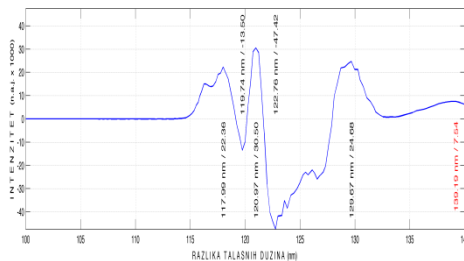
Dijagram 65. OMF dijagram kože nakon uklanjanja jednog sloja pokožice poseduje prvi glavni pozitivan pik na talasnoj dužini od 116.45 nm i intenziteta 57.99. Odmah iza njega je glavni prvi široki negativan pik na talasnoj dužini od 121.48 nm i intenziteta od -44.22 i na kraju pozitivan pik na talasnoj dužini od 130.46 nm i intenziteta od 14.96.

Dijagrami OMF različitih ispitanika pokazuju različita svojstva vode u raznim slojevima kože što je individualno svojstvo svakog organizma. OMF dijagrami intaktnih slojeva kože dva ispitanika pokazuju pikove ne samo različitog intenziteta nego i kod starijeg ispitanika je negativan a kod mlađeg je pozitivan što ukazuje na različitu strukturu vode između površinskih keratinocita i sebuma.

Dublji slojevi kože nakon skidanja dva odnosno tri sloja kože dijagrami (70) i (71) pokazuju različita svojstva vode kako u višim slojevima kože (stratum corneum) istog ispitanika tako i u istim slojevima kože između starijeg i mlađeg ispitanika.

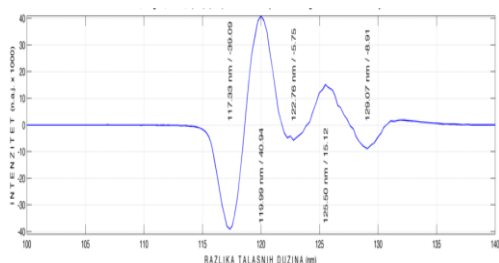


Dijagram 66. OMF dijagram kože nakon uklanjanja dva sloja pokožice pokazuje karakterističan pozitivan pik na talasnoj dužini od 118.45 nm i intenzitetom od 34.74. Zatim dva uzastopna negativna pika na talasnim dužinama 120.50 i 127.33 nm i intenziteta -29.94 i -28.22. Potom sledi široki pozitivan pik na talasnoj dužini od 130.27 nm i intenzitetom od 12.07.

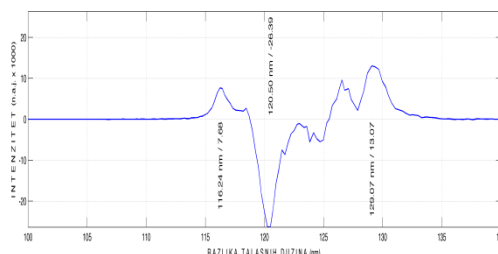


Dijagram 67. OMF dijagram kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice poseduje širok negativan pik na talasnoj dužini od 122.76 nm i intenzitetom -47.42 i tri mala pozitivna pika, prethode mu na talasnoj dužini od 117.99 intenziteta 22.36, talasne dužine 120.97 intenziteta 30.50 i na kraju dijagrama na talasnoj dužini 129.67 pozitivan pik intenziteta 24.68.

Isti ispitanik je potom prešao na konzumiranje flaširane vode narednih trideset šest dana i potom je ponovljeno slikanje kože uz skidanje slojeva pokožice. Primetne su razlike u OMF dijagrama (72), (73) kože kad je ispitanik prešao na konzumiranje flaširanih tipova vode kao između starijeg i mlađeg ispitanika.

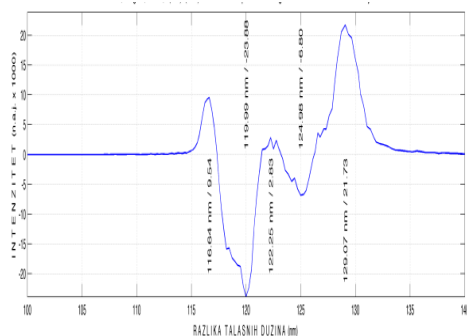


Dijagram 68. Na OMF dijagramu intaktne kože su prisutni glavni negativni pik na talasnoj dužini od 117.33 nm i intenziteta -39.09, zatim sledi glavni pozitivni pik na 119.99 i intenziteta 40.94. Potom slede dva mala negativna pika na talasnim dužinama 122.765 i 129.07 nm i intenziteta -5.75 i -8.91, i između njih malog pozitivnog pika na talasnoj dužini od 122.50 nm i intenziteta od 15.12.

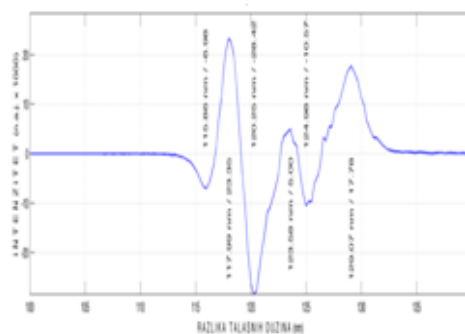


Dijagram 69. predstavlja OMF kože nakon uklanjanja jednog sloja pokožice i na njemu dominira negativni pik na talasnoj dužini od 120.50 nm i intenziteta -26.39. Prethodi mu mali pozitivan pik na talasnoj dužini od 116.24 nm i intenziteta 7.66. Posle negativnog pika sledi nazubljen mali pozitivan pik na talasnoj dužini 129.07 nm i intenziteta 13.07.

Na OMF dijagramima (74) i (75) su pretstavljeni slojevi kože nakon uklanjanja drugog i trećeg sloja kože, koji su veoma slični što ukazuje da je voda u donjim slojevima kože jako slična u svojim svojstvima.

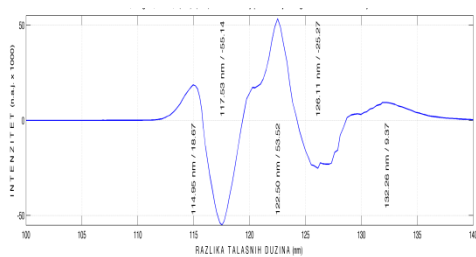


Dijagram 70. OMF dijagram kože nakon skidanja dva sloja pokožice pokazuje: mali pozitivan pik na talasnoj dužini od 116.64 nm intenziteta 9.54. Zatim sledi širok glavni negativni pik talasne dužine 119.99 nm intenziteta -23.88. Potom sledi mali pozitivni pik na talasnoj dužini od 122.25 nm intenziteta 2.83. Potom je iza malog negativnog pika glavni prvi pozitivni pik na talasnoj dužini od 129.07 nm intenziteta 21.73.

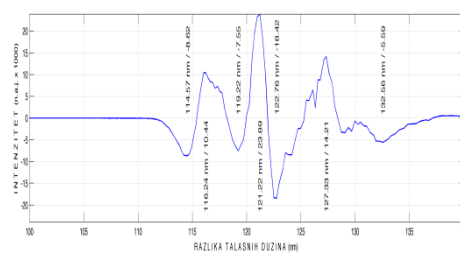


Dijagram 71. OMF dijagram trećeg sloja pokožice pokazuje posle malog negativnog pika glavni prvi pozitivan pik na talasnoj dužini od 117.99 nm i intenziteta 23.35. Neposredno sledi glavni prvi negativni pik na talasnoj dužini 120.25 nm intenziteta -28.42. Potom je mali pozitivan pik kog sledi mali negativan pik koji prelazi u široki drugi glavni pozitivni pik na talasnoj dužini od 129.07 i intenziteta od 17.78.

Nakon prelaska na flaširane, više strukturisane, tipove voda koža mlađeg ispitanika pokazuje drastičnija odstupanja kod mlađeg ispitanika nego kod starijeg. OMF dijagrami su naročito izmenjeni u donjim slojevima kože kod mlađeg ispitanika nakon promene tipa vode za piće. OMF dijagrami (76) i (77) ispitanice starosti 78g. koja je pila samo Zrenjaninsku vodu. Snimana je intaktna koža sa unutrašnjeg dela desne podlaktice.

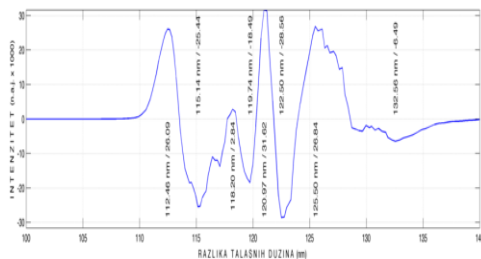


Dijagram 72. OMF intaktne kože ispitanice karakteriše da nakon malog pozitivnog pika na talasnoj dužini od 114.95 nm intenziteta 18.67 sledi prvi glavni negativni pik na talasnoj dužini 117.53 nm intenziteta -55.14, zatim odmah široki pozitivni pik na talasnoj dužini od 122.50 nm intenziteta 53.52. Potom sledi manji širi negativni pik na talasnoj dužini od 126.11 nm i intenziteta -25.27.

