

Univerzitet u Beogradu
Mašinski fakultet

Zorana Golubović, dipl.inž.maš

**ISTRAŽIVANJE INTERAKCIJE DEJONIZOVANE VODE
SA HIDROFILNIM I HIDROFOBNI MATEIJALIMA,
BIOMOLEKULIMA I
HIDROGENIZOVANIM UGLJENIČNIM
NANOMATEIJALIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

Komisija za pregled i odbranu

Mentor: **Prof.dr Đuro Koruga**
Mašinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije: **Prof.dr Aleksandar Sedmak**
Mašinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Jovana Simić-Krstić
Mašinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Lidija Matija, naučni savetnik
Mašinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof.dr Dejan Raković
Elektrotehnički fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Datum promocije:

Zahvaljujem se mom mentoru, prof.dr Đuri Korugi na konstruktivnim sugestijama i podršci pri izradi ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem profesoru Džeraldu Polaku sa katedre za Bioinženjerstvo, Univerzitet Vašington, Sijetl, SAD, što mi je omogućio da pod njegovim mentorstvom izvršim istraživanja koja su predmet ove doktorske disertacije.

Zorana Golubović

Istraživanje interakcije dejonizovane vode sa hidrofилnim i hidrofobnim materijalima, biomolekulima i hidrogenizovanim ugljeničnim nanomaterijalima

Abstrakt

Predmet i cilj istraživanja ove doktorske disertacije je utvrđivanje postojanja interakcije između dejonizovane vode (18,2 M Ω) i različitih tipova materijala: hidrofobni i hidrofилni materijali, biomolekuli, hidrogenizovani ugljenični nanomaterijali. Da bi se ovaj cilj realizovao izvršene su četiri različite vrste eksperimenta u kojima su korišćene različite koncentracije rastvorenih ispitivanih supstanci, pri čemu su sve promene posmatrane putem mikroskopije sa velikim uvećanjima i rezolucijom, a podaci obrađivani kompjuterskim softverom.

Istražujući interakcije dejonizovane vode objašnjen je fenomen ekskluzivne zone sa aspekta vodoničnih veza, potvrđen je fenomen postojanja ekskluzivne zone koji se može snimiti mikroskopom na osnovu migracije mikrosfera prečnika 1 μm u vodenim rastvorima, utvrđeno je da veličina ekskluzivne zone zavisi od koncentracije mikrosfera u rastvoru, da se u kontaktu hidrogenizovanih ugljeničnih nanomaterijala i hidrofobnog materijala stvara zona vode sa drugačijim karakteristikama i da se pored sočiva kao hidrofилne membrane u dodiru sa hidrofилnim mikrosferama formiraju ekskluzivne zone.

Prvi put je posmatran fenomen struktuiranja i stvaranje uređenih slojeva pri interagovanju hidrogenizovanog ugljeničnog nanomaterijala fullerola, hidrofилnih čestica mikrosfera i hidrofobnog materijala nafiona.

Fenomen stvaranja ekskluzivne zone ima višestruke primene i značaj u ispitivanju biološkog sveta, pa se tako koristi u procesima prefiltriranja vode, biomedicini pri stvaranju suznog filma i nanofluidici pri stvaranju transportnih i procesnih elemenata na nano-nivou. Izvršena istraživanja će imati uticaj na razvoj „*water based nanomedicine*“ oblasti biomedicinskog inženjerstva uz primenu biokompatibilnih nanomaterijala.

Ključne reči: voda, ekskluzivna zona, hidrofилni i hidrofobni materijali, vodonične veze, kvantna superpozicija, nanomaterijali, biomolekuli.

Naučna oblast: Biomedicinsko inženjerstvo

UDK broj: 602:577:66.017/.018(043.3)

Investigation of interaction of deionized water with hydrophilic and hydrophobic materials, biomolecules, and hydrogenized carbon nanomaterials

Abstract

Subject and the goal of this doctoral dissertation is determination of appearance and existence of the interaction between deionized water (18,2 MΩ) and different types of materials: hydrophobic and hydrophilic materials, biomolecules, hydrogenized carbon nanomaterials. To realize this goal there were conducted four experiments in which are used different concentrations of diluted examined substances, all changes are observed with high resolution microscopy, and data are elaborated with computer software.

By examining the interaction of deionized water it is explained phenomena of exclusion zone from the aspect of the hydrogen bonds, it is confirmed the phenomena of exclusion zone which can be observed and recorded with microscope based on migration of microspheres whose diameter is 1 μm in water solutions, it is determined that size of the exclusion zone depends of the concentration of microspheres in the solution, that in contact of hydrogenized carbon nanomaterials and hydrophobic material forms area of water with different properties, and that next to the contact lens as hydrophilic membrane in contact with hydrophilic microspheres exclusion zone is forming.

For the first time is examined and observed the appearance of structuring layers in interaction of hydrogenized carbon nanomaterial fullerol, hydrophobic particles microspheres, and hydrophobic material nafion.

Phenomena of exclusion zone have multiple implementations and significance in examination of biological systems, so it can be used in processes of prefiltration of water, biomedicine of making tear film, and nanofluidics in making the transport and process elements on nano-level. Experiments that have been done will have the impact on development of „water based nanomedicine“ part of biomedical engineering with application of nanomaterials.

Key words: water, exclusion zone, hydrophobic and hydrophilic materials, hydrogen bonding, quantum superposition, nanomaterials, biomolecules.

Scientific field: Biomedical engineering

UDK number: 602:577:66.017/.018(043.3)

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U RADU

UTV – ukupna voda u telu

Ab initio –latinski izraz značenja „od početka“

NMR – nuklerana magnetna rezonanca

EXCL – eng. *exclusion* –isključenje čestica

EZ – *eksluzivna zona*, zona molekula vode u kojoj nema prisustva stranih tela, a nastaje superpozicijom vodoničnih veza tečne i čvrste faze vode

UV-Vis - eng. *UltraViolet-Visible* - opseg elektromagnetnog zračenja koji pokriva ultraljubičastu svetlost i vidljivu svetlost

NIR – eng. *Near-Infrared* – blisko infracrveno zračenje

LC – eng. *lethal concentration* – smrtonosna koncentracija

CFU/ml – eng. *colony forming unit* – održive bakterijske ćelije u uzorku po mililitru

In vivo - latinski izraz značenja “unutar živećeg organizma” - označava uslove izvođenja postupka kada je živi organizam celina.

In vitro - latinski izraz značenja “u staklu” - označava izvođenje postupka u veštačkim uslovima, izvan živog organizma, u kontrolisanim laboratorijskim uslovima

SC – latinski naziv *Stratum Corneum* – rožnati, prvi sloj epidermisa kože

TEWL – eng. Trans Epidermal Water Loss – gubitak vode kroz epidermis

RGP – gas propusna sočiva

ppm, ppb – eng. *particle per million, particle per billion* - broj primesa u vodi po molekulu vode (broj parikula primese na milion, odnosno milijardu molekula vode)

Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet

KLJUČNE DOKUMENTACIJSKE INFORMACIJE

Redni broj:

RB

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani zapis

TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija

VR

Autor: Zorana Golubović, dipl.inž.maš

AU

Mentor/ko-mentor: Prof.dr Đuro Koruga

MN

Naslov rada: „Istraživanje interakcije dejonizovane vode sa hidrofilnim i hidrofobnim materijalima, biomolekulima i hidrogenizovanim ugljeničnim nanomaterijalima“

Jezik publikacije: Srpski

JZ

Jezik izvoda: Srpski

Jl

Zemlja publikovanja: Srbija

ZP

Uže geografsko područje: Beograd

UGP

Godina: 2012

GO

Izdavač: Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa: Mašinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Kraljice Marije 16

MF

Fizički opis rada: (broj poglavlja/strana/tabela/slika)

FO (11/125/13/75)

University of Belgrade, Faculty of Mechanical Engineering

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: Monographic document

DT

Type of record: Textual printed material

TR

Contents code: Doctorate of science work

CC

Author: Zorana Golubovic, MScME

AU

Mentor/C-mentor: Professor Djuro Koruga, PhD

MN

Title: „Examination of interaction of deionized water with hydrofobic and hydrophilic materials, biomolecules, and hydrogenized carbon nanomaterials“

Language of text: Serbian

LT

Language of abstract: Serbian

LA

Country of publication: Serbia

CP

Publication year: 2012

PY

Publisher: The author's reprint

PB

Publication place: Belgrade

PL

Physical description: (chapters/pages/tables/pictures)

PD (11/125/13/75)

SADRŽAJ

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1.1 | Značaj vode za biološki život | 3 |
| 1.2 | Značaj i uloga vode za ljudski organizam | 7 |
| 1.3 | Metabolizam vode u ljudskom organizmu | 9 |
| | <i>Raspodela telesnih tečnosti.....</i> | <i>11</i> |
| | <i>Starenje i raspodela telesnih tečnosti.....</i> | <i>12</i> |
| 1.4 | Ukazivanje na značaj istraživanja boljeg poznavanja dinamike vode za funkcionisanje ljudskog organizma | 13 |
| | <i>Kretanje vode između intercelularne i ekstracelularne tečnosti</i> | <i>13</i> |
| | <i>Važnost hidratacije u ljudskom organizmu</i> | <i>16</i> |
| 2.1 | Voda..... | 18 |
| | <i>Molekul vode.....</i> | <i>21</i> |
| | <i>Model vodenih klastera</i> | <i>26</i> |
| | <i>Teorijski pogledi na vode na graničnim površinama</i> | <i>31</i> |
| | <i>Mehanička merenja vode na graničnim površinama</i> | <i>32</i> |
| 2.3 | Osobine vode u prisustvu hidrofobnog-hidrofilnog materijala nafiona i mikrosfera... 32 | |
| | <i>Voda na graničnim područjima i ekskluzivna zona</i> | <i>32</i> |
| | <i>Ekskluzivna zona i nafion</i> | <i>34</i> |
| 4. | MATERIJAL | 41 |
| 4.1 | 18.2 MΩ voda | 41 |
| | <i>Dejonizacija vode.....</i> | <i>41</i> |
| 4.2 | Nafion | 44 |
| 4.3 | Mikrosfere | 45 |
| 4.4 | Kontaktno sočivo | 47 |
| 4.5 | Kolagen tipa I..... | 49 |
| | <i>Osobine vode u prisustvu biomolekula kolagena tipa I.....</i> | <i>49</i> |
| 4.6 | Hidrogenizovan nanomaterijal fullerol C ₆₀ (OH) ₂₄ i njegove interakcije sa vodom..... | 51 |
| | <i>Fulleroli.....</i> | <i>53</i> |
| 5.1 | Osnove esperimenta..... | 58 |
| | <i>Komora</i> | <i>58</i> |
| | <i>Držać za tubu Nafiona.....</i> | <i>59</i> |
| | <i>Slikanje i snimanje.....</i> | <i>60</i> |
| 5.2 | Postavke eksperimentalnih istraživanja..... | 60 |
| | <i>Eksperiment 1 – Ispitivanje rastvora dejonizovane vode sa mikrosferama.....</i> | <i>61</i> |
| | <i>Eksperiment 2 – Ispitivanje rastvora hidrogenizovanog nanomaterijala fullerola sa mikrosferama u dejonizovanoj vodi.....</i> | <i>62</i> |
| | <i>Eksperiment 3 – Ispitivanje biomolekula kolagena tipa I u različitim koncentracijama i oblicima sa mikrosferama u dejonizovanoj vodi.....</i> | <i>63</i> |
| | <i>Eksperiment 4 – Ispitivanje kontaktnih sočiva sa rastvorima dejonizovane vode sa mikrosferama i rastvorima za sočiva sa mikrosferama.....</i> | <i>64</i> |
| 6.1 | Rezultati istraživanja interakcije dejonizovane vode sa hidrofobnim i hidrofilnim materijalima..... | 66 |

| | | |
|------|--|-----------|
| 6.2 | Rezultati istraživanja interakcije dejonizovane vode sa hidrogenizovanim ugljeničnim nanomaterijalom (fulerolom) | 69 |
| | <i>Poređenje između eksperimenta 1 i 2.....</i> | <i>71</i> |
| 6.3 | Rezultati istraživanja interakcije dejonizovane vode sa biomolekulima | 72 |
| 6.4 | Rezultati istraživanja interakcije sočiva sa hidrofilnim materijalom | 75 |
| | <i>Kontaktna sočiva sa vodenim rastvorom mikrosfera.....</i> | <i>75</i> |
| | <i>Kontaktna sočiva sa rastvorom za sočiva i mikrosferama.....</i> | <i>76</i> |
| 7.1. | Diskusija rezultata ispitivanja interakcije vode sa hidrofobnim i hidrofilnim materijalima..... | 79 |
| 7.2 | Diskusija rezultata ispitivanja interakcije vode sa biomolekulima | 84 |
| 7.3 | Diskusija rezultata ispitivanja interakcije vode sa hidrogenizovanim ugljeničnim nanomaterijalima | 89 |
| 7.4 | Eksluzivna zona i klasično-kvantne osobine vodoničnih veza | 90 |
| | <i>Klasično-kvantne osobine vodonične veze.....</i> | <i>90</i> |
| | <i>EZ kao superpozicija vodoničnih veza molekula vode kao čvrste i tečne faze</i> | <i>94</i> |
| | Prilog 1 - Trideset osam anomalija vode..... | 115 |
| | Prilog 2 - Otpornost i provodljivost vode..... | 118 |
| | Prilog 3 - Vodonične veze | 119 |

„Nothing is softer, or more flexible than water, yet nothing can resist it.“

Lao Tzu

*„Ništa nije mekše, ili fleksibilnije od vode,
a ipak ništa nije izdržljivije od nje.“*

Lao Ce

1. UVOD

Postojanje biološke forme života bez vode nije moguće. Od davnih vremena ljudi su bili svesni njenog značaja, a često su joj pripisivali čudesna, pa čak i mistična svojstva. Poslednjih decenija dvadesetog veka, voda je postala predmet ozbiljnijih naučnih istraživanja i fizičara i hemičara koji su pokazali da voda ima pravilnu kristalnu strukturu i da u prirodi ne postoje dva ista vodena kristala. Forma kristala određuje karakteristike vode. Najnovija istraživanja ukazuju da voda ima i energo-informacione karakteristike. Ona je izvor slabog elektromagnetnog zračenja, odnosno njeni molekuli i klasteri, emituju elektromagnetne talase. Voda je strukturni deo ćelije, unutrašnjosti membrane i vanćelijskog prostora.

Pod uticajem bilo kakvih spoljašnjih faktora kao što su mikroorganizmi, toksini i razna zračenja, menjaju se informacione karakteristike vode, odnosno menjaju se struktura i funkcija ćelija (njenih delova), tkiva, organa i organizma u celini. Zato, ove promene talasnih karakteristika vode, mogu da budu najranjiji znaci mogućih pojava obolenja, koja mogu da se registruju na biorezonantnom pregledu, a uz pomoć biorezonantne terapije mogu da se koriguju. Savremena medicina u cilju poboljšanja zdravlja, dok se bolest još nije pojavila, istražuje dublje od atoma i molekula, tako da je „Jedinstvenost strukture vode tek od nedavno jasna. Primećeno je, da ona postoji u, za nas, sasvim neočekivanom stanju, koje joj omogućava da prima na sebe informaciju, da je zapamti, da je reflektuje, odnosno, ona se sastoji iz ćelijica (kao saće) i svaka od njih je mini kompjuter. Tako na osnovu tog mini biokompjutera mi smo svi stvoreni“ (prema Stanislavu Zeninu, ruskom naučniku, biologu).

Voda čuva energo-informaciju u vidu elektromagnetne oscilacije (klasičnog i kvantnog talasa) o svim supstancama koje bi mogle da se nađu u njoj i ona se zadržava i posle hemijskog čišćenja. Ta energo-informacija može da deluje „pozitivno“ ili „negativno“ na bilo koji živi organizam. Voda ih razmenjuje, „razgovara“ sa okolinom. Ova karakteristika vode daje moguće objašnjenje

„pamćenja“ i „komuniciranja“ ćelija. U eksperimentima tokom kojih su posmatrani limfociti, ćelije koje služe za odbranu od stranih agenasa (mikroba ili maligne ćelije), odbrambene ćelije iz udaljenih mesta u organizmu su nepogrešivo znale na koje mesto treba da dođu, gde je strano telo, kao da ih je neka nevidljiva sila vodila (što i jeste nevidljivo), a to su elektromagnetni talasi. Registrovane su frekvencije ovih talasa koje imaju negativan uticaj na nas, npr.: 1,8 Hz odgovara vodi koja sadrži teške metale, a registrovana je i kod maligne ćelije, dok 5,0 Hz izaziva kod mnogih ljudi apatiju i mučninu itd. Međutim, voda emituje i frekvencije koje deluju pozitivno na naš organizam, čak imaju i lekovita svojstva i to su: 1,2 Hz; 2,5 Hz; 10,0 Hz; 7,8 Hz - Šumanovi talasi, koji su prisutni i u prirodi i imaju značajnu ulogu pri funkcionisanju mozga. Takva, prirodna voda, naziva se i *biološki aktivna voda*, i njena osnovna fizička karakteristika je da atomi imaju elektrone u spoljnoj orbitali, što je jedan od ključnih aspekata zdrave vode - koliko slobodnih elektrona ima ili ne, odnosno da li je „struktuirana“ ili „nestruktuirana“. Naučnici su otkrili da su u čovečijem organizmu, sve bolesne ćelije okružene tzv. „nestruktuiranom“ vodom, a zdrave ćelije „struktuiranom“. U „nestruktuiranoj“ vodi, nedostaje jedan elektron iz spoljne orbitale, a u „struktuiranoj“ su svi elektroni na broju. Kada se kreće duž vodovodnih cevi, umesto da se kreće po svojoj prirodnoj spirali, voda menja način kretanja i ide po koncentričnim krugovima, što dovodi do deformacije njene strukture i kao takva ugrađuje se u naše ćelije, što je jedan od preduslova za nastajanje bolesti. Otkrivanjem ovih osobina vode, pažnja naučne javnosti je usmerena na načine njene aktivacije i popravljavanja strukture. Do sada se pokazalo da razni veštački načini vodi ne daju u potpunosti prirodan izgled njenih atoma.

Biološki adekvatna voda, koja se nalazi u prirodi i potpuno odgovara živim organizmima, dobija se iz leda i snega otapanjem, zove se „odmrznuta voda“. U zamrznutoj, pa posle otopljenoj vodi, prečnik molekula se menja i potpuno odgovara veličini otvora na ćelijskoj membrani. Takvi molekuli vode lakše se kreću i stupaju u reakciju s različitim supstancama u organizmu, štedeći energiju. Odmrznuta voda se od obične razlikuje po svojoj strukturi i više odgovara strukturi protoplazme naših ćelija. U njoj, za razliku, od obične vode iz vodovodnih cevi nema elemenata koji opterećuju ćelije i zahtevaju veliku energiju da bi ona

normalno funkcionisala, a ne sadrži ni primese potencijalno otrovnih supstanci. Naučnici su utvrdili da odmrznuta voda nosi veliki energetska potencijal i značajno stimulira životne procese u organizmu. Naše ćelije su u rezonanci sa ovakvom prirodnom vodom. Smatra se da ona, zbog ovih karakteristika, odlaže starenje, odnosno, „podmlađuje“ organizam i da je to tajna dugog života nekih naroda (oblasti Kavkaz i Jukutija). Isto dejstvo je otkriveno i na ostali živi svet. Ovakva, *aktivna voda* može da se dobije ako se koristi „tehnologija“ same prirode, sporim zaleđavanjem i odstranjivanjem taloga, do čega dolazi, zato što led ima kristalnu strukturu sastavljenu iz molekula vode. Drugim primesama koje su rastvorene nema mesta u kristalnoj rešetki, tako da se čestice štetnih supstanci smeštaju u međuprostor i njima treba duže vreme i niža temperatura da se zalede u odnosu na obične, čiste vodene kristale. Ove štetne materije praktično budu istisnute i lako se odvajaju. Slične karakteristike i strukturu voda dobija kada prolazi kroz magnetno ili električno polje, što spada u domen *kvantne biofizike* i *medicine*, dovođenje organizma u rezonancu sa prirodom. Priroda oduvek funkcioniše po principu jedinstva (sinergije) klasičnih i kvantnih zakona.