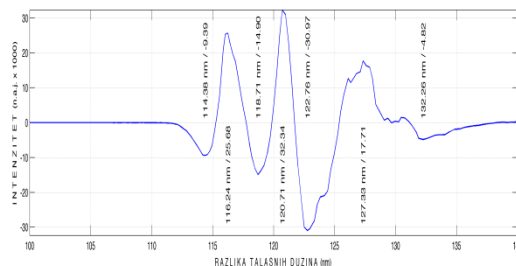


Dijagram 73. OMF kože nakon uklanjanja jednog sloja pokožice pokazuje mali negativni pik nakon koga sledi široki zupčasti pozitivni pik na talasnoj dužini od 116.24 nm intenziteta 10.44 manji negativni pik koji prelazi u uski pozitivni pik na talasnoj dužini od 121.22 nm intenziteta 23.88, sledi glavni negativni pik na talasnoj dužini od 122.76 i intenziteta -18.42 i odma se nastavlja u široki nazubljen pozitivan pik intenziteta 14.21.

Slično prethodnim ispitanicima i kod ove ispitanice dolazi do promene karakteristika na površini kao i u keratinizovanim slojevima kože gde se voda nalazi u nano slojevima. Intenziteti svetlosti kod starije ispitanice i pozitivnih i negativnih pikova pokazuje manje vrednosti u odnosu na oba ispitanika a naročito starijeg. Dijagrami (76 i 77)

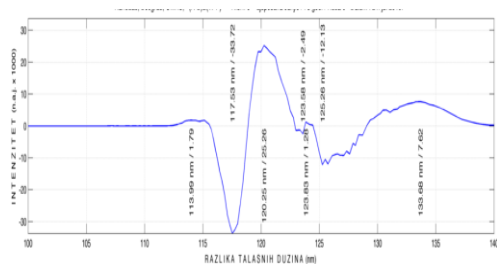


Dijagram 74. Na OMF dijagramu kože nakon skidanja drugog sloja pokožice se nalazi čitav niz pozitivnih i negativnih pikova malog intenziteta od kojih se izdvajaju prvi pozitivni široki pik intenziteta 26.09, dominantni široki pik intenziteta 25.44, manji pozitivan kog sledi mali negativni pik koji prelazi u uzak glavni pozitivni pik intenziteta 31.62 i prilazi odmah u uzak glavni negativan pik intenziteta -28.56 i prelazi u široki pozitivan pik intenziteta 26.84.

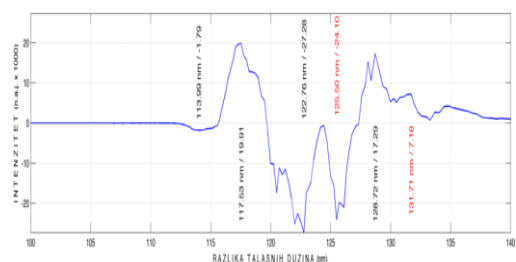


Dijagram 75. OMF dijagram kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice odlikuju pozitivni i negativni pikovi manjeg intenziteta sa karakterističnim pozitivnim pikom intenziteta 25.68 koji prelazi mali negativni pik a on u glavni uski pozitivan pik intenziteta 32.34. Potom sledi širi glavni negativni pik intenziteta -30.97 koji prelazi u širok manji pozitivan pik intenziteta 117.71.

Sa dubinom kože na dijagramu se povećava broj pikova a smanjuje njihov intenzite, pikovi postaju oštrij, OMF dijagrami (78 i 79) se u dubljim slojevima kože završavaju širokim pozitivnim pikovima manjeg intenziteta. Sledeći OMF dijagrami su dobijeni snimanjem kože nakon prelaska ispitanice na flaširane tipove voda.

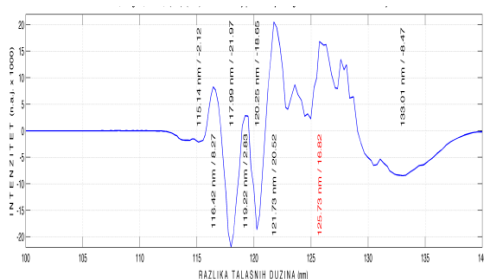


Dijagram 76. OMF intaktne kože karakteriše uski negativni pik na talasnoj dužini 117.53 nm intenziteta -33.72 koji prelazi u širok pozitivan pik na talasnoj dužini 120.25 nm intenziteta 25.26 koji prerasta u mali široki negativni pik talasne dužine 125.26 nm intenziteta -12.13.

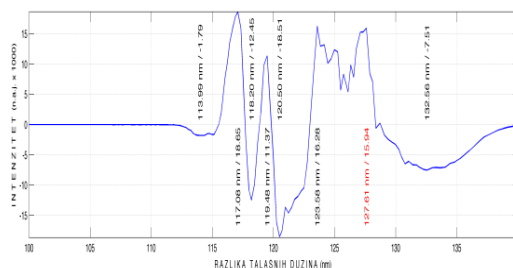


Dijagram 77. OMF kože nakon uklanjanja jednog sloja pokožice je karakterističan široki glavni pozitivni pik na talasnoj dužini od 117.53 nm intenziteta 19.91. Zatim slede dva uzastopna negativna pika intenziteta -27.26 i -24.10 i širok nazubljen pozitivni pik na talasnoj dužini od 128.32 nm intenziteta 17.29.

OMF dijagrami kože (80) i (81) slični su sa prethodnim dijagramima istih slojeva kad je ispitanica pila Zrenjaninsku vodu. U intaktnom sloju kože pokazuju manje intenzitete pikova, dok nakon uklanjanja sloja pokožice pokazuju veće intenzitete pikova na sličnim talasnim dužinama. Voda u različitim delovima kože za svaki sloj je posebno organizovana i poseduje karakteristična svojstva.



Dijagram 78. OMF kože nakon uklanjanja drugog sloja pokožice pokazuje manji pozitivan pik nakon koga slede dva oštra negativna pika intenziteta -21.97 i -18.65 pa potom slede dva preklapljena široka nazubljena pozitivna pika koji su intenziteta 20.52 i 16.82.

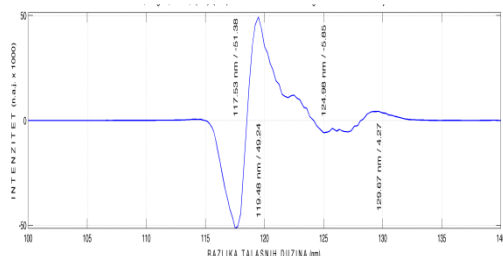


Dijagram 79. OMF kože nakon skidanja tri sloja karakteriše glavni pozitivni uzak pik intenziteta 18.65, zatim sledi uzak negativan pik intenziteta -12.45 i odmah pozitivan pik intenziteta 11.37. Zatim sledi širok glavni negativan pik intenziteta -18.53 zatim se nastavlja u dva pozitivna stopljena pika intenziteta 16.28 i 15.94.

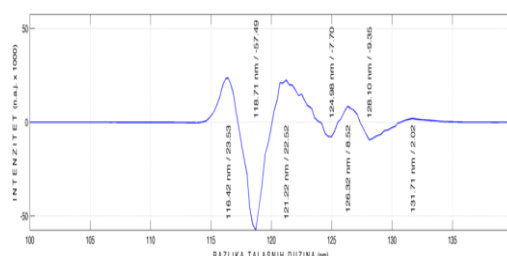
OMF dijagrami (82) i (83) donjih slojeva kože se znatno razlikuju u odnosu koju voda ispitanica konzumira. Dijagram kože nakon uklanjanja drugog sloja kože karakteriše manji intenzitet naročito pozitivnih pikova i dva pozitivna stopljena pika na koji se javljaju na talasnoj dužini na dijagramu (82) krajnjeg, širokog pozitivnog pika u slučaju kad je ispitanica pila Zrenjaninsku vodu. OMF dijagram kože (83) nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice pokazuje uže pozitivne i negativne, sa manjim intenzitetom, pikove i umesto širokog pozitivnog pika na talasnoj dužini od 127.33 nm dva stopljena široka pozitivna pika intenziteta 16.28 i 15.94.

Mlađa ispitanica 37g. poseduje karakteristične OMF dijagrame kože unutrašnjeg dela podlaktice, koji su se promenili kad je ispitanica promenila tip vode za piće. OMF dijagrami kože pokazuju specifičnost kako za jedinku tako za

pol i uzrast ispitanika, što je posledica različitog stanja vode u slojevima kože kao rezultat genetskih osobnosti, vrste i količine vode koja se pije vrste i količine hrane koja se unosi u organizam i drugih uticaja spoljašnjih i unutrašnjih faktora na organizam.

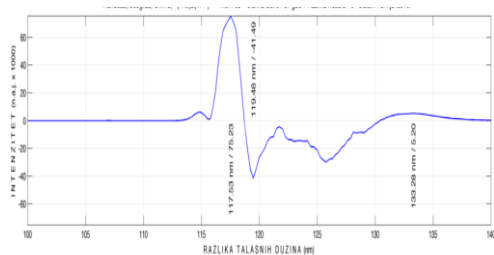


Dijagram 80. OMF intaktne kože ispitanice karakteriše glavni negativni pik na talasnoj dužini od 117.53 nm intenziteta -51.38. Potom sledi glavni pozitivni pik na talasnoj dužini 119.48 nm intenziteta 49.24, potom sledi široki mali pik na talasnoj dužini 124.96 nm i intenziteta -5.85, iza koga sledi mali pozitivni pik na talasnoj dužini 129.67 nm i intenziteta 4.27.

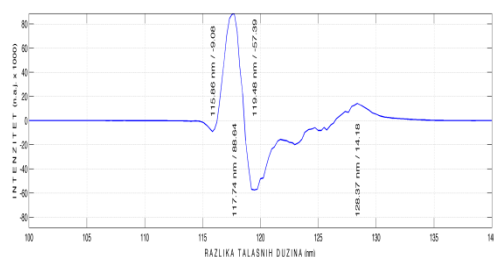


Dijagram 81. OMF kože nakon uklanjanja jednog sloja pokožice pokazuje mali pozitivni pik na talasnoj dužini 116.42 nm intenziteta 23.53, potom dominantni negativni pik na talasnoj dužini 118.71 nm intenziteta -57.49. Potom sledi široki pozitivni pik intenziteta 22.52 i 8.52 i između njih mali negativni pik intenziteta -8.52. Na kraju sledi mali negativni pik vrednosti -2.02.

Kao i kod prethodnih ispitanika OMF (84) dijagram za površinske slojeve vode u koži ispitanice pokazuje osobnosti za samu jedinku i pored velike sličnosti naročito za intaktnu kožu. Nakon skidanja jednog sloja pokožice OMF dijagram (85) dubljeg dela kože pokazuje veću osobnost za jedinku kao i njenu starost i pol.

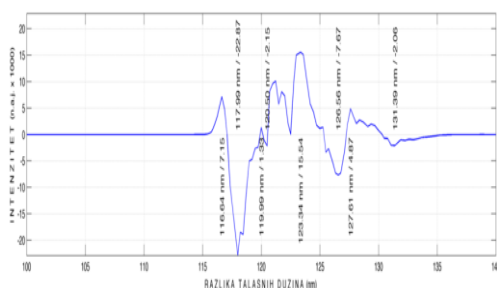


Dijagram 82. OMF kože nakon uklanjanja dva sloja pokožice pokazuje dominantan pozitivni pik na talasnoj dužini od 117.53 nm intenziteta 75.23. Zatim sledi manji negativan pik na talasnoj dužini od 118.48 nm intenziteta -14.49, i potom široki pozitivni pik talasne dužine 133.28 nm intenziteta 5.20.

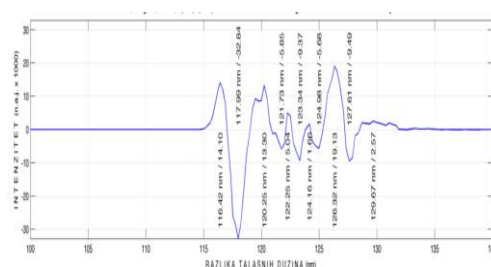


Dijagram 83. OMF kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice poseduje na početku mali negativan pik intenziteta -9.08 koji se nastavlja u dominantan pozitivan pik na talasnoj dužini 117.74 nm intenziteta 88.64 koji odmah prelazi u negativan širi pik na talasnoj dužini 119.48 nm intenziteta -57.39. Potom sledi širok pozitivan pik na talasnoj dužini 128.37 nm intenziteta 14.18.

Kod mlađe ispitanice su dijagrami (86 i 87) donjih živih slojeva kože dosta slični s time da su intenziteti pikova nešto viši kod kože sa koje je uklonjen treći sloj pokožice i poslednji mali široki pik je na većoj talasnoj dužini kod istog dijagrama.

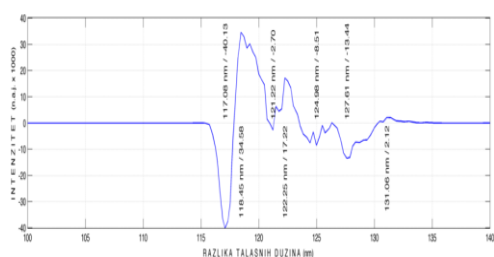


Dijagram 84. OMF cele kože pokazuje mali pozitivan pik intenziteta 7.15, potom sledi glavni negativni dominantan pik na talasnoj dužini 117.99 nm intenziteta -22.87. Zatim sledi zupčasti pozitivni glavni pik na talasnoj dužini 123.34 nm intenziteta 15.54, neposredno se nastavlja u mali široki negativan pik intenziteta -7.67 koji prelazi u široki pozitivan pik na talasnoj dužini od 127.61 nm intenziteta 4.87.

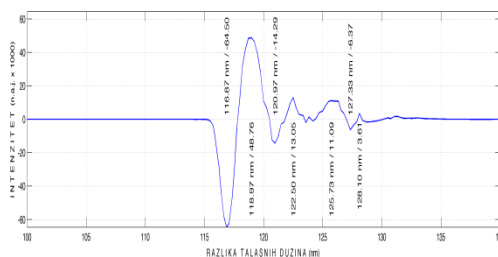


Dijagram 85. OMF kože nakon uklanjanja sloja pokožice pokazuje mali pozitivan pik intenziteta 7.15. Potom sledi glavni negativni pik na talasnoj dužini 117.99 nm intenziteta -22.67, koji se nastavlja u niz pozitivnih i negativnih pikova malog intenziteta od kojih su najveći mali široki pozitivni pik na talasnoj dužini od 120.25 nm intenziteta 13.30 i glavni dominantni pozitivni pik na talasnoj dužini 126.32 nm intenziteta 19.13.

Na intaktnoj koži pikovi su manjeg intenziteta, dok su na dijagramu, kad je ispitanica pila Zrenjaninsku vodu, bili dominantni negativni pa pozitivni glavni pik. Na dijagramu (88) je prisutan glavni negativni pik dok je umesto jednog pozitivnog pika na ranijem dijagramu sada više manjih pozitivnih i negativnih piokova. Posle uklanjanja jednog sloja pokožice na OMF dijagramu (89) je primetan glavni negativni pik manjeg inteziteta nego na ranijem dijagramu i umesto zaravnjenog širokog pozitivnog pika i jednog manjeg pozitivnog pika više, malog intenziteta, pozitivnih i negativnih pikova.



Dijagram 86. OMF kože nakon uklanjanja dva sloja pokožice pokazuje dominantan negativan pik na talasnoj dužini 117.08 i intenziteta -40.13, koji prelazi u široki pozitivni pik na talasnoj dužini od 118.45 i intenziteta 34.58. Zatim sledi niz manjih nazubljenih negativnih pikova od kojih je najveći pozitivni pik na talasnoj dužini 122.25 nm i intenziteta 17.22.



Dijagram 87. OMF kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice pokazuje dominantan negativni pik na talasnoj dužini od 116.87 nm intenziteta -64.50, za njim sledi u široki pozitivan pik na talasnoj dužini od 118.97 nm intenziteta 48.76. Potom sledi nekoliko pozitivnih i negativnih širokih pikova malog intenziteta.

Dijagrami slojeva kože nakon uklanjanja dva (90) odnosno tri (91) sloja pokožice pokazuju slične karakteristike koje su bitno drugačije od dijagrama nakon uklanjanja slojeva kože kad je ispitanica pila Zrenjaninsku vodu. Voda u ovim slojevima je jako slična po svojim karakteristikama osim što voda u koži sa koje su skinuta tri sloja pokožice pokazuje veće intenzitete svih pikova.

11.4.2. AFM

Interakcije na nanobiološkim površinama kože

AFM metodom se ispituje sloj tkiva dubine od nekoliko desetina nanometara. Ispitivanja nanobioloških površina omogućavaju nam da steknemo uvide u aspekte prirode interakcije biološkog sistema i okoline (pre svega raznih molekularnih struktura vode) ali i da ispitivanjem dubljih slojeva, saznamo više o unutrašnjim aspektima funkcionalnosti samog biološkog sistema. Mogućnosti koje nam pružaju metoda AFM oslanja se na načine pripreme bioloških uzoraka koji mogu obezbediti ispitivanja preseka tkivnih struktura dobijenih ekstrakcijom (biopsijom) iz native sredine. Karakterizacija površinskih slojeva biopsijskih uzoraka datih u preseku, koja se sprovodi metodom AFM, predstavlja interakciju hemijski relativno inertne komponente koja je nanokonzola (izrađena od Si_3N_4) sa elektrodinamički ne neutralnim, viskoelastičnim površinskim slojem unutarćelijske i vanćelijske komponente. U stanju u kome je uzorak dostupan, molekuli vode su u znatnoj meri zamenjeni molekulima hemijskog fiksacionog sredstva (koji je bio formaldehid) dok je u obodnim oblastima prisutan parafin, koji je korišćen u imobilizaciji uzorka. Interakciju u površinskoj oblasti možemo smatrati funkcijom sastava sredine uzorka i promena u površinskoj energiji poteklom od konformacionih promena molekula u jediničnoj ispitivanoj oblasti. Jediničnom ispitivanom oblašću približno smatramo kružnu oblast čiji poluprečnik odgovara poluprečniku zaobljenja vrha senzora koji za metodu AFM iznosi oko 10 nm. Sredina ispitivanog tkivnog nano-bio sistema je izuzetno ne homogena usled varijabilnosti procentnih odnosa proteinskih, glikozidnih i lipidnih struktura koje se nalaze u ćelijskoj membrani i među ćelijskom prostorom kao i u lipidnim lamelama. Predmet istraživanja metodom AFM jesu promene u površinskim interakcijama (energijama) koje nastaju usled biohemijskih različitosti prisutnih u izmenjenim stanjima kože. Način na koji izmenjena fiziološka stanja modifikuju interakcije (fundamentalne sile) posledično će upravljati i dinamikom nano-bioloških tečno-kristalnih sredina i njihovim "otiskom" u vidu izmena nepolarnih, električnih i magnetnih osobina. Tehnike i metode za