Periodi naglog industrijskog razvoja u prošlosti su uvek započinjali otkrićem novih materijala, najpre gvožđa i čelika, zatim polimera, lakih legura, kompozitnih materijala, poluprovodnika, keramike i na kraju *nanomaterijala*. Popularizacija naučne oblasti nanotehnologije vezuje se za predavanje američkog fizičara Richarda Feynmana koji je 29.12.1959. na godišnjoj konferenciji „Društva američkih fizičara“ predstavio ideju da se može manipulirati atomima i molekulima.

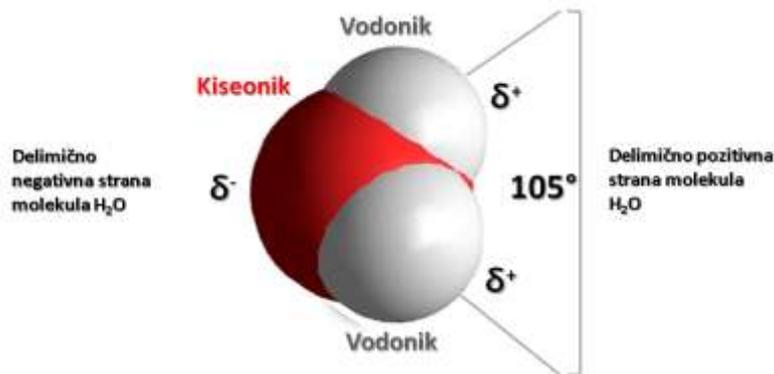
1.1 Značaj vode za biološki život

Voda je najneobičnija, najparadoksalnija i „najanomalnija“ materija na planeti. Prisutna je u formi pojedinačnih molekula, leda, tečnosti ili pare skoro svuda. Život na Zemlji razvio se kao posledica interakcije svetlosti i vode, tj. interakcije spoljnih i unutrašnjih faktora, elektromagnetizma i gravitacije sa jedne strane i različitih materija na Zemlji sa druge, a u prvom redu vode, atoma i jona. Iako postoje teorije koje sugerišu da je postojalo stvaranje života i u nevodenim

sredinama, poznato je da živi sistemi na Zemlji zavise od i preživljavaju zahvaljujući vodi.

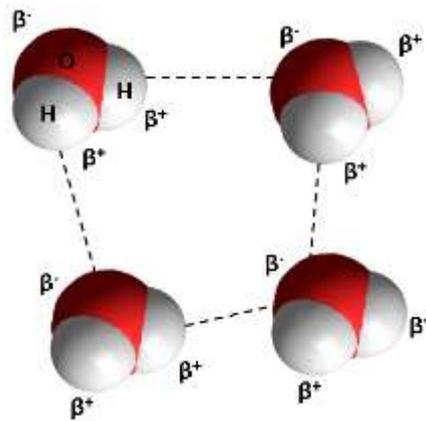
Voda pokriva više od 3/4 Zemljine površine i prosečno čini više od 3/4 telesne mase živih organizama. Nijedna materija na Zemlji nema takvu sposobnost kruženja kao voda jer se ona neprestano transformiše i stalno „putuje“. Može duže da „miruje“ jedino kad je „zarobljena“ u čvrstim materijama, ili zaleđena u polarnim prostranstvima. Međutim, postepene klimatske makropromene i geološke transformacije učinile su da više nema ni kapi vode koja nekad nije bila zamrznuta ili „ugrađena“ u čvrstu materiju. U morskim, okeanskim i jezerskim vodama neprestano se dešavaju strujanja, kako „u horizontali“, tako i „u vertikali“. Podzemni i nadzemni vodotokovi neprestano teku vučeni gravitacijom. Voda sa svih vodenih površina stalno isparava i na temperaturama mnogo nižim od tačke ključanja. To isparavanje je mnogo sporije nego pri ključanju i naziva se sublimacija. Isparena voda odlazi u atmosferu gde formira razne vrste oblaka i nakon kondenzacije pada na tlo u vidu atmosferskih padavina (kiša, sneg, itd.) i tako neprekidno. Događa se da voda u toku kruženja bude „potrošena“ od strane neke biljke ili životinje, pa se ta voda opet vraća u prirodnu cirkulaciju, izlučivanjima ili raspadanjem organizma posle njegovog uginuća ili smrti. Ovo kruženje vode, međutim, nije nikad teritorijalno lokalizovano. Morske i vazdušne struje (koje nose oblake) čine veoma komplikovanu „putnu“ mrežu vode koja mnogostruko obavija planetu Zemlju, pa se može reći da na Zemlji verovatno nema ni jednog jedinog molekula vode koji mnogo puta nije obišao čitavu planetu, „upamtivši“ pri tom na kvantnom informacionom nivou mnogo toga iz Zemljine istorije duge više milijardi godina.

Posmatrano sa hemijskog aspekta, voda ima veoma jednostavnu atomsku strukturu. Sastoji se od dva atoma vodonika koji su povezani sa jednim atomom kiseonika (H₂O). Priroda ove atomske strukture je zaslužna za jedinstvene elektro-hemijske osobine molekula vode. Strana molekula vode gde se nalazi vodonik je delimično pozitivno naelektrisana, a strana gde je kiseonik je negativno naelektrisana.



Slika 1.1: Raspored naelektrisanja molekula vode.

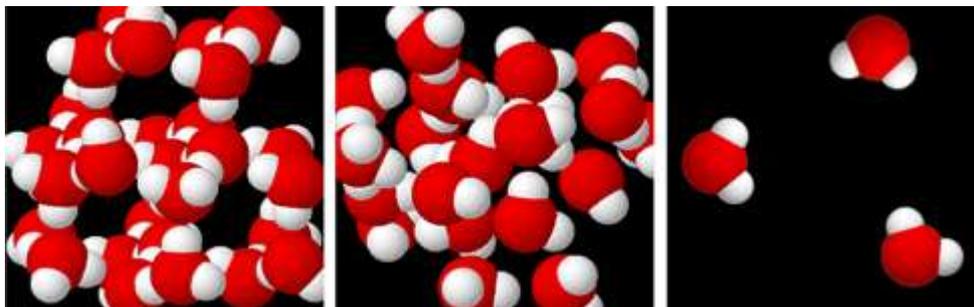
Polarnost naelektrisanja koja nastaje u međusobnim interakcijama dovodi do međusobnog privlačenja molekula vode i stvaranja vodoničnih veza među njima. Molekul vode je polaran jer je podela elektrona između kiseonika i vodonika nejednaka. Zajednički valentan elektron kiseonika i vodonika provodi duži vremenski period pored kiseonika, nego pored vodonika i zbog veličine atoma prelazi duži put i samim tim privlači veću količinu naelektrisanja elektronskog oblaka. Elektrostatičko privlačenje među susednim molekulima vode dovodi do stvaranja vodoničnih veza. Pored elektrostatike, koja predstavlja klasični pristup, učestuje i talasna funkcija koja predstavlja kvantni pristup. Magnetno polje, kao i temperatura, utiču na stvaranje vodoničnih veza. Do temperatura od 50°C vodonične veze poseduju i kvantna i klasična svojstva, dok pri višim temperaturama poseduju samo klasična elektromagnetna svojstva. Takođe, pri magnetnom polju od 50 mT i više, vodonične veze molekula reaguju, što dovodi do zaključka da magnetno polje može biti korišćeno u cilju struktuiranja vode [Koruga et al, 2010]. Do ovih saznanja se došlo eksperimentalnim merenjima kvantnog i klasičnog udela aktivnosti vodoničnih veza u vodi pomoću optomagnetne spektroskopije i magnetnog delovanja u interakciji svetlost-voda [Koruga et al, 2009].



Slika 1.2: Četri tipa vodoničnih veza molekula vode sa dve aktivne vodonične veze (2H, 2O, OH, HO).

Vodu karakteriše nekoliko jedinstvenih fizičkih osobina:

- Voda ima visoku **specifičnu toplotu**. Zbog ove osobine voda može da apsorbuje veliku količinu toplote pre nego što zaista postane topla. Obratno, voda sporo otpušta toplotu kada dolazi do hlađenja.
- Voda **provodi** toplotu mnogo lakše od bilo koje druge tečnosti.
- U čistom stanju voda bez primesa ima neutralnu **pH vrednost**, jer čista voda nije ni kisela ni bazna. pH vrednost se menja kada se u vodi rastvaraju supstance.
- Voda predstavlja jedino hemijsko jedinjenje koje se prirodno može naći u sva, do sada poznata, **tri agregatna stanja**. Bez obzira u kom se stanju nalazi, molekuli vode se raspoređuju na veoma različite načine (slika 1.3).



Slika 1.3:

- a) Uređena molekularna struktura vode u čvrstom stanju.
- b) Polu-uređena molekularna struktura vode u tečnom stanju.
- c) Nasumična molekularna struktura vode u gasovitom stanju.

[<http://clarkie5.wikispaces.com/>]

- U čvrsto stanje (led) prelazi na 0°C , u gasovito stanje (paru) na površini prelazi na oko 50°C , a na 100°C ključa i na taj način svi molekuli imaju potencijal isparenja. Gustina vode je 1kg/l , odnosno 1.000 kg/m^3 , a maksimalnu gustinu dostiže na 4°C .
- Zbog sposobnosti da rastvori veliki broj različitih jedinjenja, voda se smatra **univerzalnim rastvaračem**. Bez obzira na to kuda prolazi, kroz zemlju ili telo, sa sobom nosi važne minerale, hemijske i hranljive sastojke. Na ovu osobinu utiče polarnost molekula vode.
- Voda ima jak **površinski napon**. Drugim rečima, voda ima svojstva prijanjanja i viskoelastičnosti, pa tako teži da se grupiše u kapi, pre nego da se rasprostire po površini u vidu tankog filma. Takođe, površinski napon potpomaže kapilarnu akciju uz pomoć koje se voda kreće kroz sitne krvne sudove u organizmu. Osim površinskog napona na kapilarnu akciju utiču i sile kohezije i adhezije.



Slika 1.4: Površinski napon.

- Voda ima preko 30 svojstava koje su nazvane anomalijama u odnosu na ostale supstance. Ovo ukazuje da je voda izuzetak, jedinstvena supstanca.

1.2 Značaj i uloga vode za ljudski organizam

Oko 10^{34} biliona ćelija, osnovnih jedinica građe i funkcije svih živih bića, u našem organizmu je puno vode. Odlična sposobnost da rastvara veliki broj supstanci omogućava ćelijama da iskoriste važne minerale, hranljive materije i hemijske sastojke iz fizioloških procesa. Osobina vode da „prianja“ (zbog površinskog napona) igra važnu ulogu u transportu rastvorljivih materija kroz organizam. Ugljeni hidrati i proteini koje ljudsko telo koristi kao hranu su obrađeni

putem metabolizma i uz pomoć vode transportovani u naš krvotok. Ništa manje nije bitna sposobnost vode da transportuje otpadne materije iz organizma.

Voda čini najveći deo telesne mase svakog, pa i ljudskog, organizma i sve žive ćelije ispunjene su vodenim rastvorima i potopljene u vodene rastvore. Ishrana ni jednog živog bića nije moguća bez vode, kao ni sam život. Ukoliko normalno unosi vodu, bez hrane čovek može da izdrži od 20 do 50 dana, ali bez vode može da ostane u životu najviše sedam dana. U najvećem procentu voda je zastupljena u organizmu novorođenčadi. Procenat vode u telu kod muškaraca i žena izračunava se preko sledećih formula [Duck, 1990]:

$$M: TBW/W \times 100 = 79.45 - 0.24W - 0.15A$$

$$Ž: TBW/W \times 100 = 69.81 - 0.26W - 0.12A$$

Pri čemu je: TBW – ukupna voda u telu

W – težina

A – starost.

Na količinu vode u organizmu pored starosti utiče i uhranjenost, pa tako gojazne osobe imaju manji procenat vode u organizmu u odnosu na mršave (tabela 1.3). Takođe, u samom telu, procenat vode je različit u različitim tkivima. U tabeli 1.1 prikazan je sadržaj vode u nekim organima.

Tabela 1.1: Procenat vode u nekim organima, tkivima i telesnim tečnostima [Mujović, 1996].

| Organ | % vode |
|------------------|-----------|
| Moždano tkivo | 76 - 80% |
| Krv | 82 - 85% |
| Plućno krilo | 90% |
| Mišićno tkivo | 75 - 78 % |
| Koštano tkivo | 25% |
| Masno tkivo | 10 - 15% |
| Adamantin (zubi) | 2% |

Proučavanja fiziologije, biofizike i biohemije procesa koji su u čovekovom organizmu odvijaju, pokazala su da voda kvantitativno predstavlja njegov

najvažniji sastojak. Pokazano je da voda kao količinski najzastupljeniji element u ljudskom organizmu ima više važnih uloga:

- mehanička uloga: voda tkivima daje gipkost i viskoelastičnost, dok u određenim slučajevima štiti unutrašnje organe od potresa i povreda
- voda je rastvarač svih organskih i većine neorganskih sastojaka u organizmu, bitna je za aktivnost enzima, kao i DNK
- voda je medijum u kome se odigravaju svi biohemijski procesi u organizmu pošto hemijske supstance međusobno reaguju jedino u rastvorenom stanju
- voda ima i ulogu prenosioca na lokalnom nivou - kao medij koji ispunjava intracelularni i ekstracelularni prostor ina globalnom novou - kružeći kroz krvotok i krećući se iz krvi preko tkivne tečnosti i prenosi mnogobrojna organska i neorganska jedinjenja koja su u njoj rastvorena
- voda ima dvostruku ulogu u termoregulaciji:
 - a) prenosi primljenu toplotu (zahvaljujući svojoj visokoj specifičnoj toploti) iz organa u kojima se odigravaju egzotermni procesi razlaganja hranljivih materija (jetra, mišići,..) do periferije tela i time pomaže u izjednačavanju temperature u telu,
 - b) kao posledica prenosa toplote voda isprava iz organizma i odaje spoljašnjoj sredini znatnu količinu toplotne energije, što takođe utiče na održavanje optimalne telesne temperature.
- Štiti od UV zračenja jer ima dobru apsorpciju u opsegu od 280 do 400 nm.

Ukupna količina vode u telu predstavlja važan pokazatelj pri utvrđivanju promena koje se dešavaju u telu usled različitih bolesti i fizioloških stanja. Meri se primenom masene spektroskopije i teške vode D₂O (deuterijuma), tj. određena količina teške vode se unese u organizam, izmeša se sa vodom u telu, da bi se zatim uz pomoć uređaja za masenu spektroskopiju izmerio odnos deuterijuma i vodonika u izdahnutom vazduhu.

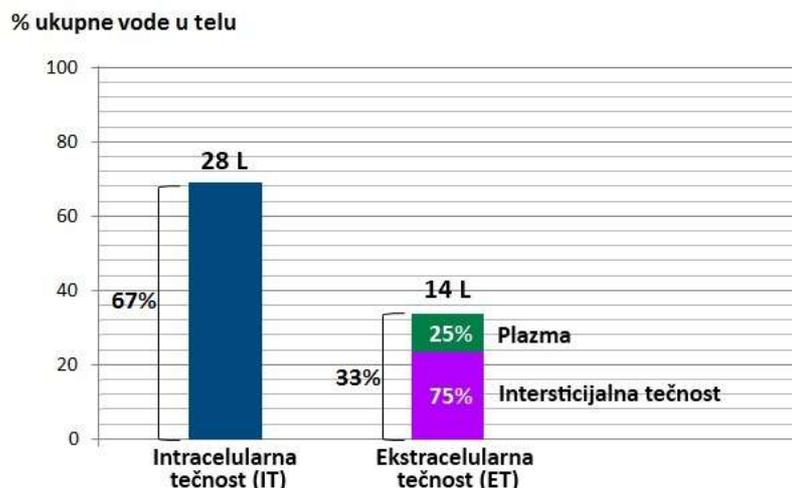
1.3 Metabolizam vode u ljudskom organizmu

Metabolizam vode ima važnu ulogu u ispitivanju kretanja i značaja vode u čovekovom organizmu. Na dnevne potrebe za vodom utiču način ishrane,

spoljašnja temperatura, fizičke aktivnosti itd. Ravnoteža vode u organizmu je striktno i precizno regulisana fiziološkim kontrolnim sistemom smeštenim u hipotalamusu [Weitzman, Kleeman, 1979].

Kretanje vode u telu posmatra se sa dva aspekta: spoljašnje ravnoteže i unutrašnjih ravnoteža protoka, a one su neophodne za pravilno funkcionisanje organizma [Stavros, Costas, 2010]. Spoljašnja ravnoteža odnosi se na poređenje unešene i izbačene količine vode. U bilo kom trenutku ove količine moraju da budu u ravnoteži, da bi organizam bio u ravnoteži. Unutrašnja ravnoteža protoka odnosi se na kretanje vode kroz kapilare tela (uključujući izlučivanje i apsorpciju međućelijskih fluida) i kretanje vode u unutarćelijskom i vanćelijskom prostoru.

Voda se saglasno fizičko-hemijskim uslovima slobodno kreće u ćelijama, kao i u prostorima između ćelija u organizmu. Sve telesne tečnosti i prostori u kojima se voda kreće mogu se podeliti na dva funkcionalna dela: **intracelularni** (unutarćelijski) i **ekstracelularni** (vanćelijski). Intracelularni deo sadrži oko 60-67 % ukupne vode u telu. Njega čine svi fluidi koji se nalaze u ćeliji. Ostala količina od oko 33-38 % je podeljena između intersticijalnih tečnosti (međućelijskih) koje se kreću u prostorima između ćelija i plazme koja se slobodno meša sa intersticijalnom tečnošću koja se kreće kroz kapilare [Silverthorn, 2004].



Slika 1.5: Raspodela telesnih tečnosti u organizmu [nacrtano prema: Silverthorn, 2004].

Ekstracelularna tečnost može se podeliti na: međućelijsku tečnost, plazmu, cerebrospinalnu tečnost, intraokularnu tečnost, limfu, tečnosti probavnog trakta, znoj, urin, plućna tečnost, tečnost u jetri. Zadužena je za snabdevanje ćelije hranljivim i ostalim supstancama potrebnim za pravilno funkcionisanje ćelije.

Raspodela telesnih tečnosti

Tečnosti se u telu transportuju između različitih funkcionalnih odeljaka, ili prostora, i obezbeđuju transportni medijum za obavljanje ćelijskih i tkivnih funkcija. Voda se kreće slobodno između delova telesnih tečnosti i raspoređuje se uz pomoć osmotskih i hidrostatičkih sila.

Ukupna količina tečnosti među svim delovima čini **ukupnu vodu u telu** (tabela 1.2).

Tabela 1.2: Raspodela vode u telu [McCane, Huether, 1998].

| | % telesne | Zapremina (l) |
|------------------------------|------------------|----------------------|
| Intracelularna tečnost (IT) | 40 | 28 |
| Ekstracelularna tečnost (ET) | 20 | 14 |
| Ukupna voda u telu | 60 | 42 |

Ukupna voda u telu se obično izražava kao procenat telesne mase u kilogramima. Standardna vrednost za odraslog muškarca od 70 kg iznosi 60 %, što je ekvivalentno 42 l tečnosti (tabela 1.3).

Tabela 1.3: UTV u odnosu na telesnu masu [McCane, Huether, 1998].

| Telesna konstitucija | UTV % odrasli muškarac | UTV % odrasla žena | UTV % deca |
|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Normalan | 60 | 50 | 70 |
| Mršav | 70 | 60 | 80 |
| Gojazan | 50 | 42 | 60 |

Ostatak telesne mase čine najvećim delom masne naslage i kosti. Iako je količina tečnosti u različitim delovima relativno konstantna, između svih funkcionalnih delova se vrši razmena vode i rastvorenih supstanci, radi održanja te konstantnosti. Procenat ukupne vode varira s obzirom na telesni sastav, tj. s obzirom na masne naslage i starost. Zato što je mast hidrofobna, u masnim

ćelijama ima jako malo vode. Gojazne osobe sa viškom masnih naslaga imaju srazmerno manju količinu ukupne vode i teže većim disbalansima tečnosti u organizmu koji mogu dovesti do dehidracije.

Starenje i raspodela telesnih tečnosti

Raspodela i količina ukupne vode u telu menja se sa starenjem. Kod beba, voda zauzima oko 65% ukupne telesne mase. U trenutku rađanja beba gubi 5% vode budući da se beba prilagođava novoj sredini. Bebe su naročito podložne značajnim promenama UTV, zbog svog, u tom periodu života brzog metabolizma.