detaljno ispitivanje ovih interakcija još uvek nisu standardizovane kako bi se mogle pouzdano odrediti i međusobno upoređivati. Ukupna interakcija, koju je jedino i moguće utvrditi usled velike složenosti sredine, je sastavljena od: nepolarne interakcije (privlačne po eksponencijalnom zakonu i odbojne po eksponencijalnom zakonu), polarizacione interakcije i Londonove disperzione interakcije. (Israelachvili 2004.) Brojna interakcija različitih sila čija reakcija sa nano-konzolnim senzorom u metodi AFM, predstavlja rezultantu svih uticaja za čiju promenu smo zainteresovani i za koju očekujemo da prati fiziološko stanje tkiva. Metoda Mikroskopije Atomske Sila (AFM) pruža mogućnosti vizuelizacije i merenja morfoloških osobina na nivou mikro i nano dimenzione skale koji u biološkom kontekstu odgovaraju nivou ćelija, organela i individualnih makromolekula. Osim toga, u mogućnosti smo na osnovu morfološke slike uzorka da sprovedemo i merenja fizičkih veličina (električnih, magnetnih, mehaničkih itd.) u submikronskoj rezoluciji koja nije ostvariva ni jednom do sada razvijenom tehnologijom. U istraživanju kože je korišćen dinamički režim rada kod koga se nanokonzola pobuđuje na harmonijsko oscilovanje. Kada nanokonzolu približimo uzorku, vrh senzora postaje izložen dejstvu polja međumolekularnih sila (van der Waalove sile) koje su karakterisane nelinearnom zavisnošću od rastojanja između senzora i uzorka, i relativno velikim opsegom rastojanja (sile dugog dometa). Tada oscilovanje senzora menja karakter i njegovo kretanje se modelira kao prinudno-prigušeno oscilovanje. Prisustvo polja međumolekularnih sila (prigušne sile) uslovljava promenu (smanjenje) konstante krutosti pa time i amplitude vibracija i frekvencije oscilovanja sa vrednosti ω_0 (karakteristične za prinudno slobodno oscilovanje) na vrednost ω_1 (karakteristične za prinudno prigušeno oscilovanje). Negativan znak izvoda sile potiče od činjenice da su interakcioni potencijal i sila rastuće, privlačnog karaktera te interakciji doprinose smanjivanjem rezonantne frekvencije. Može doći do pojave gradijenta privlačne sile koji premašuje vrednost otpora senzora, kada tokom približavanja vrha nanokonzolnog senzora uzorku dolazi do snažnog privlačenja koje dostiže maksimalnu vrednost na odstojanju koje približno odgovara minimumu interakcionog potencijala. U ovom slučaju je potrebno saopštiti nosaču

nanokonzole dodatnu silu kako bi se sprečilo postizanje kontakta između vrha senzora i uzorka ili kako bi se već ostvareni kontakt raskinuo. Dodatno uložena sila, u slučaju ostvarenog kontakta, se može meriti kako bi se dobila ukupna maksimalna vrednost privlačne sile što predstavlja osnovu tehnike za karakterizaciju međumolekularnih sila uzorka, odnosno karakterizaciju samog materijala. Uzorak koji se ispituje (u ovom slučaju isečak kože) nalazi se na postolju koje pokreće piezoelektrični izvršni element koji ostvaruje kretanje uzorka u tri dimenzije: dve dimenzije ostvaruju ravansko skenirajuće kretanje liniju po liniju, dok je treće visinsko kretanje, diktirano informacijom koju generiše nanokonzola koja se nalazi u stalnoj interakciji sa uzorkom i pod uticajem je privlačno-odbojnih sila (koje potiču od interakcija van der Valsvog tipa). Poznavanjem dinamičke osobine nano-konzolnog senzora i modela interakcije senzora i uzorka (opisan eksponencijalno-stepenim zakonom na bazi Mie-ovog i Lenard-Džounsovog potencijala, na osnovu dobijene interakcije se dobijaju karakteristike ispitivanog materijala. (slike 5 i 6.) Na osnovu geometrijskih i mehaničkih osobina senzora se određuje uticaj među molekularnih sila kao funkcija deformacija nanokonzole. Na osnovu deformacije nanokonzole i modela interakcije se određuju parametri koji potiču od fizičko-hemijskih osobina materijala. Na opisan način, merenjem intenziteta interakcije se dobijaju karakteristike ispitivanog materijala kako morfološke tako i fizičko-hemijske. Intenzitet privlačno-odbojnih sila zavisi od rastojanja između nanokonzole i uzorka koje određuje kontura površine uzorka. Promene rastojanja generišu promene intenziteta sila koje savijaju nanokonzolu. Intenzitet privlačno-odbojnih sila zavisi od rastojanja između nanokonzole i uzorka koje određuje promenljiva kontura površine uzorka. Ugib nanokonzole se registruje laserskim zrakom koji se od vrha nanokonzole odbija u foto detektor pozicije čija je svaka tačka opremljena senzornom diodom koja lasersku odbijenu svetlost pretvara u električni signal. Položaj odbijenog zraka, odnosno pozicija diode koja pretvara svetlosni signal u električni, omogućava stalno praćenje vertikalne pozicije-ugiba nanokonzole. Informacija o ugibu se prenosi u korekcionni element koji grešku nastalu odstupanjem trenutno pomera uzorak, pomoću piezoelektričnog izvršnog elementa, u vertikalnom pravcu kako

bi se ugib nanokonzole stalno održavao na konstantnoj vrednosti. Sva pomeranja piezoelektričnog organa uzrokovana su promenama na konturi površine uzorka tako da zapis vertikalnog pomeranja uzorka (piezoelektričnog izvršnog elementa) zapravo predstavlja zapis izgleda konture površine uzorka. Podaci za svaku liniju (preseka) uzorka se beleže u računaru, koji je nosilac svih upravljačkih i akvizicionih funkcija, i na kraju snimanja, sve linije se spajaju u trodimenzionalnu rekonstrukciju topografskog izgleda površine uzorka.

Prednosti metode AFM koje je izdvajaju u odnosu na sve ostale metode su: mogućnost merenja na mikro i nano skali, kako geometrijskoj tako i na skali fizičkih veličina, jednostavan protokol pripreme uzoraka, prilagodljivost sredine koja omogućava snimanje u uslovima bliskim prirodnom ćelijskom okruženju, koji se sprovode prilagođenjem atmosfere i/ili snimanjem u tečnoj sredini, što omogućuje veliku primenu u biološkim i biomedicinskim istraživanjima. Glavna prednost metode AFM se sastoji u mogućnosti istovremene vizuelizacije i ispitivanja osobina materijala kroz merenja: morfoloških osobina najvažnijih fizičkih veličina (mehaničkih, električnih i magnetnih) koja se mogu sprovesti u uslovima kontrolisanog sastava sredine: kontrolisana gasna sredina (vakum, vazduh, administracija gasova) ili kontrolisana tečna sredina (sve vrste tečnosti umerene viskoznosti i vrednosti pH) u uslovima kontrolisane temperature (moguća su snimanja u opsegu od (-143 do +500 °C). Glavna prednost metode MAS se sastoji u mogućnosti istovremene vizuelizacije i ispitivanja osobina materijala kroz: merenja morfoloških osobina na nivou mikro i nano dimenzione skale. Informacija dobijena topografskim merenjima odnosi se na trodimenzionalan prikaz uzorka u svakoj tački na osnovu koga je moguće imati kvantitativnu informaciju o trećoj, visinskoj, dimenziji uzorka. Upravo ta informacija, kao i nivo njene tačnosti (subnanometarska) predstavlja osnovu za upravljanje pozicijom senzora koje se koristi u fizičko hemijskoj karakterizaciji uzoraka. Karakterizacijom fizičkih veličina (mehaničkih, električnih, magnetnih) se dobijaju kompleksne informacije o uzorku čijom interpretacijom se stiče uvid u osobine materijala. Pomenute prednosti predstavljaju odličnu osnovu za digitalnu obradu i manipulaciju snimljenim signalima kojom se na znatno



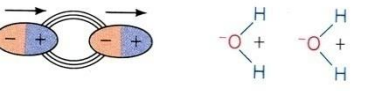
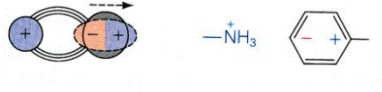
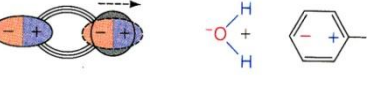
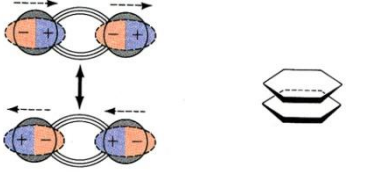
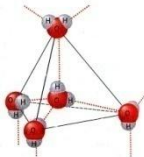

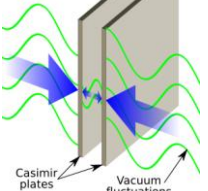
olakšan način mogu sprovesti kvantitativne analize koje nisu moguće drugim metodama. Primera radi, navodimo jednostavan slučaj analize topografskog profila u nekoliko tačaka koji se rutinski sprovodi u softveru za obradu snimka. Na slici vidimo osnovne mogućnosti analize profila i analize hrapavosti snimka ćelije kornealnog sloja. Analizu je moguće sprovesti kako na linijskim tako i na površinskim elementima snimka. Ono što AMF izdvaja u odnosu na druge metode jeste ne invazivnost metode koja omogućava karakterizaciju uzoraka i u atomskoj rezoluciji bez unošenja poremećaja u strukturi. Iz ove osobine proističe i druga prednost AMF koja je mogućnost karakterizacije u uslovima kontrolisane atmosfere i karakterizacija u tečnostima, što su uslovi koji mogu blisko odgovarati prirodnom okruženju. Metoda AMF omogućuje i snimanje u širokom opsegu uslova sredine. Tako je moguće podešavati temperaturu u širokom opsegu: od uslova hlađenja tečnim helijumom sve do nekoliko stotina stepeni na celzijusovoj skali. Moguće je izvršiti i prilagođenje atmosfere uvođenjem odgovarajućih gasova ali i snimanje u uslovima veoma visokog vakuuma (eng. Ultra High Vacuum – UHV). Trenutno naj naprednija primena AMF (ali i tehnički najzahtevnija) se odnosi na mogućnosti snimanja u tečnoj sredini u kojoj je moguće u velikoj meri oponašati uslove realnih procesa, pogotovo u biološkim i biomedicinskim istraživanjima.

Međumolekularne sile koje se karakterišu AMFom se mogu klasifikovati u tri klase. Prva klasa međumolekularnih sila potiče od čisto elektrostatičkih, kulonovskih interakcija u koje spadaju među dejstva koncentrisanih naelektrisanja (jona), dipola, kvadripola itd. Druga klasa sačinjena je od polarizacionih sila koje nastaju usled indukcije polarizovanog stanja u atomima i molekulima (inače nepolarnim) usled prisustva spoljnog električnog polja. Treća klasa su sile čija je priroda kvantno-mehanička koje kao posledicu imaju generisanje kovalentnih ili hemijskih veza i odbojnih sila koje na malim rastojanjima uravnotežuju privlačne sile. (Matija 2003.) Najbitnije su snažne interakcije koje pripadaju prvoj i trećoj klasi nakon njih su važne slabije sile nekoliko vrsta interakcija polarnih i polarizovanih molekula.

Međuatomske, međumolekularne sile i Atomic Force Microscopy (AFM)

Proces merenja međuatomskih i međumolekularnih sila (tabela 22) je mehano-elektromagnetni (fizikohemijski). Kako je apsorpcija infracrvenog (IC) zračenja principijelno isti proces kao kod prenosa energije sa jednog mehaničkog oscilatora na drugi (rezonanca) to je mehanotronika na nano nivou sasvim prirodan fenomen. Osnovni preduslov je da svi učesnici u energetsom procesu osciluju istom frekvencijom ili da je frekvencija jednog jednaka celom umnošku frekvencija drugog oscilatora. Nakon rezonancije, u sistemu koji je primio energiju povećava se amplituda oscilovanja dok se frekvencija ne menja. Apsorpcija elektromagnetnog zračenja predstavlja kvantni proces koji se dešava kod većine molekula u IC spektru sa energijama od 8-50 KJ/mol i odgovara razlikama između vibracionih energetskih nivoa. Na osnovu osobina kantilivera iz dobijene interakcije sa materijalom (u ovom slučaju uzorkom kože) dobijaju karakteristike ispitivanog materijala. Pregled osnovnih međumolekularnih interakcija dat je u Tabeli (22), pri čemu jedan molekul interaguje sa drugim kao jon-jon, jon-dipol, dipol-dipol idr. Interakcije, Kazimir-Polderova interakcija se dešava među ravnima dva materijala na rastojanji 10 nm do 50 nm. Tada se zapažaju fenomeni slični onima koji se događaju kod fluktuacije vakuma, interakcija elektrona i pozitrona. Tako nano svet pokazuje neobične osobine, uključujući i fenomen memristra, četvrtog elementa sveta elektronike, pored R, C i L.

Tabela 22. Osnovne međumolekularne interakcije (Matija 2003)

Naziv	shematski prikaz	$E = f(r)$
Jon-jon		$\frac{1}{r}$
Jon-dipol		$\frac{1}{r^2}$
Dipol-dipol		$\frac{1}{r^3}$
Jon-indukovani dipol		$\frac{1}{r^4}$
Dipol-indukovani dipol		$\frac{1}{r^6}$
Indukovani dipol-indukovani dipol		$\frac{1}{r^6}$
Vodonične veze	Mreža dipolnih momenata 	$\approx \frac{1}{r^2}$
Disperzione (Londonove) sile	Interakcija privremenih dipola od nepolarnih, ali polarizovanih tela 	$\approx \frac{1}{r^6}$
Kazimir-Polder interakcija (fluktuacija vakuuma)		$\approx \frac{A}{r^4}$

Privlačno-odbojne sile zavise od konture površine uzorka i usled promene visine konture one savijaju nanokonzolu. Upravljački sistem (PC računar) održava ugib nanokonzole konstantnim, ali se usled zatalasanosti

površine uzorka on stalno povećava ili smanjuje što se registruje laserskim zrakom koji se od vrha nanokonzole odbija u fotodetektor pozicije čija je svaka tačka opremljena senzorom-diodom koja lasersku odbijenu svetlost pretvara u električni signal. Položaj odbijenog zraka, odnosno pozicija diode koja pretvara svetlosni signal u električni, omogućava stalno praćenje vertikalne pozicije-ugiba nanokonzole. Informacija o ugibu se prenosi u korekcionni element koji grešku nastalu odstupanjem trenutne vrednosti ugiba od ravnotežne, koja je zabeležena na početku snimanja koriguje tako što pomera uzorak pomoću piezoelektričnog izvršnog elementa u vertikalnom pravcu kako bi se ugib nanokonzole stalno održavao na konstantnoj vrednosti. Sva pomeranja piezoelektričnog organa uzrokovana su promenama na konturi površine uzorka tako da zapis vertikalnog pomeranja uzorka (piezoelektričnog izvršnog elementa) zapravo predstavlja zapis izgleda konture površine uzorka. Podaci za svaku liniju-presek uzorka se beleže u računaru i na kraju se sve linije spajaju, čime se dobija 3D rekonstrukcija topografskog izgleda površine uzorka.

Osnovne sile koje se mere AMF su van der Waalsove interakcije. Teorija van der Waalsovih interakcija predstavlja objedinjenje i uopštenje svih do sada proučenih tipova interakcija kojima se dodaje još jedan član a to je disperziona interakcija. Disperziona interakcija je slična gravitacionoj sili u tome što deluje između svih atoma i molekula, bez obzira na naelektrisanje i polarizaciju. Disperzione sile predstavljaju možda i najvažniji doprinos međumolekularnim interakcijama jer su uvek prisutne, za razliku od ostalih tipova interakcije čija pojava može da zavisi od svojstava molekula. One su u suštini sile dugog dometa (od 0,2 do preko 10 nm) i mogu biti kako privlačne tako i odbojne. Poreklo ovih sila je kvantno mehaničko i ukratko se može objasniti kao trenutna vrednost interakcije svakog elektrona koji sa protonom formira dipol. Iako se može reći da srednja vrednost ovakve interakcije treba da teži nuli, ali nije tako i njihov intenzitet je znatan i kreće se oko vrednosti $1 kT$. Ako se uzmu u obzir sve tri komponente van der Waalsovih sila (indukcionu silu, orijentacionu silu i disperzionu silu) može se reći da su sve tri inverzno proporcionalne šestom stepenu rastojanja. Zatim nuklearne sile se pojavljuju u jezgrima atoma. Zakon

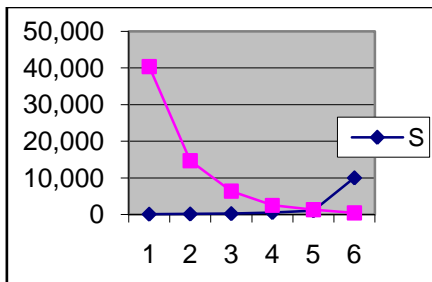
koji opisuje ove sile je donekle sličan prethodno pomenutim zakonima u tom smislu da opisuje brzo opadanje intenziteta sa povećanjem rastojanja. Brzina opadanja intenziteta je veoma velika tako da je domet dejstva ovih sila svega 10^{-15} m, ili 10^{-6} nm, što je opisano eksponencijalnom zavisnošću u odnosu na rastojanje reda veličine 10^{-15} m odnosno 10^{-6} nm. Na ovako malim rastojanjima ne moguće je primeniti zakone klasične mehanike (Njutnove zakone) već je za dobijanje eksperimentalno saglasnih rezultata neophodno primeniti zakone kvantne mehanike. Izraze ovih sila na tako malim rastojanjima je skoro ne moguće napisati (zbog složenosti) i u kvantnoj mehanici se za adekvatno opisivanje zapravo koristi koncept energije interakcija.