Tabela 1.4: Sadržaj vode u procentima u odnosu na telesnu masu prema starosti i polu [Duck, 1990].

| Starost | Muško (%) | Žensko (%) |
|---------|-----------|------------|
| Beba | 70 | 70 |
| 1-9 | 67 | 67 |
| 10-16 | 64 | 60 |
| 17-39 | 66 | 56 |
| 40-59 | 60 | 52 |
| 60+ | 57 | 51 |

Tokom puberteta procenat ukupne vode u telu se uravnotežava sa vrednostima kod odraslih osoba, a polne razlike počinju da se pojavljuju. Muškarci imaju veći procenat zbog veće mišićne mase. Žene imaju više masnog tkiva i manje mišićne mase, s obzirom na funkciju hormona estrogena i prema tome imaju manju količinu vode u organizmu. Starenjem se dalje smanjuje količina vode u organizmu. Ovo smanjenje je rezultat povećanja masnog tkiva i smanjenja mišićne mase, a takođe i smanjenja sposobnosti regulisanja fiziološke ravnoteže biomolekula u organizmu vode. Sa stanovišta kliničke medicine, normalna redukcija ukupne vode u telu kod starijih osoba je veoma bitna, jer uticaji stresnih faktora (groznica, dehidracija iz bilo kog razloga,..) mogu biti opasni, pa čak i po život u ekstremnim situacijama.

Iako svakodnevni unos tečnosti varira, organizam uspeva da kontroliše količinu vode u veoma uskim granicama. Osnovni način snabdevanja organizma vodom je pijenje, apsorpcija vode iz hrane, kao i voda koja nastaje iz oksidacionog metabolizma. Oko 5-10% ukupne telesne vode dnevno procirkuliše putem

fizioloških puteva [Raman et al, 2004]. Respiratorni gubitak vode je pod uticajem udahnutog vazduha i plućne ventilacije. Izjednačen je sa metaboličkom vodom formiranom u procesu oksidacije (oksidacionog metabolizma). Najveća količina vode iz organizma gubi se izlučivanjem bubrega (urin), otprilike 1 do 2 litra dnevno, ali može biti i manji i veći u zavisnosti od dnevnog unosa tečnosti ili fizičkih aktivnosti (tabela 1.5).

Ravnoteža vode u telu (unos = gubitak) dobro se reguliše na dnevnom nivou kao rezultat gladi i žeđi. Nakon većih gubitaka tečnosti i dehidracija udruženih sa fizičkim naporom ili izlaganjem toploti, potrebno je mnogo sati za rehidraciju i potrebno je nadoknađivati elektrolite da bi se povratila ravnoteža tečnosti u organizmu [Shirreffs, Maughan, 1998]. Npr., ako telo dehidrira u iznosu od više od 4% ukupne telesne mase, može biti potrebno više od 24 sata da se telo potpuno rehidrira, nadoknađujući vodu i elektrolite [Adolph, Dill, 1938; Nielsen et al, 1993; Morimoto, 1990].

Američka Nacionalna Akademija Nauka utvrdila je da je adekvatan dnevni unos vode 3,7 L za muškarce i 2,7 L za žene [Food and Nutrition Board, 2005]. Ipak, dnevni unos vode varira kako među osobama pojedinačno, tako i među grupama.

Tabela 1.5: Normalni unos i gubitak vode (muškarac, 70 kg) [McCane, Huether, 1998].

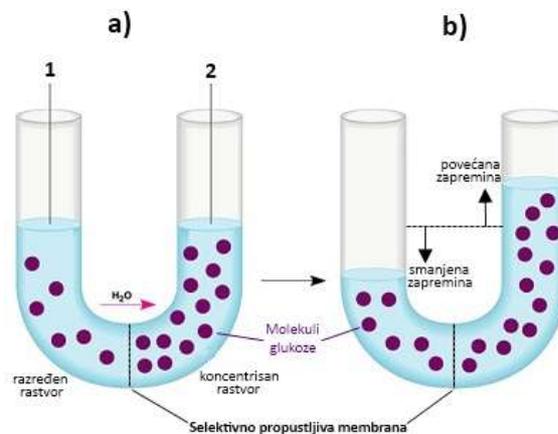
| | Dnevni unos (ml) | | Dnevni gubitak (ml) |
|--------------------|-------------------------|---------|----------------------------|
| Pijenje | 1.400 - 1.800 | Urin | 1.400 - 1.800 |
| Voda iz hrane | 700 - 1.000 | Stolica | 300 - 500 |
| Voda iz oksidacije | 300 - 400 | Koža | 600 - 800 |
| UKUPNO | 2.400 - 3.200 | UKUPNO | 2.400 - 3.200 |

1.4 Ukazivanje na značaj istraživanja boljeg poznavanja dinamike vode za funkcionisanje ljudskog organizma

Kretanje vode između intercelularne i ekstracelularne tečnosti

Jedan od najvećih problema u kliničkoj medicini je održavanje sastava i količine telesnih tečnosti i odgovarajuće ravnoteže između ekstracelularne i intracelularne tečnosti kod težih zdrasvenih poremećaja.

Voda je jedini molekul u organizmu koji se slobodno kreće između ćelija i ekstracelularne tečnosti prolazeći pri tom kroz razne vrste membrana. Takvo kretanje vodi omogućava da utiče na stanje ravnoteže u organizmu. Ravnomerna distribucija vode među funkcionalnim delovima u telu poznata je kao **osmotska ravnoteža**. Kada se voda kreće kroz polupropustljivu membranu nasuprot gradijentu koncentracije govori se o osmozi. Pri osmozi, voda se uvek kreće ka delu gde se nalazi koncentrovanija rastvorena supstanca.

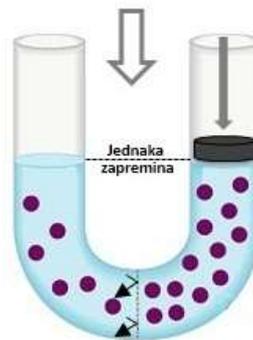


Slika 1.6: Osmotski proces [adaptirano prema: Silverthorn, 2004].

Na slici 1.6 a) prikazana je U providna cev koja je membranom podeljena na dva jednaka dela. Membrana je polupropustljiva (selektivno permeabilna), tj. potpuno je propustljiva za vodu, ali ne i za glukozu. Deo 1 je delimično popunjen sa razređenim rastvorom glukoze, dok je deo 2 popunjen sa istom količinom koncentrisane glukoze. Ovo stvara gradijent koncentracije i za vodu i za glukozu. Ipak, membrana nije propustljiva za glukozu, pa glukozu ne može da difunduje da bi došlo do izjednačenja koncentracija. Sa druge strane, voda može da prelazi slobodno kroz membranu. Uz pomoć osmoze će se kretati iz dela 1 u kome je razređen rastvor glukoze u deo 2 sa koncentrisanim rastvorom. Na taj način, voda se kreće između delova 1 i 2 u cilju razređenja dela sa većom koncentracijom. Osmoza se nastavlja dok koncentracija glukoze u dva dela ne bude izjednačena (slika 1.6 b). Kada se to desi, osmotska ravnoteža je postignuta i kretanje vode prestaje.

Ovakvi procesi postoje i u organizmu. Ako se popije čaša vode, voda je apsorbovana u intersticijalnom epitelu i ulazi u ekstracelularni deo. Rezultat je razređivanje rastvorenih materija u ekstracelularnoj tečnosti. Na taj način ćelije imaju veću koncentraciju rastvorenih materija nego ekstracelularna tečnost. Zbog postojanja gradijenta koncentracije voda uz pomoć osmoze prelazi kroz ćelijske membrane u unutrašnjost ćelije. Zapremina ćelije se povećava, a koncentracija smanjuje dok se delovi ekstracelularne i intracelularne tečnosti ne vrate u ravnotežu [Silverthorn, 2004].

Osmoza se može zaustaviti primenom pritiska na selektivno permeabilnu membranu u smeru suprotnom od smera osmoze. Pritisak potreban da se zaustavi osmoza naziva se **osmotski pritisak** (slika 1.8). Kao i za ostale pritiske u fiziologiji, jedinica za osmotski pritisak je [atm] ili [mmHg].



Slika 1.7: Osmotski pritisak [adaptirano prema: Silverthorn, 2004].

Osmotski pritisak rastvora na telesnoj temperaturi od 37°C može približno da se odredi na osnovu sledeće formule

$$\text{osmotski pritisak [mmHg]} = 19,3 \times \text{osmolarnost [mOsM/kg vode]}.$$

Da bi moglo da se predvidi osmotsko kretanje vode, potrebno je znati koncentracije rastvora koji se posmatraju. Koncentracije fizioloških rastvora se predstavljaju kao osmolarnost, tj. broj čestica (jona ili molekula) po litru rastvora. Izražena je u osmolima po litru [osmol/l, OsM], tj. za veoma razređene fiziološke rastvore je miliosmol [mosmol] = 1/1.000 osmol]. Osmolarnost govori samo o

broju čestica u rastvoru, ali ne i o tome koje su čestice u pitanju. Normalna osmolarnost ljudskog tela je između 280 i 296 mosmol.

Osmolalnost predstavlja koncentraciju izraženu u miliosmolima rastvorenih supstanci po kilogramu vode. Ovaj termin se najčešće koristi u kliničkoj medicini jer je jednostavnije izmeriti sadržaj vode u čovekovom organizmu merenjem telesne mase.

Kretanje vode između odeljaka intracelularne i ekstracelularne tečnosti uslovljeno je primarno osmotskim silama. Voda se slobodno kreće kroz ćelijsku membranu, pa je osmolalanost ukupne vode u telu normalno u ravnoteži.

Važnost hidratacije u ljudskom organizmu

Homeostaza vode u organizmu održava se mehanizmima koji su osetljivi na promene zapremine intravaskularne tečnosti i osmolalnosti plazme [Stavros et al, 2010].

Voda čini 70-85 % svake ćelije u čovekovom organizmu i one žive u tečnoj sredini koja zahteva tačno regulisanu koncentraciju elektrolita i pH vrednost. Ravnoteža je regulisana integracijom bubrežnih, hormonalnih i neuronskih funkcija. Promene u sastavu elektrolita utiču na električni potencijal ekskretornih ćelija i utiču na premeštanje tečnosti iz jednog odeljka u drugi. Promene pH vrednosti izazivaju promene ćelijskih funkcija enzimskih sistema. Variranje fluida utiče na zapreminu krvi i ćelijske funkcije. Poremećaji ovih funkcija su učestali i mogu dovesti do patoloških stanja. Razumevanje načina na koji se dešava variranje količine vode i sposobnosti tela da kompenzuje ili ispravi ove poremećaje važno je za razumevanje mnogih patofizioloških stanja.

Voda i elektroliti važni su za obavljanje čitavog niza fizičkih i fizioloških funkcija:

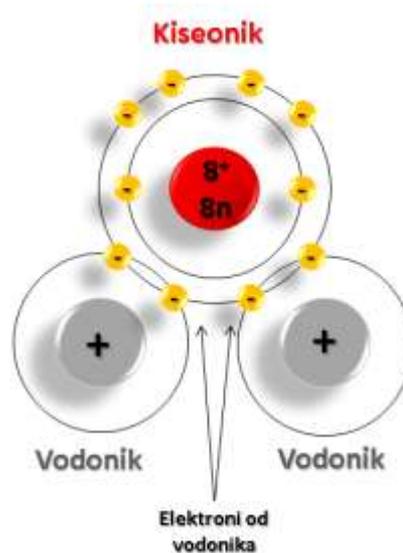
- Održavanje zapremine krvi i osmolarnost koji su neophodni za efikasan transport kiseonika i regulaciju krvnog pritiska.
- Uklanjanje toksine i produkte razgradnje.

- Omogućavaju nervnu kondukciju koja je bitna za funkcionisanje mišića.
- Regulišu telesnu temperaturu mehanizmom znojenja.
- Za obnavljanje energetske depoa tokom oporavka organizma.
- Homeostaza metaboličkih i enzimskih funkcija.
- Brojna apsorpciona i lubrikativna svojstva.

2. PREDMET ISTRAŽIVANJA

2.1 Voda

Molekul vode, kao što je rečeno u Poglavlju 1, hemijski iskazan formulom H_2O sastoji se od dva atoma vodonika i jedan atom kiseonika. Kada stoji samostalno, atom vodonika sadrži jedan pozitivan proton u svom središtu sa jednim negativnim elektronom koji se oko njega kreće u tro-dimenzionoj ljusci. Kiseonik sa druge strane sadrži osam protona i osam neutrona u svom jezgru sa osam elektrona koji se oko njih kreću.



Slika 2.1: Gustina naelektrisanja molekula vode.

Jedan elektron vodonika i osam elektrona kiseonika predstavljaju glavnu komponentu hemije života jer dolazi do sparivanja kiseonika i vodonika i nastaje molekul vode, ili dolazi do rastavljanja i formiranja jona.

| n | l | m | m_s | | Broj elektrona | Konfiguracija | Oznake ljuske |
|-----|-----|------|-------|------|----------------|-----------------|---------------|
| 1 | 0 | 0 | +1/2 | -1/2 | 2 | $1s^2$ | K |
| 2 | 0 | 0 | +1/2 | -1/2 | 8 | $2s^2p^2$ | L |
| | 1 | +1 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | | -1 | +1/2 | -1/2 | | | |
| 3 | 0 | 0 | +1/2 | -1/2 | 18 | $3s^2p^4d^{10}$ | M |
| | 1 | +1 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | | -1 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | 2 | +2 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | | -2 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | 4 | 0 | -1 | +1/2 | | | |
| 1 | | +1 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | | -1 | +1/2 | -1/2 | | | |
| 2 | | +2 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | | +1 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | | 0 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | | -2 | +1/2 | -1/2 | | | |
| 3 | | +3 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | | +2 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | | +1 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | | 0 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | | -1 | +1/2 | -1/2 | | | |
| | -2 | +1/2 | -1/2 | | | | |
| | -3 | +1/2 | -1/2 | | | | |

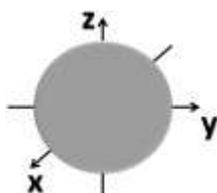
n - glavni kvantni broj
 l - orbitalni kvantni broj
 m - magnetni kvantni broj
 m_s - magnetni kvantni broj elektronskog spina

Slika 2.2: Kvantno mehaničke formule vodonika i kiseonika po ljuskama.

Vodonik:

Elektonska konfiguracija: $1s^1$

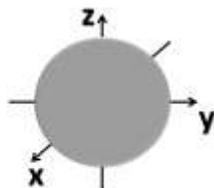
Oksidaciono stanja: -1, +1

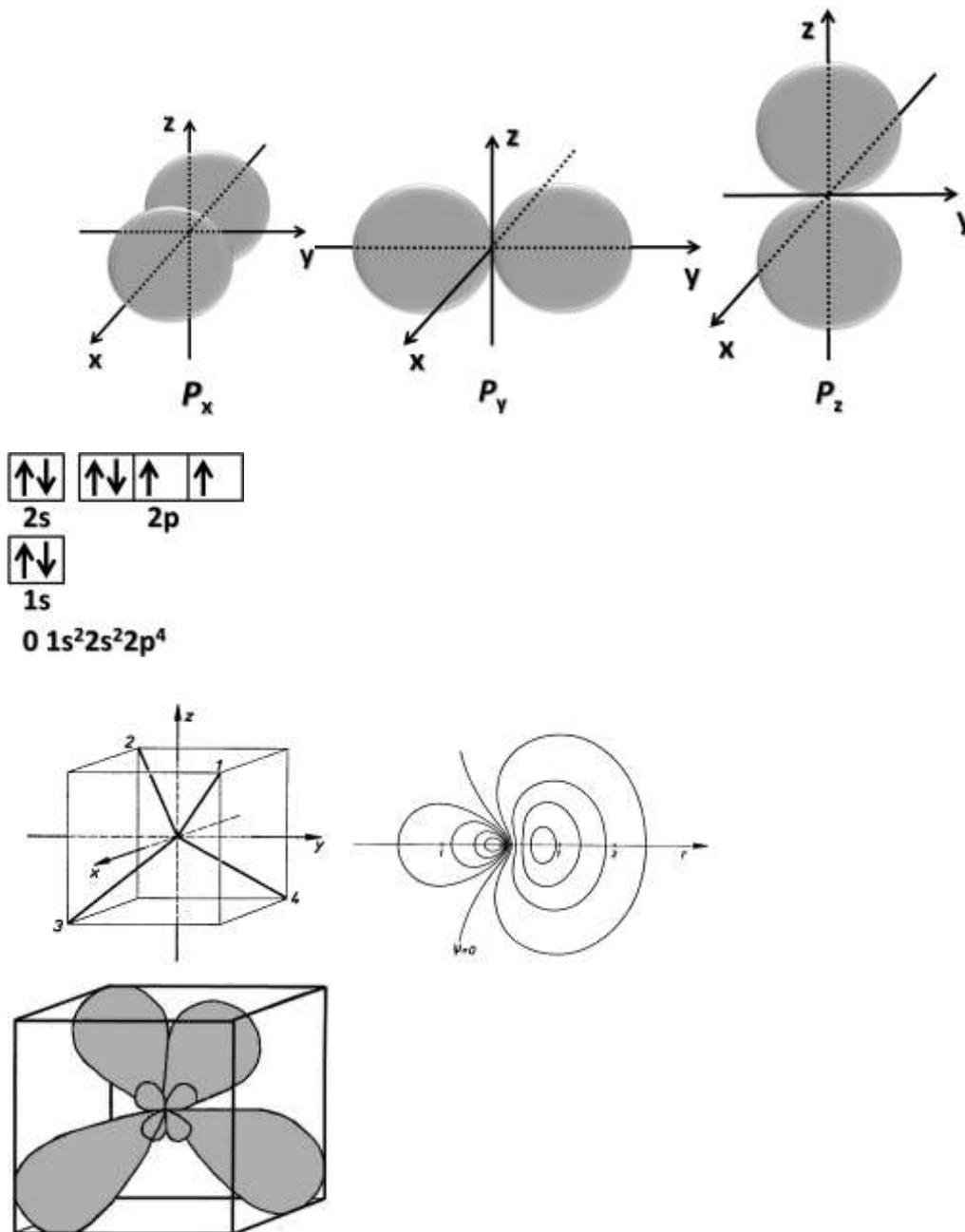


Kiseonik:

Elektonska konfiguracija: $1s^22s^22p^4$

Oksidaciono stanja: 1, +1





Slika 2.3: Hibridizovane orbitale kiseonika [adaptirano prema: Kettle, 1995].

Vodonik teži jonizaciji gubljenjem pojedinačnog elektrona i formira pojedinačne jone vodonika koji predstavljaju izolovane protone budući da atomi vodonika ne sadrže neutrone. Vodonične veze nastaju kada se elektron pojedinačnog atoma vodonika deli sa drugim elektronegativnim atomom, kao što je kiseonik kome nedostaje elektron.

U molekulu vode, dva atoma vodonika su kovalentno vezana za atom kiseonika. Ali, zato što je atom kiseonika veći od atoma vodonika, njegova

privlačnost sa elektronima vodonika je odgovarajuće veća, pa su elektroni privučeni u ljusku većeg atoma kiseonika, a dalje od ljuske vodonika. Ovo znači da, iako je molekul vode, kao ceo molekul, stabilan, kiseonik zbog veće mase jezgra teži da privuče sve elektrone u molekul, uključujući i deljene elektrone vodonika, dajući strani molekula gde je kiseonik blago negativno naelektrisanje. Blago negativno naelektrisanje nastaje zbog Londonovih sila, tj. dužeg boravka sparenog elektrona u orbiti kiseonika nego vodonika.

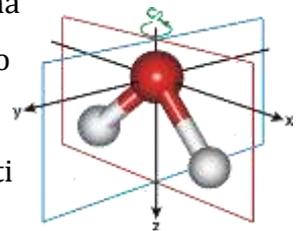
Ljuske vodonikovih atoma, budući da su njihovi elektroni bliži kiseoniku, imaju blago pozitivno naelektrisanje. Ovo znači da molekuli vode imaju tendenciju da formiraju slabe vodonične veze sa drugim molekulima vode, jer je deo molekula gde se nalazi kiseonik negativan, a delovi gde su vodonici pozitivni. Atom vodonika, dok je kovalentno vezan za kiseonik u molekulu može da formira slabu vodoničnu vezu sa kiseonikom u drugom molekulu. Zbog osobine polarnosti, voda je kontinualni hemijski entitet. Ove slabe veze igraju važnu ulogu u stabilizaciji oblika mnogih velikih molekula u živom svetu. Zato što su slabe, ove veze se lako raskidaju i ponovo formiraju tokom normalnih fizioloških reakcija. Brzina stvaranja i razgradnje vodoničnih veza pojedinačnog molekula vode je oko 50 fs, a veći vodeni klasteri održavaju vodonične veze stabilnim i do 1 s. Rastavljanje i ponovno sklapanje ovih veza je ključna reakcija u hemiji života.

Molekul vode

Voda je jedna od pet (DNK, proteini, lipidi, joni i voda) najzastupljenijih supstanci u živom svetu. Ljudska fiziologija i funkcionisanje organizma zavise od količine, kvaliteta i stanja vode u organizmu. Količina vode u organizmu (videti Uvod, str. 21) zavisi od starosti i stanja organizma i kreće se u rasponu od 65 do 85% ukupne telesne mase. Od ovog procenta 62% je zarobljena voda u drugim biomolekulima, dok je 38% „slobodna“ voda. Jonski sastav vode je bitniji od količine jona u vodi. Razlog za ovo leži u činjenici da konzumacijom hrane ljudi unose oko 90-95% potrebnih jona. Kvalitet i stanje vode većinom zavisi od sastava jona, organizacije mreže molekula i dinamike sredine. Stanje vode treba na najbolji način da zadovoljava biomolekularnu potrebu za vodom organizma sa strukturnog

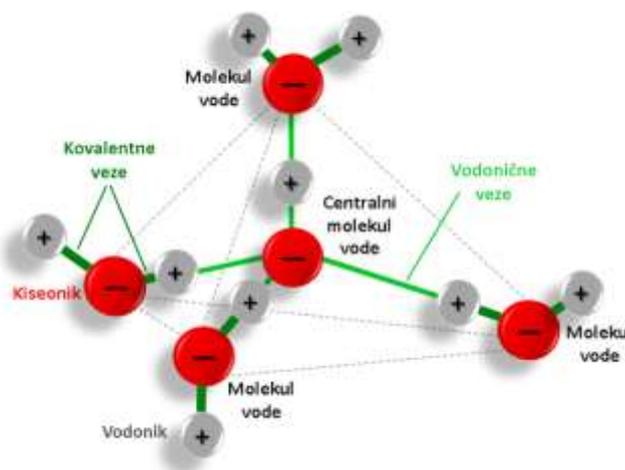
i energetskog stanovišta. Ovo znači da na kreiranje osobina vode utiču biomolekuli (DNK, RNK, proteini, membrane,..), ćelije, tkiva i da se voda formira kako bi svaka od ovih grupa funkcionisala na najbolji način. Voda interaguje sa biomolekulima putem vodoničnih veza. Najprisutnije i možda najjednostavnije vodonične veze su one koje se stvaraju između molekula vode.

Molekul vode ima srednji prečnik od 0,275 nm (2,75 Å). U tečnom stanju, bez obzira na to što je 80% elektrona povezano vezama, tri atoma ostaju nepovezana jer se atomi vodonika konstantno razmenjuju između molekula vode usled procesa protonacije i deprotonacije. Molekul vode ima simetrijsku grupu C_{2v} , što znači da je definisan sa dve međusobno normalne ravni simetrije, jednom osom drugog reda i elementom identičnosti. Pored toga vodonikovi atomi mogu imati paralelni (orto-voda) ili antiparalelni (para-voda) nuklearni spin.

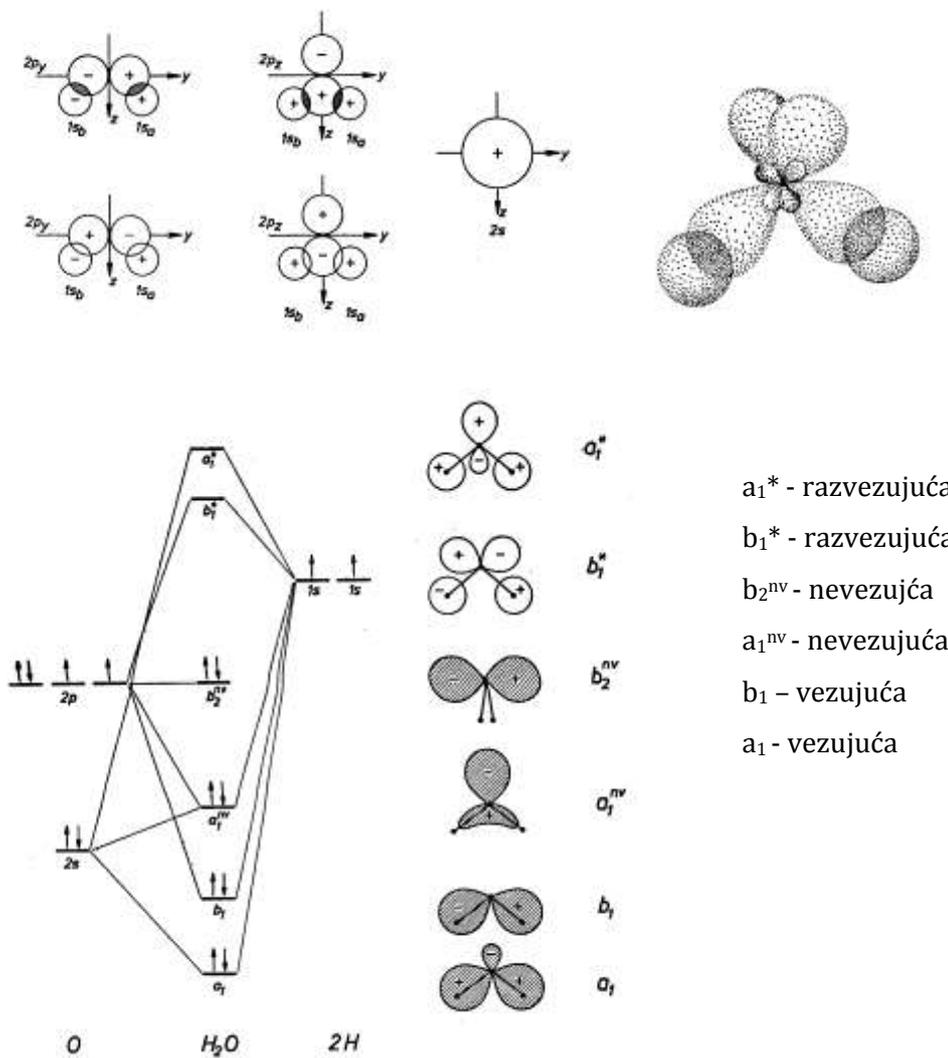


Molekul vode ima četiri skoro tetraedarski uređene sp^3 hibridizovane orbitale (elektronske parove), od kojih su dve vezane sa vodonikovim atomima, ostavljajući druge dve slobodne - slobodni parovi.

U savršenom tetraedarskom uređenju veza-veza, veza-slobodan par, slobodan par – slobodan par uglovi bi trebalo da budu 109.47° i takvo tetraedarsko vezivanje nalazi se u kondenzovanim fazama kao što je heksagonalni led.



Slika 2.4: Tetraedarska struktura pet molekula vode.



Slika 2.5: Vezujuće i razvezujuće orbitale na bazi hibridizacije energetske ljuske atoma O i H [adaptirano prema: Kettle, 1995].

Ab initio proračuni na izolovanim molekulima, ne potvrđuju prisustvo značajne neposredne elektronske gustine tamo gde se očekuju slobodni parovi [www.lsbu.ac.uk/water/molecule.html].

Za izolovani molekul vode, proračunata dužina O-H veze je 0.09584 nm, i ugao H-O-H je 104.45°. Eksperimentani rezultati za gasovito stanje vode su O-H dužina 0.095718 nm, a ugao H-O-H je 104,474°. Ove vrednosti nisu primećene u vodi gde *ab initio* (O-H dužina je 0.09991 nm, 105.5°), neutronska difrakcija daje sledeće rezultate (O-H veza 0.0970 nm, H-O-H ugao 106° pokazuje povećanje vrednosti uzrokovano vodoničnim slabljenjem kovalentne veze. Ove dužine veza i

uglovi se menjaju zahvaljujući promenama polarizovanosti u različitim okruženjima vodoničnim vezama i kada je molekul u rastvoru ili jonizovan. Obično se uzimaju vrednosti za dužinu veze od 0.095 nm i 0.1 nm i ugao H-O-H od 104.52° do 109.5° [www.lsbu.ac.uk/water/molecule.html].

Vodonične veze nastaju kada je atom vodonika privučen jakim silama ka dva atoma, umesto samo ka jednom i predstavlja u stvari vezu između tih atoma. Između dva molekula vode može da se formira vodonična veza i tada nastaje vodeni dimer, koji predstavlja najjednostavniji slučaj vodonične veze i najmanji vodeni klaster. Kada je prisutno više molekula, u slučaju tečne vode, moguće je da se napravi više veza, jer kiseonik iz jednog molekula vode ima dva slobodna para elektrona, od kojih svaki može da formira vodoničnu vezu sa vodonikom iz drugog molekula vode. Ovo može da se ponavlja na takav način da je svaki molekul vode povezan vodoničnom vezom sa četiri druga molekula (dva preko njegovih slobodnih parova, a dva preko atoma vodonika). Takođe, tečna voda je poseban slučaj, jer ima isti broj vodoničnih veza kao i kovalentnih. Dok je kovalentna vodonična veza u molekulu vode, srednja vrednost nekovalentne vodonične veze između molekulima 0.0957 nm vode je 0.154 nm (osciluje između 0.141 nm i 0.173 nm).

Kod vodoničnih veza u vodi, atom vodonika je kovalentno povezan sa kiseonikom, ali takođe je i dodatno vezan za atom kiseonika drugog molekula vode, a ta veza je jača od bilo koje Van der Waals-ove sile koja je aktivna. Vodonične veze utiču na to da su molekuli vode čak i do 15% bliži jedan drugom nego kada u vodi vladaju samo Van der Waals-ove sile [www.lsbu.ac.uk/water/molecule.html].

Vodonične veze su delom (oko 90%) elektrostatičke, a delom (oko 10%) kovalentne i mogu biti aproksimirane sa vezama koje su napravljene od kovalentnih HO-H...OH₂, jonskih HO^{δ-}-H^{δ+}... O^{δ-}-H₂ i dugim vezanim kovalentnim HO⁻...-O⁺H₂ delovima sa HO-H...OH₂ dosta očiglednijim nego HO⁻...-O⁺H₂, gde se očekuje da bude mnogo manje ne-povezanih odbijanja. Povezivanje vodoničnim vezama utiče na sve molekulske orbitale [Winter et al, 2007].

Važna osobina vodoničnih veza je da poseduju smer i po konvenciji, ovaj smer je smer kraće kovalentne veze O-H (\rightarrow) O-H atom vodonika koji je doniran

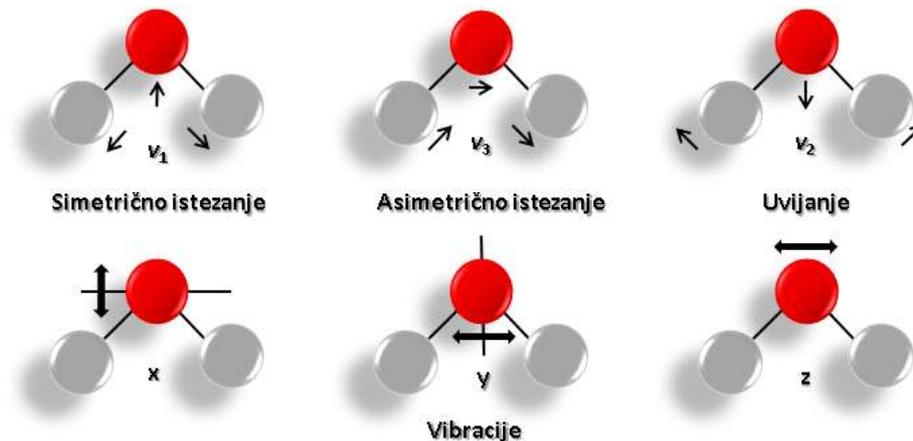
Kada se vodonična veza formira između dva molekula vode, preraspodela elektrona koja se dešava menja dalju sposobnost vodoničnog vezivanja. Molekul vode koji donira atom vodonika ima povećanu gustinu elektrona u svom delu „slobodnih parova“, što pospešuje prihvatanje vodonične veze, a molekul vode ima redukovanu gustinu elektrona na svom atomu vodonika i ostaje deo sa „slobodnim parom“. Na ovaj način je podstaknuto dalje davanje, ali umanjeno dalje prihvatanje vodoničnih veza. Ovakva redistribucija rezultira i združivanjem (tj. prihvatanje jedne vodonične veze podstiče davanje druge) i ne-združivanjem (tj. prihvatanje jedne vodonične veze ometa prihvatanje druge) u mrežama u kojima se formiraju vodonične veze. Združivanjem vodoničnih veza povećava se dužina O-H veza i pri tome dolazi do promene i 21 molekul vode poprima izduženje veze $H\cdots O$ i $O\cdots O$. Povećanje dužine veze je u korelaciji sa jačinom vodonične veze i dovodi do vibracionih istezanja O-H veza. Prema tome, $O\cdots O$ razdaljine u klasterima su kraće nego one na periferiji. Ako je vodonična veza znatno nagnuta, sledi da je jačina veze slabija. Jačina vodonične veze linearno zavisi od njene dužine (kraća veza daje jače vezivanje) i takođe skoro linearno zavisi od temperature i pritiska.

Mnogi biomolekuli imaju dosta vodoničnih veza, npr. svaki nukleotid unutar DNK ima 2 ($A=T$) i 3 ($C\equiv G$) vodonične veze, dok spoljni deo DNK ostvaruje još jednu vezu preko fosforne grupe, a na jednom hromozomu ima tri milijarde nukleotida, odnosno oko deset milijardi vodoničnih veza. Budući da mreža vodoničnih veza u ćeliji osciluje, može imati uticaja na rezonanciju vodoničnih veza DNK. Ovo znači da energetska stanja vode može imati pozitivan ili negativan uticaj na biomolekule. Sa strukturnog stanovišta molekuli vode treba da budu povezani na različitim razdaljinama sa biomolekulima. Te razdaljine treba da budu ili male (po jedan molekul) ili srednje i velike (nekoliko do mnogo molekula). Ukoliko velike razdaljine prevaziđu linearnu organizaciju vode, dolazi do nestabilnosti. Bolje je ukoliko je voda organizovana u vidu malih ili srednjih klastera, lanaca molekula vode. Klasteri zadovoljavaju potrebu da voda bude mnogo bolje organizovana. Organizacija u klasterima dešava se na različite načine, što zavisi od

fizičko-hemijskog stanja ćelije, tkiva i tela. Ipak, celokupno stanje vode u organizmu bi trebalo da bude u stanju dinamičke ravnoteže pojedinačnog molekula vode, dimera i trimera sa jedne strane (oko 60%) i malih, srednjih i velikih klastera sa druge (oko 40%). Ukoliko su osobine, veličina i broj klastera u organizmu narušeni, fiziološka funkcionalnost može biti narušena.

Model vodenih klastera

Oscilatorna talasna funkcija (ψ_{H_2O}) molekula vode određena je simetrijom položaja atoma kiseonika i vodonika u prostoru. Molekul vode ima tri normalne vibracije ($3N-6$ stepeni slobode) koje predstavljaju vektore koji polaze iz jezgra atoma kiseonika i ukazuju na pravac i relativne amplitude kretanja.



Slika 2.6: Moguća dinamika kretanja atoma vode
[nacrtano prema: www.lsbu.ac.uk/water/molecule.html].

Ipak, međumolekularne oscilatorne talasne funkcije vodoničnih veza ($\psi_{O..H}$) su primarno određene dipolom momenta asimetrije naelektrisanja molekula koji su uključeni u interakciju. Standardna dogma danas je da su vodonične veze (između molekula vode) rezultat električnih privlačenja između pozitivno naelektrisanog atoma vodonika i negativno naelektrisanog atoma kiseonika u susednim molekulima. Ove elektrostatičke interakcije mogu dobro da budu opisane klasičnim fizičkim Kolumbovim zakonom, kojim je moguće objasniti privlačenje ili odbijanje među naelektrisanim česticama koje su međusobno udaljene. 1999. godine je eksperimentalno pokazano da slabe vodonične veze u vodi delimično dobijaju svoj identitet od jačih kovalentnih veza u molekulu vode

[Isaacs et al, 1999]. Ovo znači da vodonične veze imaju dvostruki identitet: klasičan (elektrostatičke interakcije bazirane na Coloumb-ovom zakonu - μ) i kvantni (talasna funkcija bazirana na Schroedinger-ovoj jednačini - ψ). Na osnovu podataka dobijenih putem eksperimenata neutronske difrakcije postalo je jasno da je razdaljina između centara atoma vodonika i kiseonika u kovalentnoj vezi d(O-H) različitih struktura između 95 i 120 pm, dok je razdaljina između centara atoma vodonika i kiseonika u nekovalentnoj vezi d(O...H) između 120 i 200 pm. Sistemsko istraživanje i kvantitativna analiza dužina veza O-H...O pokazala je da parametri valentnosti vodoničnih veza prate pravilo zlatnog preseka, čija je vrednost oko 1,62 [Yu et al, 2006; Heyrovska, 2006; Heyrovska, 2007]. Imajući na umu da su vodonične veze najzastupljenije u vodi, koja može biti organizovana u mreže molekula, postaje jasno da voda preko vodoničnih veza (sa klasičnim i kvantnim osobinama) može imati značajnu ulogu u molekularnom i biomolekularom prepoznavanju. Sa ovog stanovišta, dva osnovna cilja današnje farmacije su:

1. razumevanje mehanizama molekularnog prepoznavanja u vodenom rastvoru
2. optimalna struktura vode za pravljenje svakog pojedinačnog leka.

Danas farmakolozi postaju svesni važnosti strukture vode u pravljenju lekova, jer modelovanje ligand-receptor interakcija mora da uključuje specifičnu geometriju, koja je u vezi sa strukturom vode [Plumridge, Waigh, 2002].

Ćelija je osnovna jedinica građe i funkcije svih živih bića. Svaka ćelija ima dva nivoa podele, prvi u koji spadaju nukleus, citoplazma i membrane i drugi koji čine organele i citoskeleton, a svaka ćelija isprepletana je delovima sa molekulima vode uređenim u lance ili klastere koji se formiraju zahvaljujući proteinima, primarnim makromolekularnim komponentama ćelije. Celokupna unutrašnja organizacija u ćeliji tj. intracelularna tečnost (fluid) i sastavljena je od oko 10^{14} malih, razdvojenih delova, a svi zajedno čine jednu celinu povezanu vodoničnim vezama. Značajne promene slobodne energije molekula vode i proteina utiču na to da delovi ispunjeni vodom u ćeliji igraju dominantnu ulogu u osmotskoj regulaciji. Delovi ispunjeni vodom u ćeliji međusobno se razlikuju u molekularnom kretanju, entalpiji, entropiji, tački mržnjenja i drugim osobinama, a

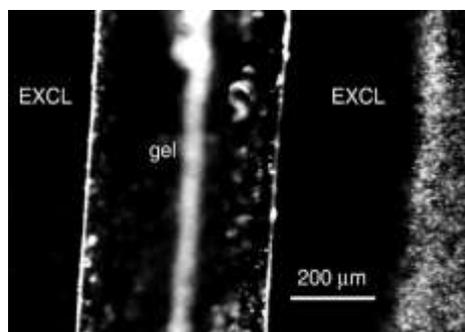
zbog elektrostatičkih interakcija polarnih molekula vode sa električnim poljima koja nastaju delovanjem kovalentno povezanih parova suprotnog naelektrisanja izazvanih elektronegativnim atomima kiseonika i pozitivno naelektrisanog azota u proteinima. Što se tiče ljudskog organizma, voda je neophodna kao sastavni deo ćelija, ali takođe je bitna kao transportni i signalizacioni medijum. Glavni transport obavlja se putem krvi koja prenosi dosta rastvorenih hemijskih elemenata kroz telo, npr. glukozu. Ravnoteža između količine vode u ćelijama i u krvi mora da se održava, a bubrezi pomažu u njenom regulisanju. Takođe, voda apsorbuje veliku količinu toplote pre nego što temperatura poraste, pa krv transportuje toplotu u telu do površine kože, gde se oslobađa u okolinu. Ukoliko telo mora da se rashlađuje, taj proces je regulisan znojenjem, jer kada voda u obliku znoja isparava dolazi do hlađenja kože.