Osnovne sile u prirodi

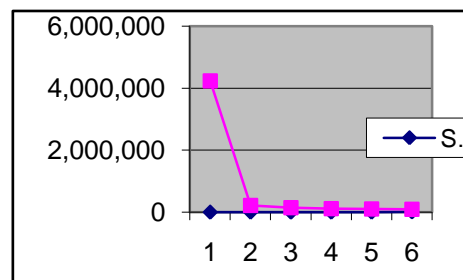
Prema opšte prihvaćenom stavu, u prirodi se srećemo sa četiri osnovne vrste sila: sila slabe nuklearne interakcije, sila jake nuklearne interakcije, elektromagnetna sila i sila gravitacije. Prve dve vrste sila se manifestuju na veoma kratkim odstojanjima (10^{-5} nm) i predstavljaju oblast proučavanja fizike atomskog jezgra, dok su preostale dve vrste znatno dužeg dometa delovanja i sa njima se svakodnevno srećemo. U najvećem broju slučajeva, elektromagnetne sile su te koje u potpunosti određuju karakter međumolekularnih interakcija a kroz njih i ponašanje fluida i čvrste materije. Gravitacione sile uglavnom upravljaju makroskopskim fenomenima, ali u pojedinim slučajevima deluju u sprezi sa elektromagnetnim silama (kapilarne pojave, viskoznost itd.). Za potpuno tačno tretiranje ovih pojava neophodno bi bilo koristiti principe kvantne mehanike (kvantne elektrodinamike) ali se pokazuje da je pristupom elektrostatike uz odgovarajuće aproksimacije moguće dobiti rezultate koji nisu potpuno tačni ali su u velikoj saglasnosti sa eksperimentima i mogu se relativno brzo realizovati. Bitan napredak u tumačenju međumolekularnih interakcija učinjen je uvođenjem pojma polja kojime se pojam sile razdvaja od objekta sile i proučava posebno.

11.4.3. Bioimpedanca

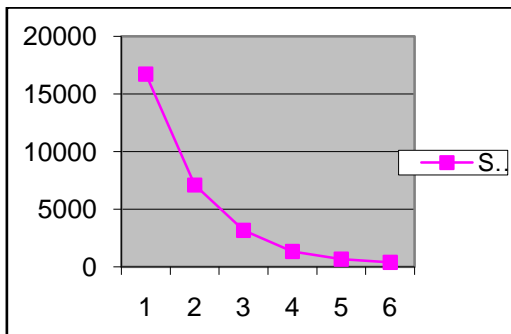
Impedansna spektroskopija in vivo, tri grupe ispitanika, je prikazana dijagramima. Vidljiva su na dijagramima električna svojstva kože i njihova zavisnost od frekvencije ulaznog pobudnog napona. Na dijagramima (92 i 93) su predstavljene impedance nultog sloja kože ispitanica koje su pile Zrenjaninsku vodu. Na apscisi je predstavljena frekvencija u Hz a na ordinati realan deo impedance u Ω .



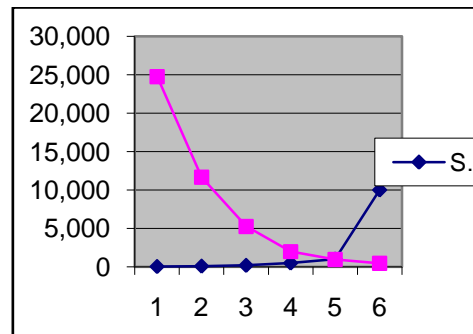
Dijagram 88. Impedanca ispitanice stare 43 g.



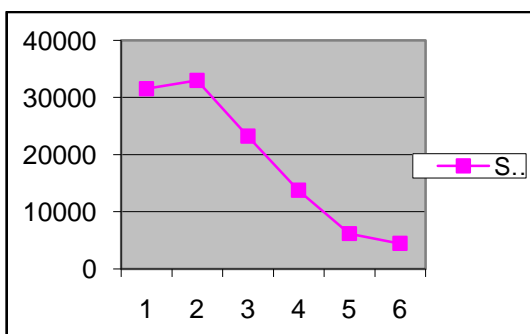
Dijagram 89. Impedanca ispitanice stare 51g.



Dijagram 90. Impedanca ispitanice stare 44 g.

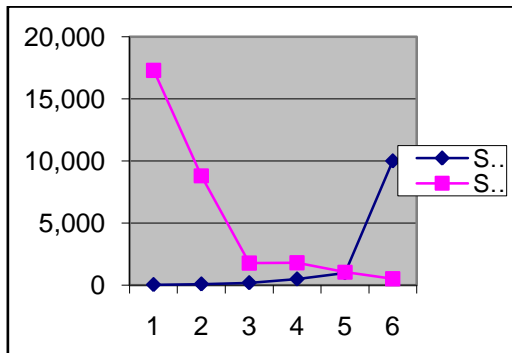


Dijagram 91. Impedanca ispitanice stare 52 g.

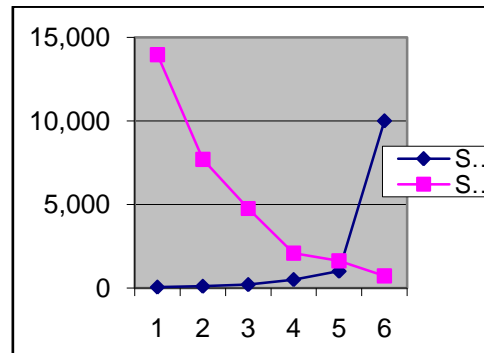


Dijagram 92. Impedanca ispitanice stare 96 g.

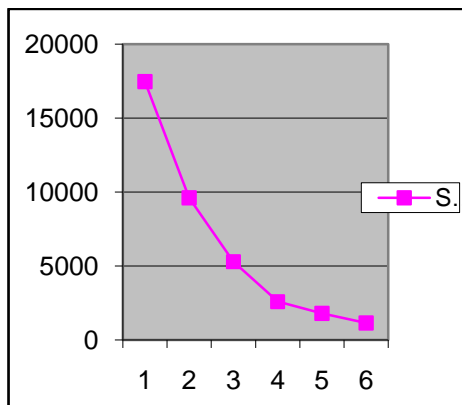
Dat su dijagrami ispitanica koje su pile Zrenjaninsku vodu nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice



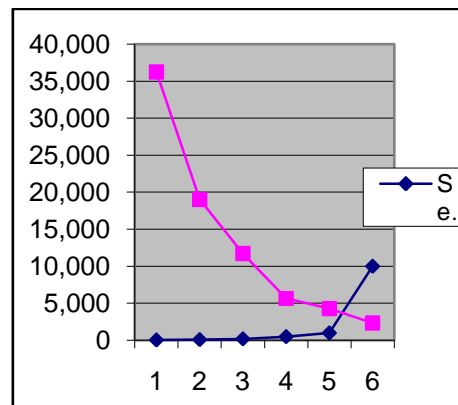
Dijagram 93. impedance nakon uklanjanja trećeg sloja ispitanice stare 51 g.



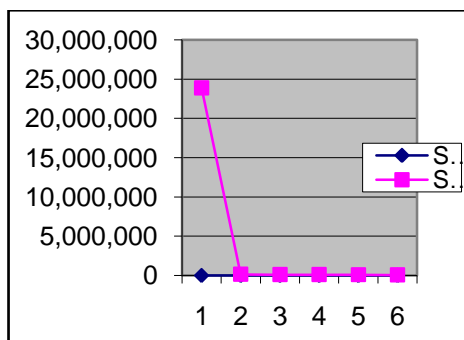
Dijagram 94. impedance nakon uklanjanja trećeg sloja ispitanice stare 43 g.



Dijagram 95. impedance nakon uklanjanja trećeg sloja ispitanice stare 44 g.

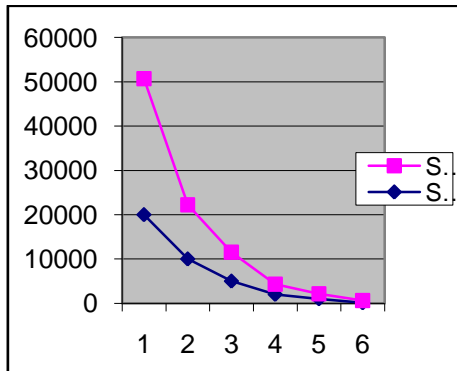


Dijagram 96. impedance nakon uklanjanja trećeg sloja ispitanice stare 52g.

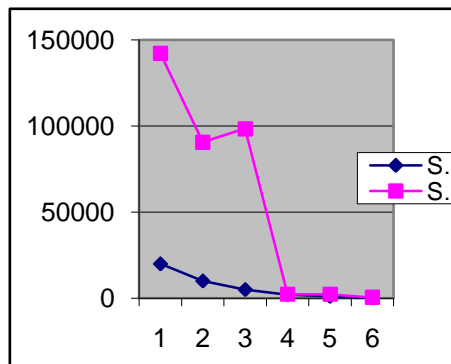


Dijagram 97. impedance nakon uklanjanja trećeg sloja ispitanice stare 44g.

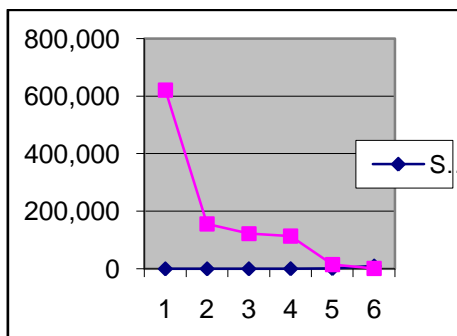
Na sledećim dijagramima su prikazane impedance ispitanika ženskog i muškog pola različite starosti koji su pili flaširane tipove voda, intaktne kože i kože nakon skidanja trećeg sloja pokožice.