Kroz istoriju nauke važila je pretpostavka da cela količina vode (osim malog dela od oko 5%) u ćeliji ispoljava karakteristike kao i slobodna voda u organizmu, a da citoplazma može da se tretira kako običan, neidealni vodeni rastvor [Clegg, 1982]. Tokom godina, naučnici su se suprotstavljali ovoj ideji, a naročito Long, Walter Drost-Hansen (University of Miami, Department of Chemistry) i Aphanasij Troschin (Institute of Cytology, Leningrad), koji su ukazali na to da je voda u ćeliji u stvari sasvim drugačija. Ova tri naučnika svoj rad su započela 50.-tih godina prošlog veka, a ispitivanja su nastavljen i do danas [Pollack et al, 2006]. Važni zaključci donešeni su kasnih 60.-tih godina kada su Freeman Cope (1969) i Carlton Hazelman sa kolegama publikovali radove na osnovu eksperimenata u kojima je korišćena pulsna NMR. Zaključili su da struktura skoro celokupne vode u skeletnim mišićima i mozgu nije ista kao i slobodna voda u ostatku tela [Pollack, Clegg, 2008].

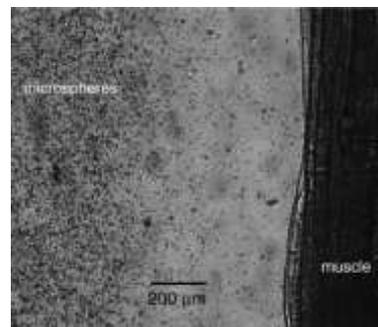
Biološki sistemi sastoje se zapreminski najviše od vode, oko 70-90%, prazan prostor čini 28-32% i ostatak čine proteini, lipidi, RNK, DNK i dr. Najviše vode se nalazi u sastavu intracelularnih fluida [Vander et al, 2001; Pollack, 2001; Pollack, 2006] i ova voda poznata je kao voda na graničnim površinama (*interfacial water*). Unutarćelijske proteinske strukture i njihovo funkcionisanje je poznato, dok je važna komplementarna uloga unutarćelijske vode i njenih interakcija sa proteinima manje poznata [Pollack, 2001; Ling, 1992; Israelachvili, Wennerstrom,

1996]. Ove interakcije su, takođe, komplikovane jer je voda dipol, a protein je naelektrisan i pozitivnim i negativnim naelektrisanjem i hidrofilan je [Ling, 1992; Israelachvili, Wennerstrom, 1996]. Takođe, zbog svog NH^+ početka i COO^- kraja, svaki protein je dipol.

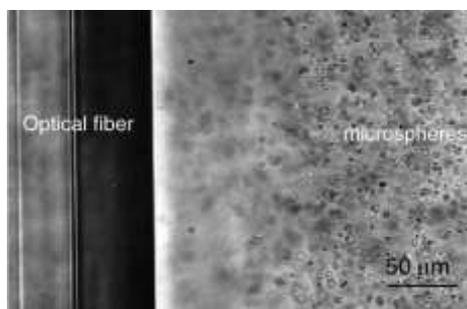
Mnoge biološke površine pokazuju svojstvo površinskog naelektrisanja i hidrofilnosti [Ling, 1992; Israelachvili, Wennerstrom, 1996]. Smatra se da su ove osobine zaslužne za značajnu redukciju difuzije, propustljivosti i transporta rastvorenih materija u području graničnih slojeva koji se nalaze uz biološke strukture [Hidalgo et al, 1991; Pohl et al, 1998; Sha'afi et al, 1967]. Ovi „nemešani“ slojevi čiste vode (*unstirred layers*) prisutni su kod mnogih fizioloških stanja i u različitim sredinama, uključujući mišiće, creva [Cotton, Reuss, 1989], korene biljaka [Freundl et al, 1998] i crvene krvne ćelije kod ljudi [Sha'afi et al, 1967]. Takođe, igraju ključnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima, a naročito onim koji uključuju transport rastvorenih materija, enzime i druge hemijske reakcije na, ili u blizini površine ćelije [Pollack, Clegg, 2008].



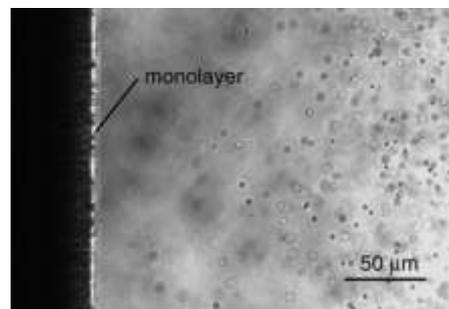
a)



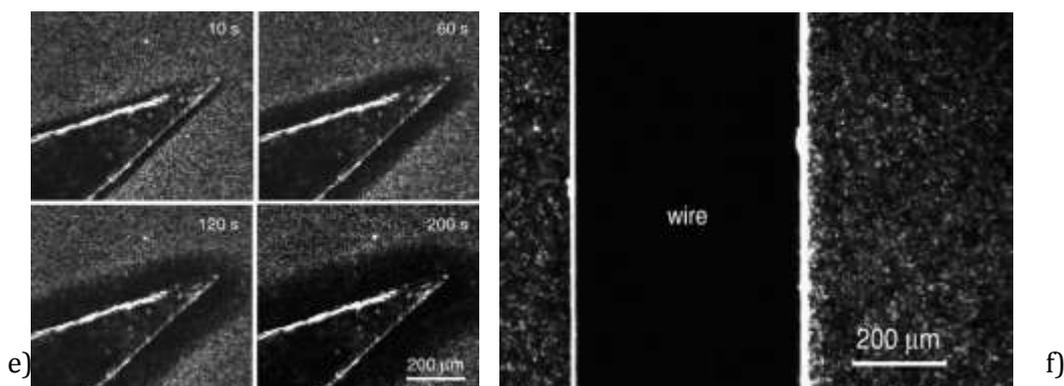
b)



c)



d)



Slika 2.7: Primeri isključenja čestica rastvora od različitih površina [Zheng et al, 2006].

Na slici 2.7a) prikazano je odvajanje rastvora (EXCL) u blizini poliakrilnog gela. Gel je postavljen na pločicu, sipan je rastvor 1 μm mikrosfera i posmatran je pod invertorskim mikroskopom (*Zeiss Axiovert 135*) pod uvećanjem 20x. Slika je napravljena 20 min nakon sipanja rastvora. Mikrosfere (koje se vide na desnoj ivici) izložene su aktivnom termičkom kretanju. Slika 2.7b) predstavlja odvajanje mikrosfera pored biloškog tkiva. Kod 8 uzoraka ispitivanih pod sličnim uslovima, veličina ekskluzivne zone (EZ) merena na slikama je bila oko $360 \pm 0,50 \mu\text{m}$. Optičko vlakno FS-SC-7324, Thorlabs, Newton, NJ (levo) ubačeno je u rastvor mikrosfera i prikazano na slici 2.7c). Mikrosfere se kreću unaperd desno, objektiv je 20x, mikrosfere su prečnika 2 μm . Na slici 2.7d) prikazani su hidrofilni monolejeri koji sadrže COOH grupe. Nafion-117 list, šiljasto oblikovan, debljine 170 μm , postavljen između dve pločice, mnogo veće nego što je sam list je na slici 2.7e). Rastvor karboksilnih mikrosfera prečnika 2 μm je sipan. Tamne zone su bez mikrosfera. Brojevi u desnim gornjim uglovima su vremena nakon sipanja rastvora u sekundama. Prikazano je samo prvih nekoliko minuta. Slika 2.7f) je prikaz žice od nerđajućeg čelika postavljene između dve pločice gde je sipan rastvor mikrosfera i stvorena ekskluzivna zona.

U studijama koje su sprovedene 1970., male mikrosfere prečnika 250 μm rastvorene su u vodi i rastvor je sipan u komoru u kojoj se nalazila rožnjača zeca i kontaktno sočivo. U roku od nekoliko minuta, pojavila se jasna zona vode bez čestica blizu površine i mikrosfere su se odvojile, tj. isključene su iz područja, do razdaljine od 150-350 μm . Posmatrani kao jedinstveni mehanički kontinuum [Pohl

et al, 1998], „nemešani“ slojevi čiste vode predstavljaju relativno postojeane slojeve vode koji se nalaze uz membrane i granice različitih površina u biološkim sistemima, a na njihov značaj ukazuje njihova široka rasprostranjenost u organizmu [Zhao et al, 2008].

Ova oblast vode u neposrednoj blizini hidrofilnih površina koja ne sadrži nikakve čestice u sebi u različitim naukama ima različite nazive: biologija – „nemešani“ slojevi čiste vode, nauka o materijalima – vicinalna (susedna) voda, voda na graničnim područjima, ograničena voda (*vicinal water, interfacial water, confined water*), fizika - vodena struktura (*water structure*), nauka o proteinima – voda na graničnim područjima, granična voda (*interfacial water, bound water*), uopšteno – organizovana voda (*organized water*).

Teorijski pogledi na vode na graničnim površinama

Vode koje se nalaze na graničnim područjima teško je opisati klasičnim, teorijskim metodama. Pri malim zapreminama, ove vode se ne razmatraju kao kontinualni fluidi zasnovani na Navije-Stoksovima jednačinama, ili ne mogu da se razumeju prema klasičnim, fluidno-mehaničkim modelima. Umesto toga, posmatraju se sa stanovišta da predstavljaju diskretnu mrežu molekula, razdvojenih vakuumom i povezanih elektrostatičkim silama. Modelovanje ove mreže počeo je Helmholtz 1853. godine [Helmholtz, 1853] koji je opisao vodu na graničnim područjima kao jedinstven sloj naelektrisanja adsorbovan na površini, koji formira jednostavan kondenzator. Ovaj model je prošao kroz nekoliko značajnih etapa, uključujući i modifikaciju koju su napravili Gouy i Chapman 1913. godine, Derjaguin i Landau, i Verwey i Overbeek 1948. godine. Nazvana prema inicijalima pomenutih naučnika DLVO teorija uglavnom se koristi kada se posmatra modelovanje vode na graničnim područjima i njene dimenzije. U trenutno zastupljenim teorijama procenjuje se da je debljina sloja vode u graničnom sloju na hidrofilnim površinama maksimalno 1 nm (oko 5-13 molekularnih slojeva vode) [Ruan et al, 2004]. Iako se debljina sloja vode u ganičim površinama razlikuje u teoriji i posmatranjima, činjenica je da je ova voda organizovana, ili struktuirana i da naelektrisanje površine ima značajnu ulogu u

struktuiranju vode. Ovo je veoma važno jer su praktično sve vode na graničnim područjima u biološkom svetu u kontaktu sa veoma naelektrisanim, hidrofilnim proteinskim površinama. Da bi se povezalo teoretsko modelovanje i biološka posmatranja, potrebno je vršiti direktna fizička merenja.

Mehanička merenja vode na graničnim površinama

Detaljna merenja vode na graničnim površinama su izvršili Jacob Israelachvili [Horn, Israelachvili, 1981; Israelachvili, 1987; Israelachvili, McGuiggan, 1988], Steve Granick [Alsten, Granick, 1988; Granick, 1991; Zhu, Granick, 2001], and Yingxi Zhu [Zhu, Granick, 2001; Goertz et al, 2007]. Razvoj aparata koji stvara površinsku silu i mikroskopije međupovršinskih sila (*interfacial force microscope*) u periodu od 1970. do 1980. od strane Israelachvili-ja i drugih bili su glavni korak u razvoju instrumentacije za ovu vrstu eksperimenata [Israelachvili, 1987; Houston, Michalske, 1992]. 1988. godine pri rezolucijama od 0,1-1 s/nm i 10 nN, aparat koji stvara površinsku silu (*surface force apparatus*) komprimovao je tanke slojeve vode (1-2 molekularna sloja) između dve površine liskuna i merena je čvrstoća slojeva vode između ove dve površine pri 40.000 nN/nm [Israelachvili, 1987]. Deset godina kasnije, slične eksperimente su sproveli Granick and Zhu 2001. godine i merili viskoznost pri 10 MPa/s, 10 biliona puta veća negu viskoznost pri standarnim uslovima za temperature i pritisak (STP). U skorašnjim ispitivanjima iz 2007. Zhu je potvrdio prethodne rezultate, ali je pronašao takođe da se viskoznost smanjuje sa smanjenjem hidrofilitnosti površina. Visoke vrednosti viskoznosti vode na graničnim područjima na hidrofilnim površinama su u vezi sa zaključcima koji su izvedeni na osnovu eksperimenata redukovane difuzije i transporta u „nemešanim“ slojevima čiste vode.

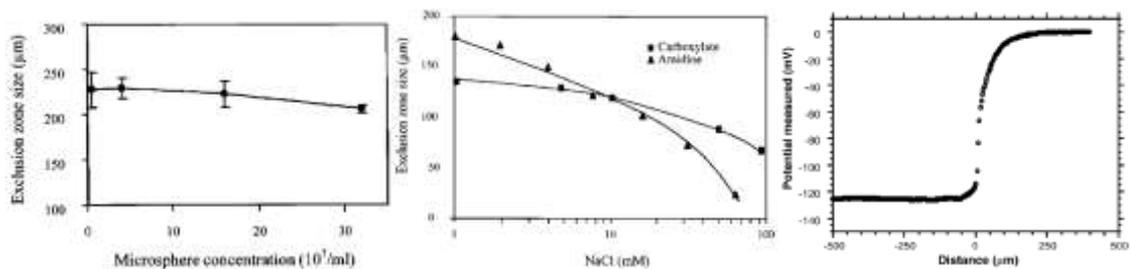
2.3 Osobine vode u prisustvu hidrofobnog-hidrofilnog materijala nafiona i mikrosfera

Voda na graničnim područjima i ekskluzivna zona

Uzimajući u obzir molekularno zbijen prostor u ćeliji, voda na graničnim područjima prisutna je u širokoj, tečnoj sredini, dodirujući se sa vrlo

naelektrisanim, hidrofilnim površinama. Mnoge od ovih intracelularnih površina su biopolimeri, koji predstavljaju voda-protein komplekse koji liče na gel [Pollack, 2006; Pollack, Chin, 2008; Pollack, 2003]. Gelovi (hidrogelovi), inače, koriste se u ispitivanjima vode i pojava vezanih za vodu na mikroskopskom nivou zbog svojih odličnih sposobnosti da sa njom interaguju.

Istraživanja vode na graničnim područjima duž ovakvih površina su obimna [Zheng, Pollack, 2003; Zheng et al, 2006]. U skorašnjim studijama, jednostavni eksperimenti su pokazali da se polistirenske mikrosfere (male sferne čestice veličina od 20 nm do 1000 μm , napravljene od različitih tipova materijala: karboksilne, karboksilane, amino, amidin, itd. koje se zbog svojih svojstava koriste u biološkim i medicinskim ispitivanjima), isključuju od površina različitih gelova (slika 2.7) na rastojanjima reda veličina od 100 μm do delova milimetra [Zheng, Pollack, 2003; Zheng et al, 2006]. Rezultati su slični otkrićima sa rožnjačom zeca od pre 30 godina [Green, Otori, 1970].



Slika 2.8: Mikrosfere i ekskluzivna zona. Levo - Veličina EZ ne zavisi od koncentracije mikrosfera. Sredina - pozitivno i negativno naelektrisanje mikrosfera odvajaju. EZ iščezava u prisustvu soli. Desno - električni potencijal EZ kao funkcija razdaljine [Das, 2011].

Ispitivani delovi rastvora u kojima nema mikrosfera prisutni su bez obzira na naelektrisanje mikrosfera, ili koncentraciju rastvora [www.lsbu.ac.uk/water/molecule.html] (slika 2.10). Manje EZ viđene su sa većim mikrosferama ($>5 \mu\text{m}$), ali je ove čestice teško držati u rastvoru jer se talože usled gravitacije. EZ se ne pojavljuju u prisustvu čestica manjih od 200 nm, kao što su kvantne tačke ili fulereni, mada, vizuelizacija ovih čestica putem svetlosnog mikroskopa je teška. Osim mikrosfera, mnoge rastvorene ili razblažene supstance se isključuju, a veličine im variraju od krupnijih čestica: mulj i glina, pa do bioloških tela: bakterije, virusi i eritrociti, pa do mnogo manjih vrsta, kao što su

proteini [Zhao i sar., 2008]. Biološke površine od kojih se odvajaju čestice i formiraju EZ su razne i uključuju razne hidrogelove, polimerne površine (nafion), kao i biološke površine: miofibrili mišića, ligamenata i morske trave, takođe, pokazuju postojanje EZ [Pollack, Chin, 2008; Zheng et al, 2006].

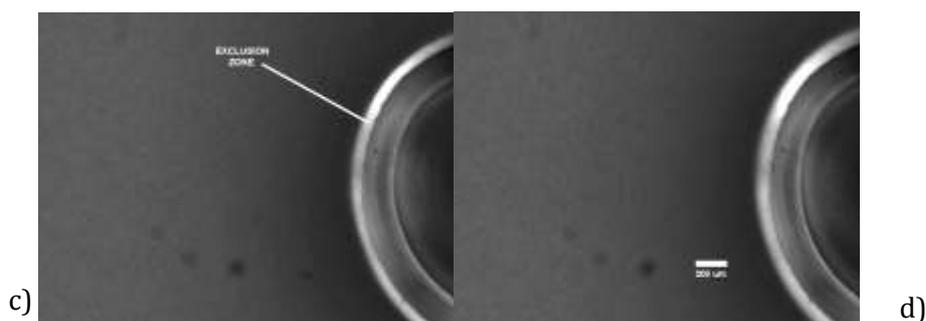
Na stvaranje i nestajanje EZ utiče i koncentracija soli, jer sa povećanjem koncentracije EZ iščezava (slika 2.8). Iako je pH vode u većini eksperimenata neutralan, veličina EZ zavisi od kiselosti ili baznosti rastvora [Zheng, Pollack, 2003].

Eksluzivna zona i nafion

Vodeni gelovi sastoje se od čak 99,99% vode i veoma su korisni pri proučavanju vode na graničnim površinama. Ipak, u mnogim istraživačkim grupama, jonomer nafion, polupropusna membrana u kojoj se razmenjuju protoni, a koja je nepropusna je za kiseonik i vodonik, pokazao se kao idealan materijal za ispitivanje EZ vode [Basnayake, 2006]. Sa ovakvim osobinama nafion je dizajniran da bi vršio separaciju reaktanata i transport protona, a prvenstveno je karakterisan provodnošću protona, propustljivošću metanola i termičkom stabilnošću. Takođe je i najprikladnija površina kada se posmatraju i vrše eksperimenti sa konzistentim i jakim EZ.

Nafion predstavlja jonski kopolimer koji se sastoji od politetrafluoretilenskog (PTFE - teflon) kostura, koji je hidrofobnog karaktera i spoljnih lanaca dve serijski povezane etarske strukture koje se završavaju sa sulfonskim kiselim grupama, koje su hidrofilnog karaktera. Molekularna struktura je biološki relevantna jer predstavlja i hidrofobni i hidrofilni intracelularni lipid i protein.

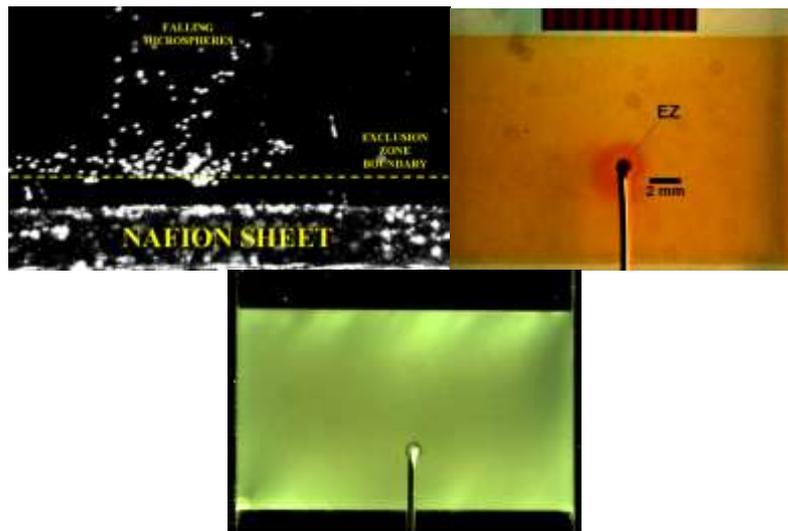




Slika 2.9: Voda i nafion. a) Parče teflona (levo) i nafiona (desno) sa kapi vode od $60\mu\text{L}$. Skala je u mm [Goswami, 2008]. b-d) Tipično formiranje EZ sa nafion tubom i rastvorom mikrosfera pri $t = 0, 30$ i 60s [Das, 2011].

Hidrofilna priroda lista nafiona dolazi do izražaja kada se ispupčava i uvija [Goswami, 2008] kada se na njega postavi kap čiste vode (slika 2.9 a). Kontaktni ugao između kapi i polimera nafiona veći je od 90° i veći u poređenju sa kapi postavljenom na teflon (slika 2.9 b-d). Dodavanjem vode na list polimera nafiona, list i kap će se poravnati, a polimer će absorbovati 20% vode, time pokazujući da nafion ima takođe i hidrofilne osobine. U nekim istraživanjima, do potpune hidratacije lista nafiona došlo je nakon nekoliko nedelja. Otkriveno je da su za ove pojave odgovorni velika gustina naelektrisanja i kretanja molekula iz sulfonskih grupa tokom hidratacije/dehidratacije [Kunimatsu et al, 2011; Lu et al, 2008; Mauritz, Moore, 2004]. Ipak, mnoge teorije nisu potpune budući da konkretna molekularna struktura nafiona nije sasvim jasna [Mauritz, Moore, 2004; Majsztrik et al, 2008] i da su mehaničke osobine vode nepoznate na graničnim područjima u većim, nevodenim površinama.

Kada se tuba nafiona postavi u komoru napunjenu rastvorom sa mikrosferama, pojavljuju se velike EZ veličine $300\text{-}500\ \mu\text{m}$. U drugom eksperimentu, EZ se pojavila sporije pored nafiona postavljenog na dno vertikalne komore, tj. zaustavilo se kretanje mikrosfera ubačenih u vodeni rastvor, kao da je ova zona u stvari mehanička barijera (slika 2.10 levo).



Slika 2.10: EZ u različitim uslovima. Levo – ubačene mikrosfere zaustavljene na granici EZ. Srednje – boja za određivanje pH vrednosti se odvojila (jasan, žuti prsten unutar debljeg, crvenog polja) od tube Nafiona. Desno – eksperiment sproveden paralelno sa eksperimentom sa srednje slike, EZ slične veličine (jasno, crno polje) formirala se oko tube [Das, 2011].

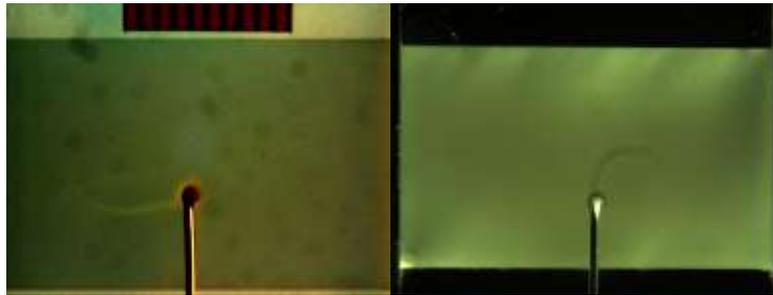
Spektroskopski posmatrano, pokazano je da EZ ima značajne razlike u molekularnoj strukturi u poređenju sa vodom u ostatku ispitivanih uzoraka. Studija koju je sproveo Jian-Ming Zheng 2006. godine sumirala je većinu prethodnih eksperimenata i došlo se do ključnih zapažanja:

1. Pokazano je putem UV-VIS spektroskopije da EZ ima značajan absorpcioni pik na talasnoj dužini od 270 nm, što se razlikuje od pika običe, čiste vode.
2. Kada je korišćeno spektroskopija u infra-crvenom domenu (3.8-4.6 μm), pokazano je da EZ ima redukovanu sposobnost prolaska zračenja u poređenju sa vodom u ostatku ispitivanih uzoraka.

Oba zaključka su obezbedila dokaz da je voda u EZ jedinstvena i da je gušća ili bolje međusobno povezana nego voda u ostatku ispitivanih uzoraka. Pokazano je takođe da osobine i pojavljivanje ekskluzivne zone neočekivano zavise od bliskog infra-crvenog svetla (1-5 μ) [Chai et al, 2009]. Na talasnim dužinama koje odgovaraju zapaženim bliskim infracrvenim pikovima, veličine EZ se značajno povećavaju sa neznatnim zagrevanjem vodenog rastvora [Das, 2011].

Da bi se merila koncentracija slobodnih protona, koristi se pH boja da bi se označilo da li je rastvor kiseo (crveno) ili bazan (plavo). Kada se doda u komoru sa

Nafion tubom, pH boja se takođe odvaja od nafiona (slika 2.10 sredina). Veličine EZ sa pH bojom bile su slične eksperimentima koji su sprovedeni paralelno, a u kojima su korišćeni rastvori mikrosfera (slika 2.10 desno). Posmatranja pH boja su takođe otkrila da se iza dela EZ se nalazi deo koji je pun protona i koji se smanjuje iza granice EZ. Ova otkrića pokazala su da se fenomen razdvajanja naelektrisanja dešava sa formiranjem EZ. Protoni koji napuštaju EZ mogu objasniti zašto se može izmeriti mreža negativnog električnog potencijala u ovoj oblasti.



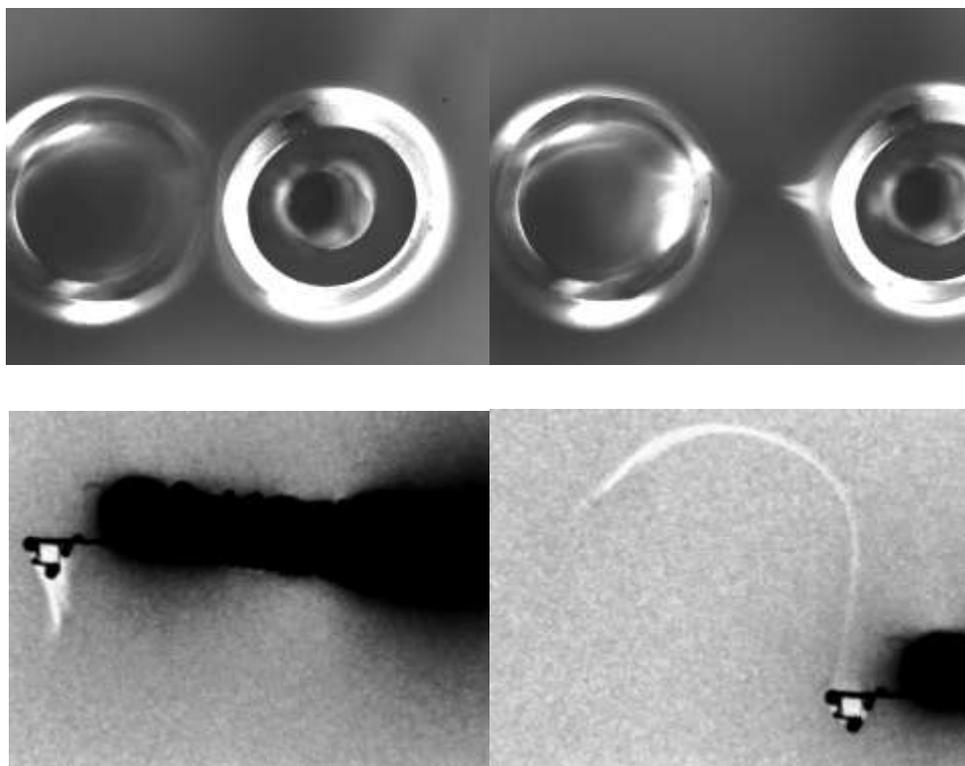
Slika 2.11: „Repovi“ EZ. Levo – pH boja je ubačena u komoru i odstojala je 20min.

Negativno naelektrsane mikrosfere presvučene amino grupama dale su rastvoru visoku pH vrednost i odgovarajuću plavu boju. Kako se EZ formirala, nakupljeni protoni (crveno) neutralisali su visoku pH vrednost i promeili boju u žućkastu. Desno – paralelno sproveden eksperiment, ali samo sa rastvorom amino mikrosfera [Das, 2011].

Uzimajući u obzir pomenute eksperimentalne podatke, dolazi se do zaključka da je voda u EZ u obliku „tečnih kristala“, sa drugačijim mehaničkim osobinama zbog strukturne uređenosti raspodele naelektrisanja. Dok su manuelano izvođeni eksperimenti otkrili zonu bez mikrosfera i pH boje u EZ, u dugoročnim eksperimentima ova zona je rasla kao kristal i u drugim slučajevima se razvlačila kao da je kotinualni medijum. Kada je rastvor mikrosfera, ili pH boja ubačena pipetom u komoru sa tubom Nafiona, EZ se odmah formira. Tokom dugog perioda, ova zona je rasla i trag u obliku repa se razvukao u ostatak vode iz posmatranog uzorka (slika 2.11).

Slično, kada sve tube nafiona stvaraju EZ u rastvoru mikrosfera, u delu između tuba su se pokazale zbijene EZ izgledajući kao odvojeni mehanički kontinumi. Kada su tube postavljene jedna pored druge pomeranje jedne od tuba je dovelo do skupljanja EZ i formiranja „mosta“ EZ (slike 2.12 gore) koji je bio prisutan nekoliko minuta. Ovaj most, u drugim eksperimentima, razvlačen je kao

viskoelastični medijum u „trag EZ“ unutar komore, a veličina je bila nekoliko milimetara (slike 2.12 dole).



Slika 2.12: EZ u obliku mosta između tuba i u obliku traga. Gore – nakon formiranja EZ (uočene zbijene zone između tuba), desna tuba je pomerenjena i time je formiran viskozni most EZ. Dole – nakon što je stvorena EZ pored parčeta nafiona, parče je pomerenjeno u komori i time se i EZ pomerala, ostavljajući beli trag u kome nema mikrosfera [Das, 2011].

Eksperimenti i podaci koji su ovde opisani pokazuju da su osobine EZ drugačije od osobina vode u ostalim delovima ispitivanih uzoraka, kao i da EZ ispoljavaju silu i mogu biti mehanički drugačije od vode u makroskopskim količinama. Ovakva sila, tj razlika u mehaničkom ponašanju još uvek nije kvantifikovana i očekuje se da će biti sprovedena dalja istraživanja koja će dati odgovarajuće objašnjenje.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA - UOČAVANJE PROBLEMA

Na osnovu uvida u postojeće stanje predmeta istraživanja uočavamo sledeće:

1. Voda zajedno sa genima, proteinima i mineralima predstavlja najvažniju komponentu ljudskog organizma i biološkog sveta.
2. Postoje razni pristupi istraživanju strukturalnih i dinamičkih osobina vode, kao što su:
 - akvafotomika (*aquaphotomica*) na bazi IR spektroskopije - ova istraživanja daju brze i jasne analize interakcija između svetlosti i vode u domenu IR elektromagnetnog spektra. VIS/NIR spektroskopija omogućava posmatranje vode na molekularnom nivou, što znači da je olakšano dobijanje informacija bitnih za bolje razumevanje funkcionisanja biološkog sveta [Tsenkova, 2009; Tsenkova, 2007];
 - voda kao pseudo-tečni kristal - ova istraživanja ukazuju na ideju da je organizam koherentan, čak kvantno koherentan, i da je voda u obliku „tečnog kristala“ svojstveni deo molekularne kvantne mašinerije koja daje energetske-informacionu osnovu ćelijama i organizmu u celini. Tako, ne samo voda u makromolekulima, već i voda u ćelijama i tkivima mora da bude sastavni deo vode koja formira dinamički koherentne delove sa makromolekulima koji su u nju uronjeni, tj vode koja je u stanju tečnog kristala [Wan-Ho, 2008];
 - istraživanje vode u ekskluzivnoj zoni (EZ) - jedan od značajnih naučnih pravaca za bolje razumevanje uloge vode u funkcionisanju biomolekula, tkiva i ljudskog organizma. Voda u biološkim sistemima posmatra se sa stanovišta da se pojavljuje u formi slojevite interfacijalne vode, tj vode koja se pojavljuje na graničnim područjima, a sa izmenjenim koherentnim fizičko-hemijskim svojstvima. Istraživanja su pokazala da voda koja se nalazi pored hidrofилnih površina ima dugačije

karakteristike od voda u ostalim stanjima i da se razlikuje u viskoznosti, gustini, temperaturi smrzavanja i relativnoj propustljivosti. Takođe, ova zona vode može biti i nekoliko stotina mikrona široka [Zheng et al, 2006].

- klasterizacija vode i njena karakterizacija preko paramagnetizma i dijamagnetizma [Koruga, 2012 a]

Na osnovu razmatranja postojeće literature i stanja, ciljevi ovog istraživanja su:

1. izučiti i istražiti postojanja ekskluzivne zone prilikom interakcije dejonizovane vode sa hidrofobnim i hidrofilnim materijalima
2. izučiti i istražiti istraživanje postojanja ekskluzivne zone prilikom interakcije dejonizovane vode sa biomolekulima
3. istražiti postojanja ekskluzivne zone prilikom interakcije dejonizovane vode sa hidrogenizovanim ugljeničnim nanomaterijalima
4. dati objašnjenje formiranja EZ na bazi vodoničnih veza molekula vode imajući u vidu da molekuli vode u EZ istiskuju strana tela pa osnovna interakcija među molekulima vode je vodonična veza.

4. MATERIJAL

4.1 18.2 MΩ voda

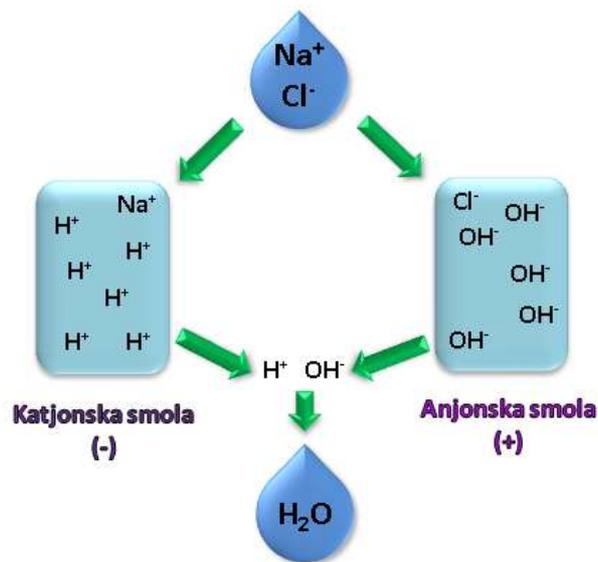
Dejonizovana voda, takođe poznata i kao demineralizovana, je voda iz koje su uklonjeni joni i sve ostale primese, čime se dobija čista voda (čistoća u ppb). Kvalitet i čistoća ove vode ispunjavaju stroge zahteve Evropske Farmakopeje (jedino voda za sterilne namene ima još strožije zahteve).

Tabela 4.1: Zahtevi farmakopeja za čistoću dejonizovane [http://www.rephile.com/news/newsDetail_148.html].

| Materije | Evropska farmakopeja | Američka farmakopeja |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Nitrati | <0.2 ppm | - |
| Teški metali | <0.1 ppm | - |
| Otpornost | <500 µg/L C* | <100 CFU/ml** |
| Ukupni oksidacioni ogranski ugljenik | <4.3 µS/cm na 20°C | <1.3 µS/cm na 25°C |
| Bakterije | <100 CFU/ml | <100 CFU/ml |

Dejonizacija vode

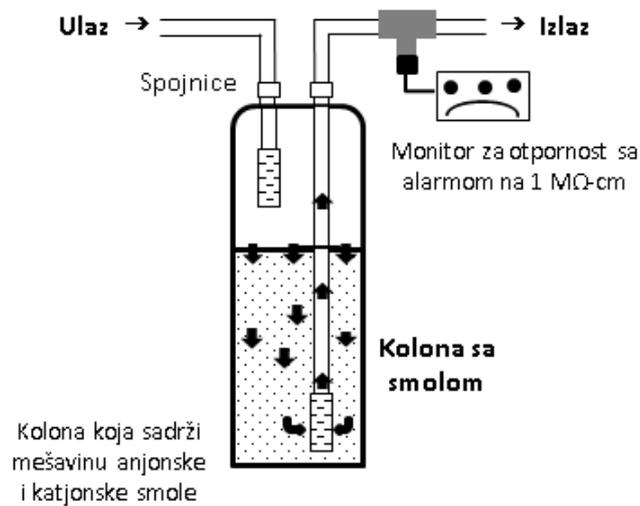
Proces dejonizacije uklanja nepoželjne jone iz vode putem izmene jona. Pozitivno naelektrisani joni (katjoni) i negativno naelektrisani joni (anjoni) se zamenjuju vodonikovim (H⁺) i hidroksilnim (OH⁻) jonima, respektivno, u zavisnosti od afiniteta smole prema jonima (slika 4.1). Vodonikovi i hidroksilni joni se zatim sklapaju i stvaraju molekule vode.



Slika 4.1: Šematski prikaz dejonizacije [www.tdsmeter.com/what-is?id=0015].

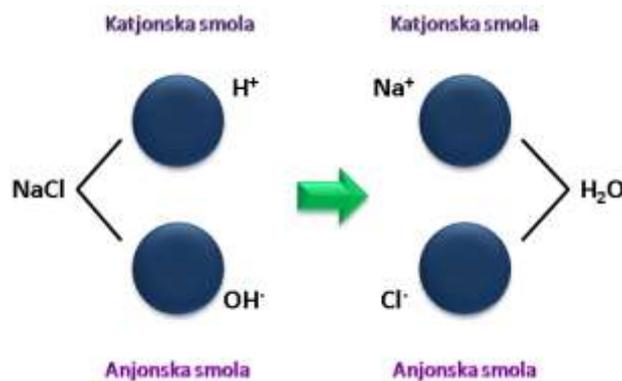
Većina izmenjivača sastoji se od kolone koja je ispunjena poroznim zrcima smole prečnika 0.3 do 1.2 mm. Smole sadrže aktivne anjonske ili katjonske grupe, kao što su jon vodonika i hidroksilni jon, koji se mogu zamenjivati. Prilikom obrade, voda protiče kroz kolonu dolazeći u kontakt sa zrcima smole. Uobičajena brzina protoka je 10 do 30 m/h. Zapremina smole kod jonske izmene je od svega nekoliko litara za laboratorijsku upotrebu ili u domaćinstvu, pa do nekoliko kubnih metara za potrebe velikih industrijskih postrojenja. Da bi se izbegla oštećenja smole i gubitak pritiska, voda koja dolazi u kolonu treba da je prethodno filtrirana kako bi iz nje bile odstranjene pojedine materije.

Ovako prečišćena voda ne sadrži jone, ali može da sadrži viruse i bakterije, budući da oni nemaju nesparena slobodna naelektrisanja i ne mogu biti privučeni električnim poljem kolone za izmenjivanje, osim ako slučajno u njega „upadnu“.



Slika 4.2: Uporšćen uređaj za dejonizaciju
[adaptirano od www.aquatechnology.net/industrial_deionization.html].

Voda rastvara minerale razdvajajući ih na katjone (+) i anjone (-). Na primer, natrijum hlorid (NaCl) rastvara se u vodi razdvajanjem na katjon natrijuma (Na^+) i anjon hlora (Cl^-). Razdvojeni joni imaju jonska naelektrisanja koja se lako uklanjaju dejonizacijom.



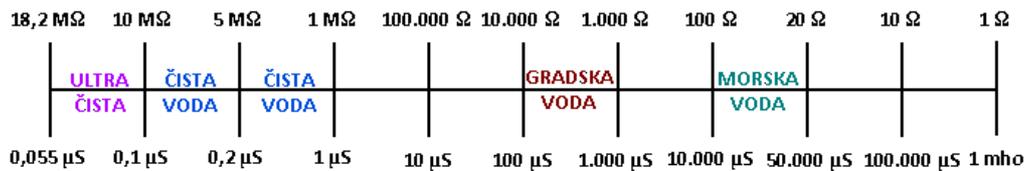
Slika 4.3: Princip odvajanja jona
[adaptirano od www.pakwatercare.org/technical/filtration-method/filtration-methods/].

Neke čvrste materije kada se rastvaraju u vodi, ne razdvajaju se na jone, već imaju dovoljnu gustinu naelektrisanja da mogu da budu premošćeni vodenim molekulom. Primeri su organske materije šećer, alkohol i rastvarači. Iako se ne razlažu na jone, oni predaju površinsko jonsko naelektrisanje i tako mogu biti uklonjeni dejonizacijom.

Hidrofobne organske materije i neke biološke supstance, kada su pomešane u vodi, su ne-jonske i ne mogu biti odstranjene dejonizacijom, ali mogu biti

uklonjene drugačijom procesima i opremom, kao što su multi-media filteri, filteri sa aktivnim ugljem i reverzna osmoza.