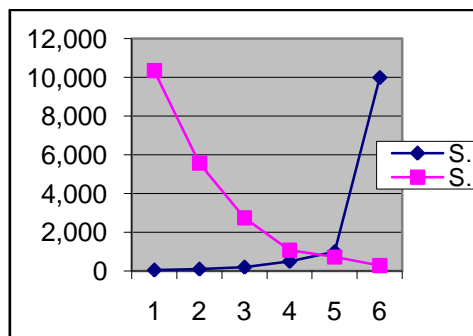
Dijagram 98. impedance intaktne kože ispitanika 23g. starosti.



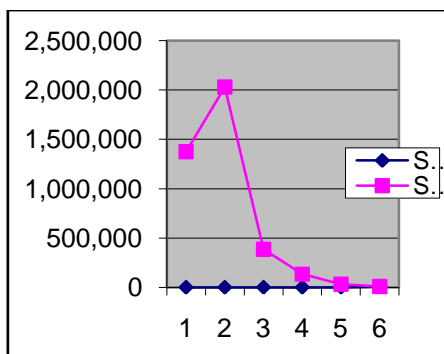
Dijagram 99. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 23g. starosti.



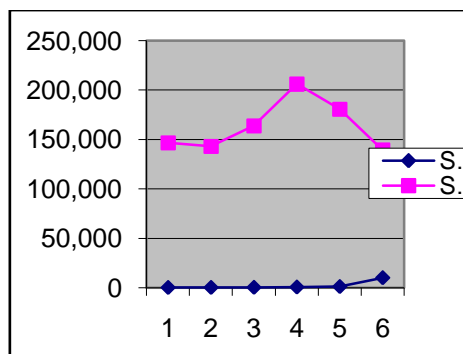
Dijagram 100. impedance intaktne kože ispitanika 29g. starosti.



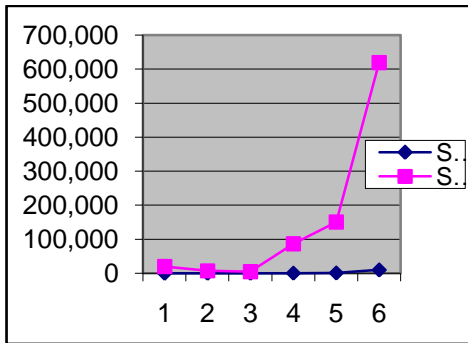
Dijagram 101. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 29g. starosti.



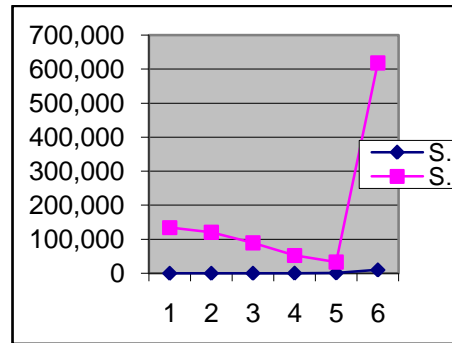
Dijagram 102. impedance intaktne kože ispitanika 55g. starosti.



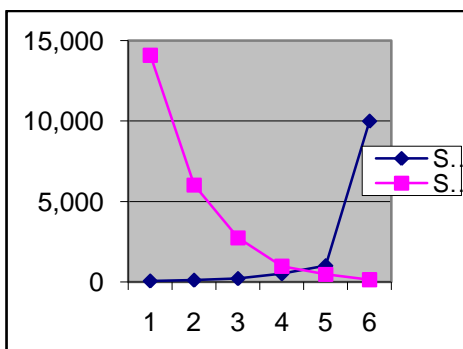
Dijagram 103. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 55g. starosti.



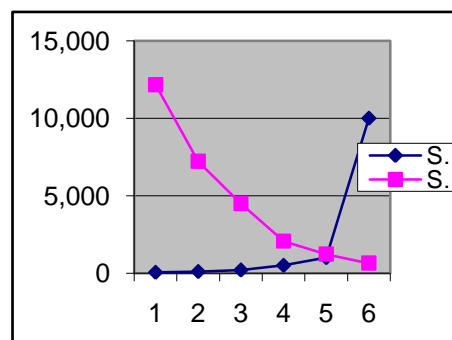
Dijagram 104. impedance intaktne kože ispitanika 60g. starosti.



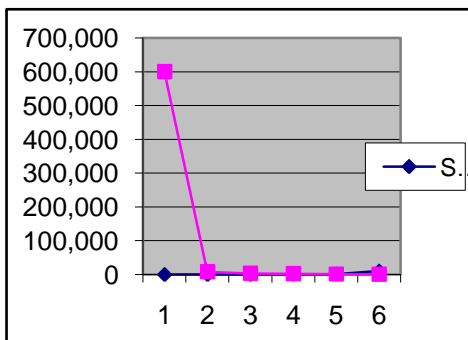
Dijagram 105. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 60g. starosti.



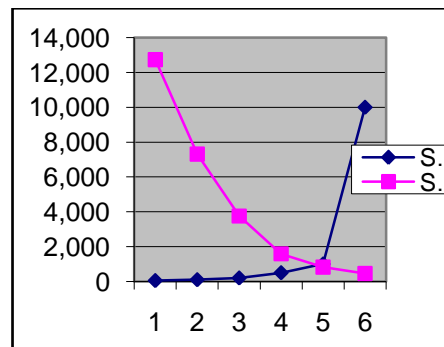
Dijagram 106. impedance intaktne kože ispitanika 36g. starosti.



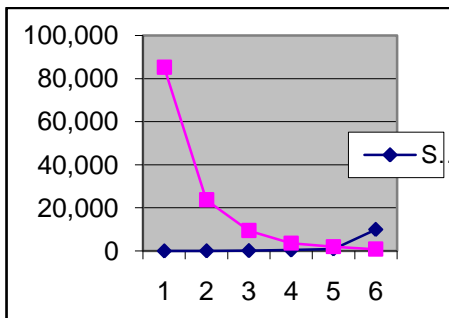
Dijagram 107. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 36g. starosti.



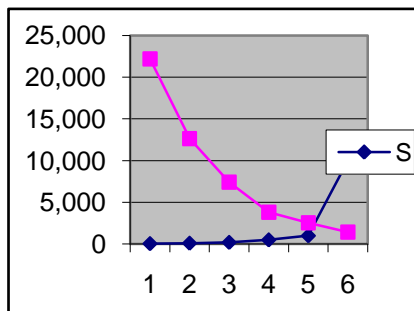
Dijagram 108. impedance intaktne kože ispitanika 38g. starosti.



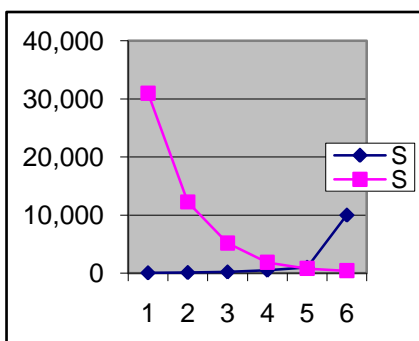
Dijagram 109. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 38g. starosti.



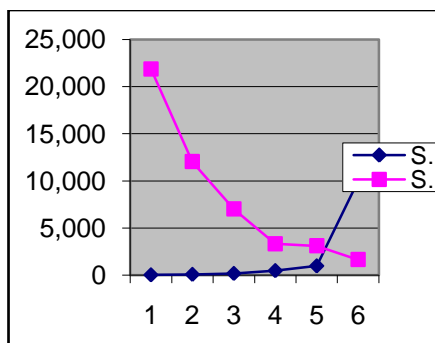
Dijagram 110. impedance intaktne kože ispitanika 40g. starosti.



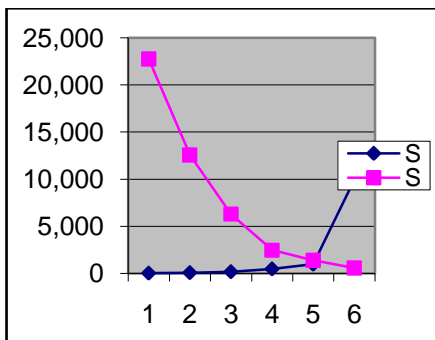
Dijagram 111. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 40g. starosti.



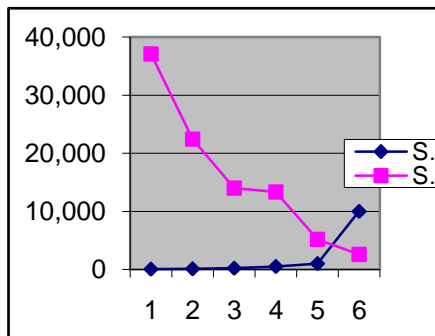
Dijagram 112. impedance intaktne kože ispitanika 45g. starosti.



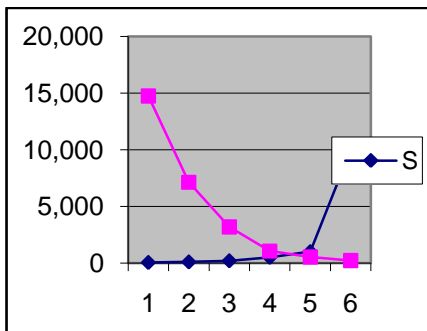
Dijagram 113. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 45g. starosti.