U zavisnosti od kombinacije opreme koja se koristi dejonizacijom se može postići otpornost vode što odgovara različitim stepenima čistoće vode od 100.000 ohm/cm do 18 ohm/cm (ili mega-ohm/cm).



Slika 4.4: Otpornost vs. provodljivost

[adaptirano prema:

www.apswater.com/article.asp?id=302&title=Conductivity_Vs._Resistivity_Vs_P.P.M._Quick_Chart].

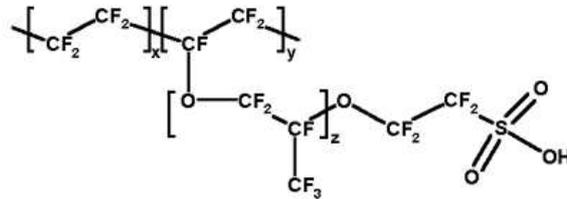
Čistoća vode se meri u raznim jedinicama (ppm, ppb, itd), ali se najčešće za praktičnu upotrebu koristi jedinica otpornosti (ohm/cm) ili provodljivosti (microsiemens/cm). Pri primeni čiste vode, čistoća se meri otpornošću, jer bi samo provodljivost bila previše mala da se precizno izmeri. Primera radi, u farmaceutskoj industriji je zahtevana čistoća od 100 KΩ (100.000 ohm/cm), dok je u proizvodnji električnih kola potrebna čistoća od najmanje 10 MΩ (10 miliona ohm/cm).

4.2 Nafion

U eksperimentima koji su izvođeni korišćen je Nafion TT-030 u obliku tube (*Perma Pure, LLC*). Unutrašnji prečnik tube je $d = 635 \mu\text{m}$, a spoljašnji $d = 830 \mu\text{m}$, debljina zida tube = $97.5 \mu\text{m}$.

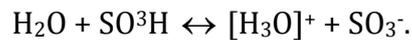
Nafion je prvi napravljeni sintetički polimer sa jonskim osobinama i na taj način je razvijena sasvim nova grupa polimera poznata kao jonomeri. Jonske osobine su postignute dodavanjem sulfatne kiselinske grupe, hemijskog jedinjenja sa izrazito jakim jonskim osobinama. Sadrži fluoro-ugljeničnu osnovu koja je zaslužna za hidrofobne karakteristike i per-fluoro-etarske bočne grupe zaslužne za hidrofilne karakteristike. Kada je izložen vodi, hidrolizovan oblik $\text{SO}_3^- \text{H}_3\text{O}^+$,

omogućava efikasan transport protona kroz membranu. Takođe, pokazuje izrazite hidrofilne sposobnosti, tj. odlično apsorbuje vodu zbog povezanosti sulfatnih grupa.



Slika 4.5: Hemijski sastav monomera nafiona
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nafion_structure.png].

Reakcija hidrolize između vode i sulfatne kisele grupe u nafionu:

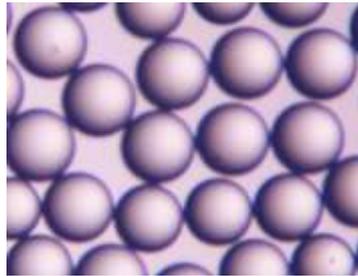


Nafion se proizvodi u obliku soli sa neutralizovanim sulfatno kiselinjskim grupama. U ovakvom obliku, nafion je termo-plastičan (može da se izvlači i formira pod uticajem temperature i pritiska), ali nije hemijski aktivan. Kada se izvuče i poprimi finalni oblik, obično oblik tuba ili listova, nafion se aktivira prelaskom slanog oblika u kiseli. U ovom stanju je poluprovidan. Kada je u aktivnom stanju, odmah počinje da reaguje sa okolinom. Da bi transportovao vodu (suve ili vlažne gasove), voda mora da dođe u kontakt sa aktivnim delovima površine nafiona. Osim sposobnosti da je provodnik protona i vode, takođe odlično provodi jone, odličan je katalizator kiselina, odlično se ponaša na visokim temperaturama (do 190°C) i dobro reaguje na hemijske uticaje (ne otpušta fragmente u toku hemijskih reakcija).

4.3 Mikrosfere

Mikrosfere korišćene u eksperimentima su Polybead® Carboxylate Microspheres (*Polysciences, Inc*), negativnog naelektrisanja, prečnika 1.00 μm i količine čestica po mililitru 4.55×10^{10} .

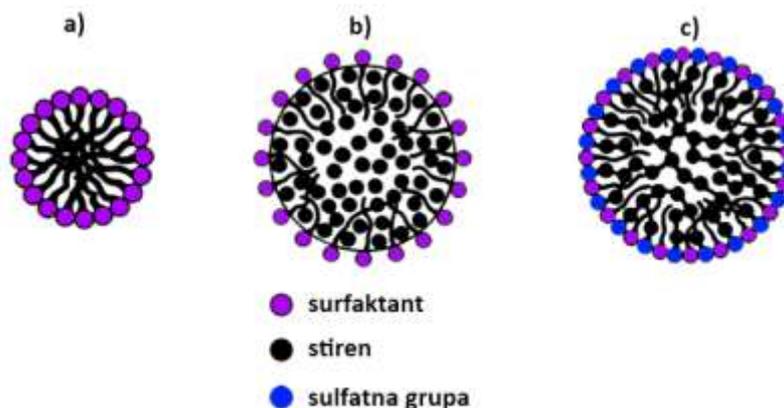
[www.polysciences.com/Catalog/Department/Product/98/categoryId_322/productId_542/].



Slika 4.6: Polisterin mikrosfere prečnika 10 μm posmatrane pod uvećanjem od 400x.

Postoji čitav asortiman polimernih mikrosfera uniformnih veličina koje imaju razne primene u naučnim ispitivanjima vezanim za život čoveka. Dostupne su u prečnicima od 20 nm do 20 μm , pa obezbeđuju odličnu uniformnost po veličinama. Polimerne čestice imaju mnogo potencijalnih primena zbog njihovih osobina, kao što je sferni oblik dobro karakterisana površina, dobro definisan prečnik i hrapavost. Najvažniju primenu mikrosfere imaju u polju biomedicine, u kome ih sinteza i upotreba novih polimernih materijala sa različitim osobinama čini veoma vrednim komponentama za ispitivanja bioloških tkiva [Bangs LB, 1987; Guilford, 1973; Shahar, 1986].

Polimerne mikrosfere su sintetisane procesom emulzione polimerizacije u kome je surfaktant raspršen u vodi i stvara emulziju. Generalno, površine su im zbog surfaktanata veoma hidrofilne i stabilne su u vodenim suspenzijama. Hidrofobni rep i hidrofilna glava molekula surfaktanta formiraju micelijum (slika 4.7a) iznad kritične koncentracije micelijuma surfaktanta.



Slika 4.7: Emulziona polimerizacija [adaptirano prema: www.bangslab.com].

Kada su dodati hidrofobni monomeri (npr. stiren ili metilmetakrilat) u vodenu disperziju, ulaze u hidrofobnu unutrašnjost micelijuma (slika 4.7b). Dodavanje inicijatora pokreće polimerizaciju monomera i rezultat su polimerni lanci uniformne matrice. Sulfatni joni od inicijatora završavaju na krajevima polimernih lanaca (slika 4.7c) i omogućavaju pasivnu adsorpciju i kovalentno vezivanje proteina za lanac.

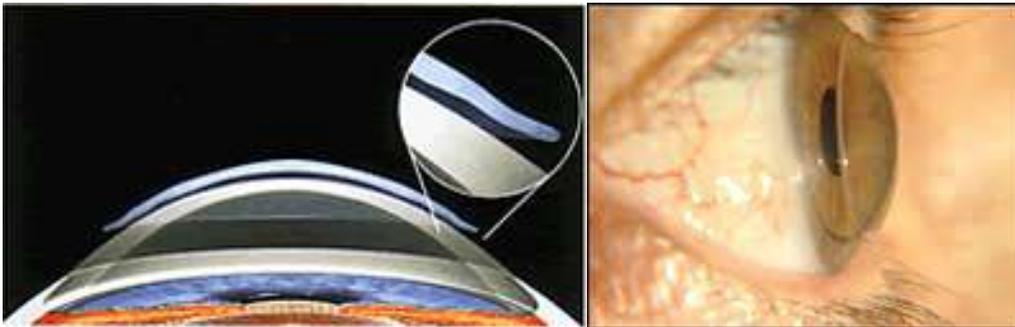
Polisterinske mikrosfere se koriste u bomedicinskim istraživanjima zbog svoje sposobnosti da olakšavaju proceduru sortiranja ćelija i imunoloških taloženja. Proteini i ligandi bivaju apsorbirani na polisterin lako i stalno, što čini ove mikrosfere pogodnim za medicinska istraživanja i eksperimente u biološkim laboratorijama. Mikrosfere se dobijaju u vodenom rastvoru sa 2,5% čvrstih materija.

4.4 Kontaktno sočivo

Refrakcione anomalije kratkovidost, dalekovidost, astigmatizam i prezbiopija najčešće se koriguju optičkim pomagalicama, naočarima ili kontaktnim sočivima. Kontaktna sočiva su medicinska pomagala izrađena u obliku konvergentnog, divergentnog ili toričnog (sferno-cilindričnog) optičkog sočiva izrađenog od plastike u čijoj osnovi se nalaze polimeri, a koja se stavljaju na rožnjaču oka i time obezbeđuju refrakciju svetlosnih zraka kojim se koriguje odgovarajuća refrakciona anomalija. Za izradu kontaktnih sočiva koriste se materijali koji moraju biti kompatibilni sa suznom filmom oka, rožnjačom i kapcima. "Tvrda" ili "gaspropusna" (RGP) sočiva su na bazi polimetilmetakrilata, dok su "meka" sočiva na bazi hidrofilnih polimera. Pri upotrebi RGP sočiva rožnjača dobija 90 % kiseonika kroz sočivo, a samo 10 % preko suza. Zbog svojih dobrih mehaničkih i optičkih karakteristika, lakoće obrade i niske cene polimetilmetakrilat (PMMA) je do sada najbolji polimer za proizvodnju tvrdih kontaktnih sočiva. Njegova osobina da je umereno hidrofoban je veoma važna zbog efikasnog odbijanja proteina. Materijali koji se koriste u proizvodnji gaspropusnih sočiva su: silikon akrilat, fluoro-silikon akrilat i fleksibilni fluoropolimer. Silikon karakteriše visoka propustljivost za kiseonik i velika hidrofobnost i samim tim je

smanjena kvašljivost sočiva i otpornost na savijanje. Zbog toga se silikonu dodaju drugi monomeri – metilmetakrilat da bi se poboljšala čvrstina i dimenziona stabilnost, a HAMA da bi se poboljšalo vlaženje sočiva.

Slika 4.8 prikazuje položaj gaspropusnog sočiva na oku. Može se videti da ako je dobro podešeno, sočivo ni u jednoj tački ne dodiruje rožnjaču, tj. ono takoreći “pliva” po suznom filmu. Fraktalna dimenzija kontaktnog sočiva je 2.48 do 2.52 u zavisnosti od obrade sočiva. Vrednost od oko 2.5 je najbolja, jer je tada najbolja interakcija sočiva sa okom [Bojović, 2009]. Tako je obezbeđena dobra pokretljivost sočiva i kontinualna zamena suznog filma neophodnog za normalno funkcionisanje sočiva i rožnjače.



Slika 4.8: Gaspropusno sočivo na oku
[preuzeto iz: www.allaboutvision.com/contacts/rgps.htm].

Polimeri za proizvodnju gaspropusnih kontaktnih sočiva dobijaju se hemijskom reakcijom polimerizacije. Polimerizacijom hemijska jedinjenja male molekulske mase, tj. monomeri, ili smeša jedinjenja takvog tipa, međusobno reaguju do trenutka kada se iscrpe sve funkcionalne grupe, nastaje jedinjenje i molekuli sa većom molekulskom masom od samih reaktanata. Kao proizvod ove reakcije nastaje polimer [Smith, March, 2007]. Istraživanjem u ovoj disertaciji obuhvaćene su tri vrste gaspropusnih (RGP) sočiva, od kojih su dva italijanske kompanije SOLEKO™, pod komercijalnim nazivom SP-40™. Materijal korišćen pri izradi ovih sočiva pripada grupi polimera pod nazivom poli-MMA-co-SiloxySilanMetacrylati. Polimerizacija metilmetakrilata izvršena je putem radikalne polimerizacije u prisustvu inicijatora 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN). Nanofotonski materijal za jedan od ispitivanih tipova kontaktnih sočiva dobijen je uključivanjem molekula fulerena C₆₀ i njegovih modifikovane forme (derivata)

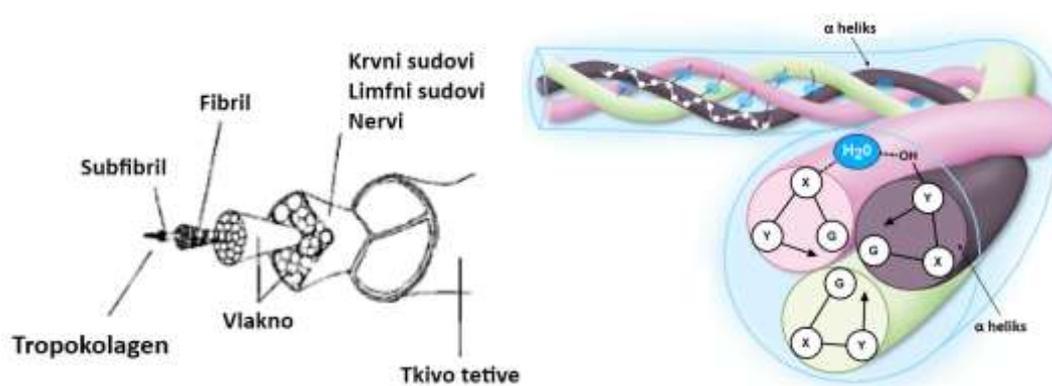
fuleren hidrosilata $C_{60}(OH)_{24}$ - fullerola u strukturu osnovnog materijala SP-40 [Projekat III45009; Stamenković, 2012]. Novi materijali su dobijeni tako što su čestice fulerena pomešane sa monomerima, koji ulaze u sastav materijala SP-40. Polimerizacija je bila homogena i izvedena je pojedinačno dodavanjem po 1 g od svakog nanomaterijala u osnovni materijal, tako da je njihov procenat u smeši bio 0.33%.

4.5 Kolagen tipa I

Osobine vode u prisustvu biomolekula kolagena tipa I

Kolagen spada u grupu višefunkcionalnih proteina koji se najčešće nalaze u kostima, koži, tetivama, ligamentima, krvnim sudovima i zubima. Kao najzastupljeniji protein kod sisara čini 40% suve mase tela, tj. 70% suve mase kože. Kolageni se posle sintetisanja u citoplazmi izlučuju u ekstracelularni prostor, tu se uređuju u polimere, tanke, vlaknaste strukture poznate kao kolageniski fibrili, prečnika 10 - 300 nm. Fibrili se udružuju u veće skupine, kolagenska vlakna koja imaju i po nekoliko mikrometara u prečniku [Koruga, Tomić, 2002]. Njihova osnovna struktura se menja u pojedinim tkivima. U tetivama i ligamentima postavljena su paralelno radi postizanja visoke čvrstoće, a u koži su kolagenska vlakna odlično uređena u slojeve ispod bazalne membrane, kao i u dermisu, a slojevi su sa „slučajnom“ raspodelom orijentacije. [Raković et al, 2010]

Prema dosadašnjim rezultatima 24 (a i više) proteina klasifikovano je u grupu kolagena [Miller, 1984; Kuijpers et al, 1999; Hahn et al, 2006]. Svi ovi molekuli kolagena razlikuju se prema sastavu amino-kiselina u sekvencama u lancu, a među njima je najzastupljeniji kolagen tipa I. Njegovu strukturu čini tropokolagen, a masa mu iznosi 285.000 Daltona ($1D = 1,67 \times 10^{-26}$ kg). Tropokolagen sadrži tri polipeptidna lanca, α heliksa, a svaki od njih je uvijen u spiralu u smeru levog zavrtnja. Ovi lanci su međusobno isprepletani tako da formiraju kvaternernu strukturu u obliku snopa, a pri formiranju ovog snopa svaki lanac se ponovo spiralno uvija oko centralne molekulske ose, ali u smeru desnog zavrtnja.

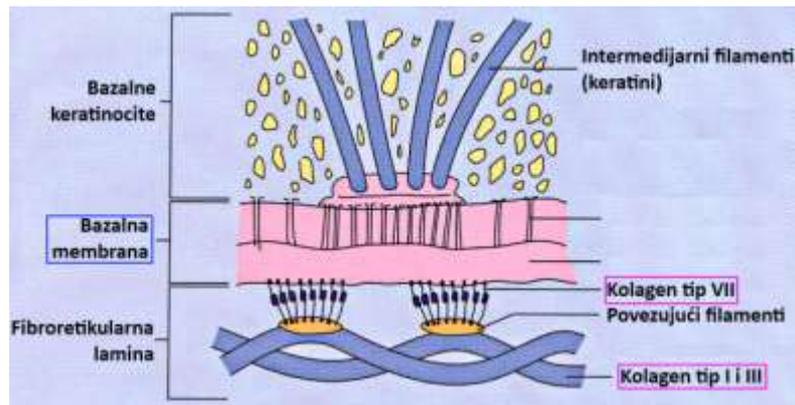


Slika 4.9: Nivoi strukture kolagena (levo) i spirala tropokolagena (desno).
[Raković et al, 2010; www.alexandria.healthlibrary.ca/documents/notes/bom/unit_1/L-36%20Skin-1%20Collagen%20and%20Extracellular%20Matrix.xml].

U 95 % aminokiselina zastupljena je sekvenca Gly-X-Y, gde je Gly glicerinski ostatak, a X i Y mogu biti bilo koje druge amino-kiseline, a najčešće su to prolin (Pro) i hidroksiprolin (Hyp). Tri lanca u heliksu kolagena su radi stabilnosti međusobno povezana poprečnim vodoničnim vezama.

Tabela 4.2: Raspodela kolagena u ljudskom organizmu [Koruga, Tomić, 2002; Fratzl, 2008].

| Tip kolagena | Raspodela u tkivu |
|--------------|---|
| I | najprisutniji kolagen u koži, ligamentima, kostima, rožnjači, plućima i krvnim sudovima |
| II | specifično raspoređen, nalazi se samo u hrskavici |
| III | nalazi se u relativno elastičnim tkivima: placenta, pluća, krvni sudovi |
| IV | kolagen bazalne membrane u koži |
| V | u rožnjači oka sa malim udelom zajedno sa tipom I |
| VI | u većini intersticijalnih tkiva zajedno sa tipom I |
| VII | nalazi se ispod bazalne membrane, kao spoj epidermis i dermisa – epitelijalna tkiva |
| VIII | prisutan u nekim endotelijalnim ćelijama |
| IX | u hrskavici, zajedno sa tipom II |
| X | u hipertrofičnoj i mineralizovanoj hrskavici |
| XI | u hrskavici |
| XII | javlja se uvek u interakciji sa tipovima I i III |



Slika 4.10: Povezivanje filamenata kolagena u koži [adaptirano prema: Gawkrödger, 2002].