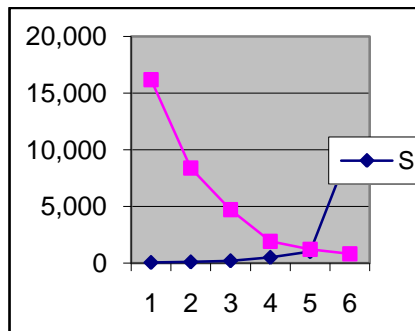
Dijagram 114. impedance intaktne kože ispitanika 53g. starosti.



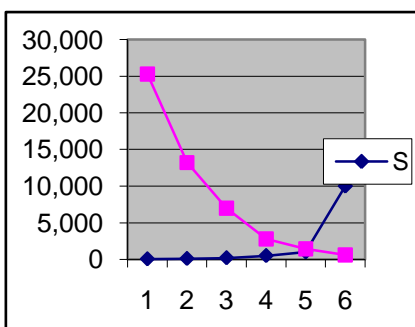
Dijagram 115. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 53g. starosti.



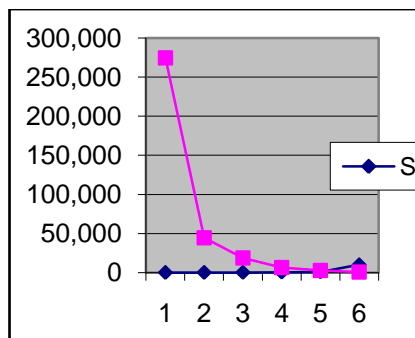
Dijagram 116. impedance intaktne kože ispitanika 55g. starosti.



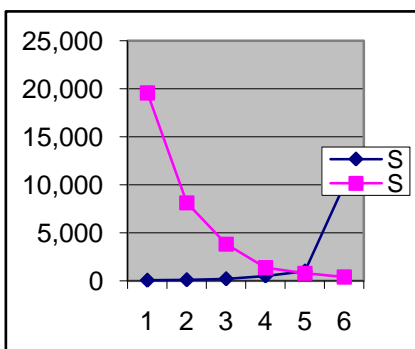
Dijagram 117. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 55g. starosti.



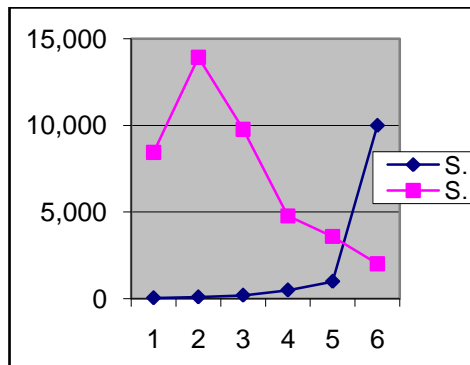
Dijagram 118. impedance intaktne kože ispitanika 57g. starosti.



Dijagram 119. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 57g. starosti.

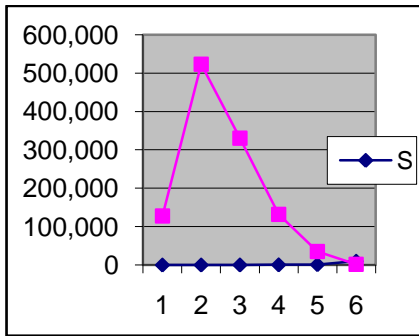


Dijagram 120. impedance intaktne kože ispitanika 77g. starosti.

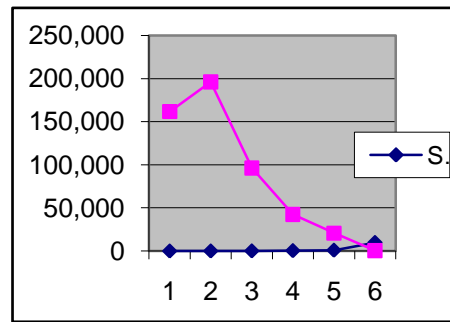


Dijagram 121. impedance intaktne kože nakon uklanjanja trećeg sloja pokožice ispitanika 77g. starosti.

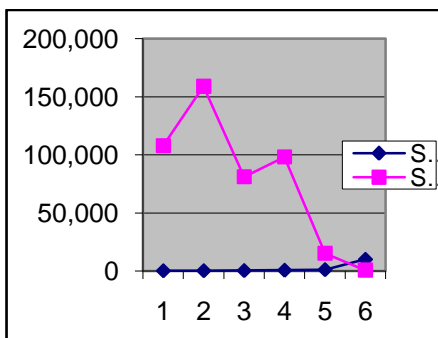
Sledeći dijagrami impedance kože su snimljeni na ispitanicima koji su pili Beogradsku vodu. Ispitanicima je merena samo impedanca intaktnog dela kože.



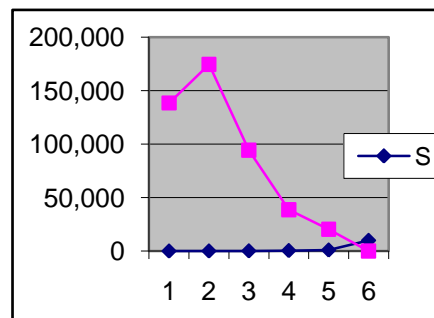
Dijagram 122. impedance intaktne kože ispitanika 31g. starosti.



Dijagram 123. impedance intaktne kože ispitanika 37g. starosti.



Dijagram 124. impedance intaktne kože ispitanika 41g. starosti.



Dijagram 125. impedance intaktne kože ispitanika 37g. starosti.

Dijagrami ispitanika sve tri grupe pokazuju razlike u bioimpedanci kože koje su posledice različitog uzrasta pola i vrste vode koju su pili i različitih drugih faktora.

BIOGRAFIJA

Janjić Goran, rođen je 30.03.1959 godine u Zrenjaninu, Republika Srbija. Osnovno i srednje obrazovanje stekao je u Zrenjaninu. Prirodno matematički fakultet u Beogradu upisao je školske 1978/79. godine, kao redovni student. Diplomirao je 1983. godine sa prosečnom ocenom 8,03 i time stekao visoko obrazovanje i stručni naziv diplomirani biolog. Poslediplomske studije na Prirodno-matematičkom fakultet u Beogradu 1983/84. godine a novembra 1988. godine odbranio je magistarsku tezu sa nazivom «Genetske i biohemijske korelacije u otpornosti prema nistatinu i etanolu kod *Saccharomyces cerevisiae*» čime je stekao zvanje magistra bioloških nauka. Od 1987. godine zaposlen je u Tehničkoj školi u Zrenjaninu gde predaje biologiju i ekologiju i zaštitu životne sredine. Do sada je učestvovao na naučnim skupovima u zemlji i objavio 9 naučnih radova, a učestvovao je u dvogodišnjem projektu Nacionalne energetske efikasnosti EE-263001 Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije.

Objavljeni radovi:

1. Mulić, V., Janjić, G., Balint B. "Matematički model motora SUS radnog vozila za briketiranje trske" 30. HIPNEF 2006 sa međunarodnim učešćem, 24.-26 maj 2006, Vrnjačka Banja.
2. Mulić, V., Janjić, G., Balint B. "Matematički model kretanja radnog vozila za briketiranje trske" 30. HIPNEF 2006 sa međunarodnim učešćem, 24.-26 maj 2006, Vrnjačka Banja.
3. Mulić, V., Janjić, G., Balint B. "Dinamika briketiranja predgrejane trske zavojnom presom" Zbornik radova PTEP 2006, Vrnjačka Banja 140-143.
4. Janjić, G., Mulić, V., B V., Balint, B. "Briketiranje trske u ribnjacima" Zbornik radova PTEP 2006, Vrnjačka Banja 42-45.

5. Mulić, V., Janjić, G., Balint B. "Adapteri vozila za briketiranje trske" ENEKO Budva 6 i 7 oktobar 2005 godine 181-187.
6. Mulić, V., Janjić, G., Balint B. "Matematički model kretanja voziola za briketiranje trske" Procesing 2006, Beograd 2006.
7. Janjić, G., Mulić, V., Balint, B. "Briketiranje duvanskog ostatka" Procesing 2006, Beograd 2006.
8. Mulić, V., Janjić, G., Balint B. "Adaptivno pumpno upravljanje briketiranjem organske prašine" Procesing 2006, Beograd 2006.
9. Mulić, V., Janjić, G., Balint B. "Agregatirano vozilo za podvodno košenje trske" KGHp 2006, Sremska Mitrovica 2006.
10. Janjić G., Extracelular/Intracellular and free/captured water in human organism, Water, Hydrogen Bonding Nanomaterials, Nanomedicine, The Book of Abstracts, 2010.
11. Miljković S., Kojić D., Matija L., Bandić J., Janjić G., Water nano-layers in human skin Water, Hydrogen Bonding Nanomaterials, Nanomedicine, The Book of Abstracts, 2010.
12. Vosika Z., Simić-Krstić J., Janjić G., Mitrović Z., On using bioimpedance and fractional calculus for skin hydration assessment Water, Hydrogen Bonding Nanomaterials, Nanomedicine, The Book of Abstracts, 2010.
13. Janjić G., Munćan J., Influence of carcinogen compounds on hydrogen bonds in water Water and nanomedicine, The Book of Abstracts, 2011.
- 14 Koruga Đ., Bandić J., Janjić G., Č. Lalović, Munćan J. and Dobrosavljević Vukojević D., Epidermal Layers Characterisation by Opto-Magnetic Spectroscopy Based on Digital Image of Skin, Acta Physica Polonica Vol. 121 (2012).