4.6 Hidrogenizovan nanomaterijal fullerol $C_{60}(OH)_{24}$ i njegove interakcije sa vodom

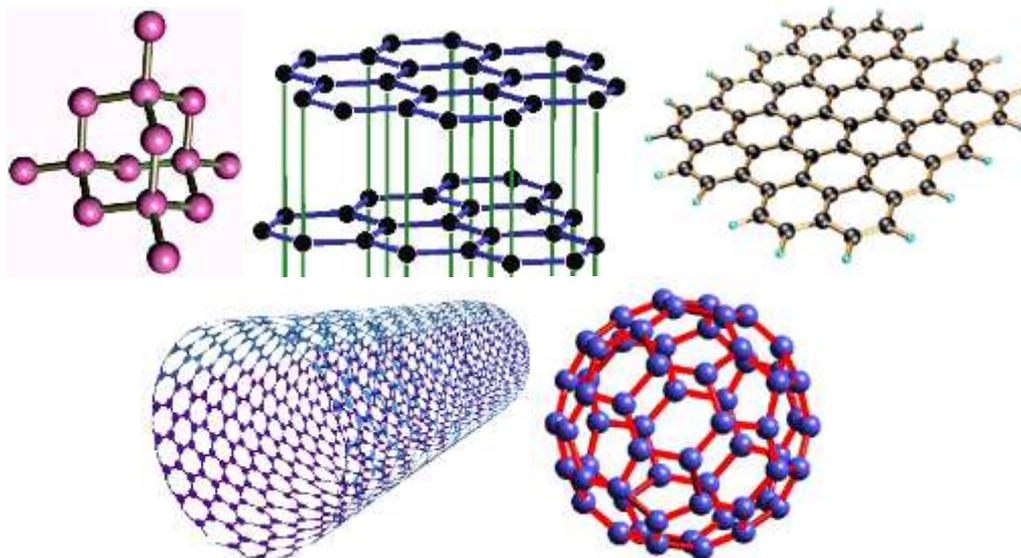
Postoje tri vrste nano-struktura:

1. nanopartikule - materijali koji se dobijaju procesom sinteze jedne vrste metala (zlato, srebro, bakar....., kvantne tačke) i usitnjavanjem makroskopskog materijala (npr: grafit se seče do dimenzija nano nivoa) [Wiesner et al., 2006; Aikawa et al., 2007; Badireddy et al., 2007; Beavers et al., 2006]. Nanočestice na koje je obraćena najveća pažnja naučnika su kvantne tačke i metalni oksidi.
2. nanomaterijali - najviše proučavani su fulereni [Brant et al, 2006; Brant et al, 2007; Langa, Nierengarten, 2007; Lyon et al, 2006] i predstavljaju strukture koje nastaju u procesu sinteze kod kojih je najmanje jedna dimenzija na nano nivou (0D-fuleren, 1D-nanotube, 2D-grafen, 3D-dijamant).

Fulereni

Fulereni su treća alotropska modifikacija ugljenika, pored dijamanta i grafita (slika 4.11). Otkriće fulerena C_{60} 1985. godine od strane Ser Harold W. Kroto-a, Robert F. Culr Jr.-a i Richard E. Smiley-a, otvorilo je nove perspektive u hemiji i nauci o materijalima [Kroto, 1985]. Dobili su ime po geodetskim kupolama *Richard Buckminster Fuller*-a i takođe su poznati kao „bakminster fulereni“ ili

„buckyballs“. Ugljenikovi atomi u fulerenima mogu biti organizovani u sfernom (C_{60}), elipsoidnom (C_{70}) – obliku kaveza, ili cilindričnom (nano tube) obliku.



Slika 4.11: Forme ugljenika: dijamant (3D), grafit (2⁽³⁾D), grafen (2D), nano tube (1D), fuleren (0D), respektivno.

Jedinstvene osobine koje fulerene čine interesantnim su: nizak prag emisije odlična stabilnost emisije [Dresselhaus, 2001; Rinzler et al, 1995], dobre sposobnosti skladištenja vodonika [Cheng et al, 2001], velika jačina istezanja i elastičnost [Ajayan, Zhou, 2001], električna osetljivost u različitim hemijskim sredinama [Chopra et al, 2003] i visoka termička stabilnost [Langa, Nierengarten, 2007]. Zbog ovih jedinstvenih osobina, fulereni imaju široku primenu (kompoziti velike snage, filtracione membrane za filtriranje vode, vazdušni filteri, pri pravljenju lekova u farmaceutskoj industriji, uređaji za skladištenje energije – skladištenje vodonika) [Koruga et al, 1993]. Ugljenični nanomaterijali i njihovi derivati su ispitivani kako bi se optimizirao prolazak lekova kroz krvno-moždanu barijeru [Martin, Kohli, 2003], naročito kroz ćelije zahvaćene kancerom [Kam et al, 2005]. Da bi fulereni dostigli svoj pun potencijal moraju biti rastvoreni u vodenim ili drugim pogodnim rastvorima. Sintetisanje fulerena može se odvijati na različite načine i različitim tehnikama, a sve s obzirom na funkciju koju treba da obavljaju.

Vodeni rastvori fullerena

Fulereni su veoma slabo rastvorljivi u vodi, a procenjena rastvorljivost je manja od 10^{-9} mg/l [Marcus et al, 2001; Heyman, 1996]. Nerastvorljivost fullerena u polarnim rastvaračima, kakva je voda, posledica je njihove hidrofobne prirode. Hidrofobne površine su karakterisane nedostatkom Lewis-ovih kiselo-baznih položaja (γ^+ i γ^-), koji sprečavaju molekule vode da se vežu putem vodoničnih veza sa površinom. Razlog za hidrofobnost fullerola leži u izbacivanju molekula fullerena iz vodenih rastvora, zbog slobodne energije vodoničnih veza i kohezije molekula vode (-102 ml/m²) [Van Oss, 1993]. Ova slobodna energija kohezije nastaje zbog prirodne tendencije molekula vode da se strukturiraju. Molekuli vode se strukturiraju u obliku mreža vodoničnih veza (već pomenuto u delu 4.1), koje se kontinuirano stvaraju i raspadaju [Israelachvili, 1992]. Tip interakcije koji će se desiti sa molekulima C₆₀ i vode, tj. da li će C₆₀ biti rastvoren ili izbačen iz rastvora, može biti procenjen kroz analize interakcija na graničnim područjima između molekula rastvarača i C₆₀. Slobodna energija u graničnim područjima između C₆₀ i vode (ΔG_{i3}) može se izraziti na sledeći način [Van Oss, 1993]

$$\Delta G_{i3} = -2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_3^{LW}} + \sqrt{\gamma_1^+\gamma_3^-} + \sqrt{\gamma_1^-\gamma_3^+}. \quad (1)$$

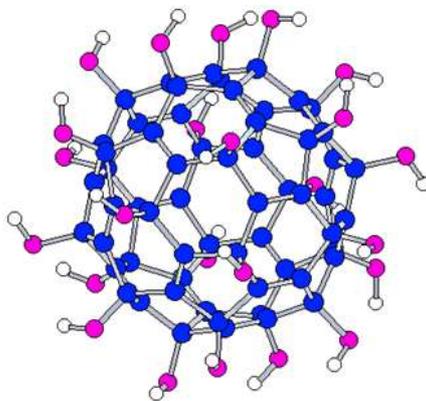
U jednačini (1) komponente koje se odnose na C₆₀ obeležene su indeksom 1, a one koje se odnose na rastvarač – vodu obeležene su indeksom 3. Iz ove jednačine se vidi da je interakcija između molekula C₆₀ i vode funkcija komponenti površinske energije apolarnih Van der Waals-ovih (γ^{LW}) i polarnih Lewis-ovih kiselina (γ^+) i baza (γ^-) za obe materije. U stvari, ΔG_{i3} je uvek negativno jer je voda uvek privučena hidrofobnim površinama, čak i u najmanjoj meri.

Fuleroli

Fuleroli su inženjerski modelirani nanomaterijali s obzirom na njihovu namenu. Molekul fullerola ima oblik ikonosaedra, sa 12 pentagona i 20 heksagona. Kod fullerena, bazne osnove fullerola, svaki atom ugljenika povezan sa još tri

susedna atoma preko sp^2 orbitala i dodate su OH grupe. Broj OH grupa teorijski može biti od 1 do 60, a stabilnim su se pokazali fulleroli sa 10 – 24 OH grupe.

Ovi molekuli su hidrofobni i najbolje se rastvaraju u vodi i organskim rastvaračima. Da bi bili biomedicinski primenljivi, fulereni moraju da imaju molekule rastvorljive u vodi. S obzirom na činjenicu da formiraju 3 različita mesta vezivanja, moguće je napraviti fullerene rastvorljive u vodi dodavanjem 12 i 24 hidroksilne (OH)- grupe. Ove supstance nazvane fulleroli su veoma pogodne za medicinsku i farmaceutsku primenu. Fullerol sa 24 hidroksilne grupe $C_{60}(OH)_{24}$ ima prečnik od oko 1,2 nm i simetrično raspoređene hidroksilne grupe na sferi C_{60} . Tamno braon je boje, amorfne strukture i rastvorljiv u vodi i dimetil-sulfoksidu (DMSO). Kada se rastvori u vodi (u pH intervalu od 3,5 do 9,8), u opsegu koncentracija od 10^{-3} mol/dm do 5×10^{-3} mol/dm,+ stvara polianjonske nano skupove (gomile), čije su veličine uglavnom između 20 i 100 nm. Skupovi veličine preko 400 nm nisu interesantni za biološka istraživanja [Djordjevic, Bogdanovic, 2008].

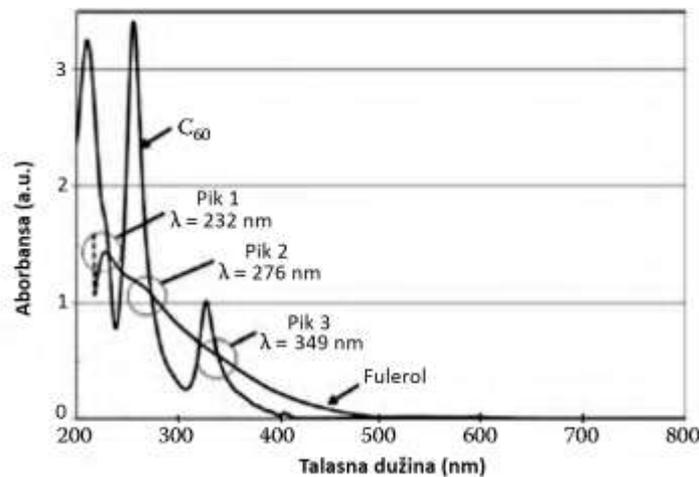


Slika 4.12: Molekul fullerola $C_{60}(OH)_{24}$ [Chiang et al, 1994].

Postoje brojne tehnike za sintetisanje fullerola i s obzirom na njih molekul koji nastaje ima jednstvene osobine. Neke od najučestalijih tehnika za sintetisanje fullerola su: oksidacija u veoma kiselim uslovima [Chiang et al, 1994; Vilen et al, 2006] i oksidacija u veoma baznim ili alkalnim uslovima [Husebo et al, 2004; Xiang et al, 2004]. Svaka tehnika stvara fullerol sa različitim brojem hidrksilnih grupa na kavezu. Iz ovoga sledi da nisu svi fulleroli isti. Broj hidroksilnih grupa može da varira od 10 do 36, u zavisnosti od procesa proizvodnje [Vilen et al, 2006], a

najinteresantniji za istraživanje su fulleroli sa 18 i 24 OH⁻ grupe. Ovaj broj OH⁻ grupa utiče na mnoge osobine, među kojima su naelektrisanje, hidrofobnost i stabilnost u rastvoru.

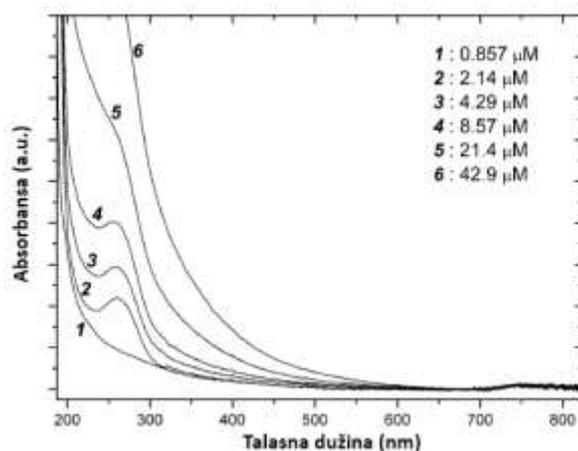
Fulleroli mogu biti izdvojeni iz nerastvorljivih C₆₀ korišćenjem metoda UV apsorpcije (UV-VIS), IR transmitanse ili adsorpcije, nuklearne magnetne rezonance (NMR) i spektroskopijske rezonance elektronskog spina (*electron spin resonance* - ESR). U spektru koji karakteriše fullerol u vodi pikovi su u oblasti od 200 do 400 nm i rašireni su, a talasne dužine su manje (pikovi 2 i 3) (slika 4.13). Jedini potpuno čist pik pojavljuje se na $\lambda = 232$ nm, a položaj svakog pika može da zavisi od tehnike sintetisanja fullerola.



Slika 4.13: Ultraljubičasti vidljivi (UV-VIS) spektar apsorpcije za čist fullerol C₆₀ i klastere fullerola u vodi. Spektar apsorpcije za fullerol pokazuje tri pika čistog fullerena koji postaju širi u rastvoru fullerola [Klaus, 2011].

Širina apsorpcionih pikova zavisi od formiranja klastera fullerola u vodi [Vileno, 2006]. UV-VIS analize vodenih rastvora koriste se da bi se odredila koncentracija fullerola u rastvoru korišćenjem Beer-Lambert-ovog zakona.

Na slici 4.14 prikazano je kako raste koncentracija fullerola, tj. vidi se širenje pikova u spektru fullerola. Ovo se dešava zbog saturacije (taloženja) rastvora, tj. kako raste koncentracija - C, raste i apsorbanza - A. Ipak, druga bitna karakteristika spektra je prisustvo, takođe, širokih pikova i u mikro-molarnim koncentracijama.

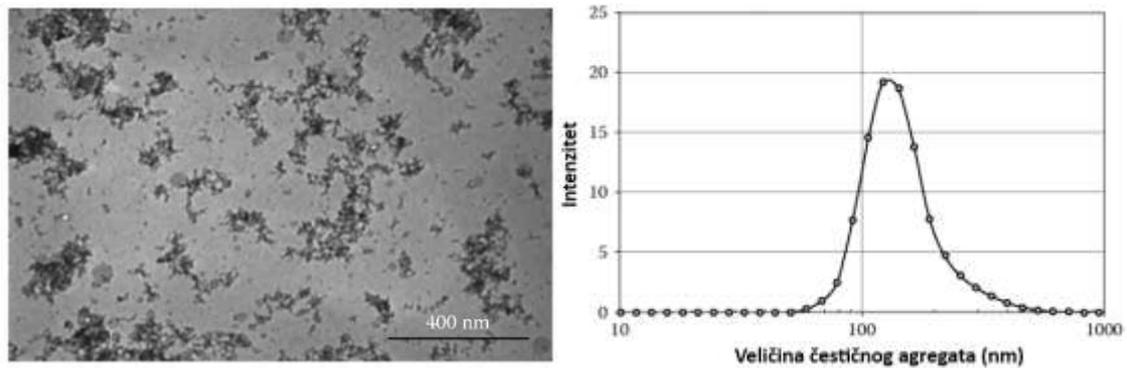


Slika 4.14: UV-VIS spektar apsorpcije različitih koncentracija fullerola u vodenim rastvorima [Vileno et al, 2006].

Fulerol je polukiseli molekul, gde svaki proton hidroksilne grupe (C-OH) može da se izdvoji u vodi i stvara spojenu bazu (C-O⁻) [Vileno et al, 2006]. Stvaran broj C-OH i C-O⁻ grupa po molekulu C₆₀ zavisi od pH vrednosti, jer hidroksilne grupe prolaze kroz procese protonacije i deprotonacije. Protonacija se odnosi na dodavanje protona (H⁺) na atom ili molekul, što je u ovom slučaju OH⁻ grupa vezana za molekul C₆₀. Tokom protonacije, masa molekula fullerola raste za 1,0079 g/mol, što predstavlja molekularnu masu jednog atoma vodonika. Deprotonacija se odnosi na uklanjanje protona (H⁺) iz molekula radi stvaranja spojene baze (-O⁻).

Klasteri fullerola

Primarna svrha derivatizacije fulerena C₆₀ i stvaranja fullerola je stvaranje relativno stabilnih vodenih rastvora. Fuleroli formiraju molekularne klustere koji formiraju lančane strukture sastavljene od višestrukih klastera vode (slika 4.15 levo). Posmatranjem rastvora fullerola korišćenjem dinamičkog rasejanja svetlosti vidi se da je raspodela veličina u stvari široka, što znači da formiraju polidisperzne rastvore (slika 4.15 desno). Iako su polidisperzni, glavna veličina klastera kreće se u opsegu između 100 i 200 nm [Brant et al, 2007]. U ovom opsegu, klasteri fullerola su klasifikovani kao mali koloidi i prave agregate.



Slika 4.15: Levo - slika dobijena transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM) klastera fullerola i amorfnih agregata u vodi. Desno – Distribucija po veličinama za određenu disperziju klastera fullerola u vodi [Vileno et al, 2006].

Klasteri fullerola formiraju velike, „labave“, amorfne skupine u vodi. Analizom klastera fullerola difrakcijom X-zraka pokazano je da je unutrašnja mreža fullerola potpuno amorfna. Formiranje klastera fullerola dešava se čak i pri mikromolarnim koncentracijama [Chiang et al, 1994] i relativno nezavisno od hemijskog stanja rastvora (pH, jačina jonskih veza) ili uslova okoline (temperatura) [Brant et al, 2007]. Dalje, formiranje klastera fullerola dešava se bez obzira na povećan broj hidroksilnih grupa u molekularnom kavezu [Klaus, 2011]. Mreža vodoničnih veza sa silama kohezije smeštena je unutar jezgra klastera, a odbojne, negativno naelektrisane grupe smeštene su na spoljašnjoj strani kaveza.

Pri izvođenju eksperimenata u ovoj disertaciji korišćen je fullerol čistoće 99,5 % (*MER Corporation, Tucson, Arizona, USA*).

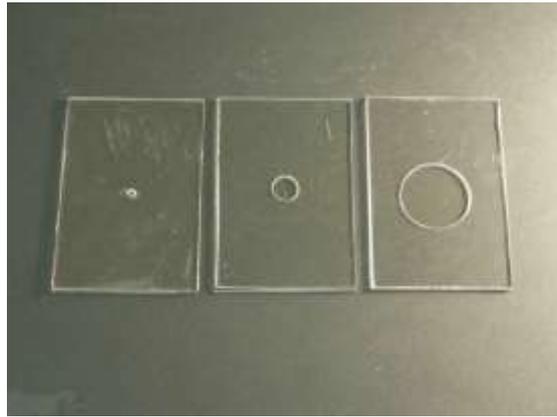
Ponašanje nanočestica u okviru biološke mikrosredine, stabilnost, vanćelijska i ćelijska distribucija zavise od njihove hemijske strukture, morfologije i veličine. Takođe, način njihovog unošenja u organizam je veoma značajan, pa tako mogu da se unose putem krvotoka – intravenski ili kroz kožu – subkutano [Ostiguy, 2008].

5. METODE I TEHNIKE ISTRAŽIVANJA

5.1 Osnove esperimenta

Komora

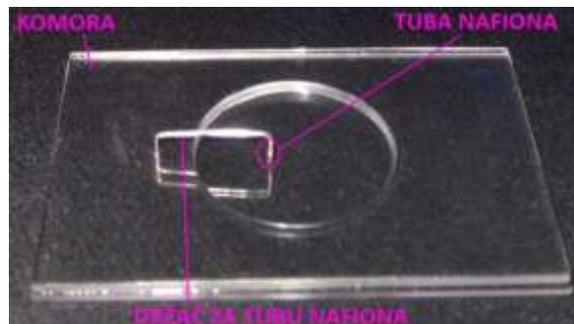
Za pravljenje komore potrebne za izvođenje eksperimenata nabavljene su jednostavne mikroskopske pločice (*Fisher Scientific, glass microscope slides, kategorija #12-544-1, 75 mm x 25 mm, debljine 2 mm*) u radionici Pollack Laboratory (University of Washington, Seattle). Plastični šablon je precizno konstruisan da bi bili isečeni identični delovi, a pločice su isečene na odgovarajuće dimenzije sa dijamantskim nožem za staklo. Na pet različitih pločica je uz pomoć mini obradnog centra izbušeno pet kružnih rupa prečnika 3 mm, 9 mm, 27 mm, 31 mm i 36 mm. Visina svih komora je 2 mm. Dno komore je tanka staklena pločica debljine 1 mm (*VWR, no. 1 micro cover glass, category #48382-126*). Upotrebom tankog stakla je povećana prostorna rezolucija i takođe omogućena bolja osvetljenost uzorka. Za povezivanje pločica korišćen je UV lepak (*Norland Optical Adhesive, #72*). Lepljenje svake komore je trajalo 24 h. Lepak koji je bio višak je sastrugan uz pomoć skalpela pod mikroskopom sa uvećanjem 2x. Ceo sklop je zatim detaljno ispran ultračistom, dejonizovanom vodom (*Barnstead, NANOpure Diamond Analytical ultrapure water system, model #D11901*) i osušen vazduhom pod pritiskom. Nakon svakog eksperimeta, komore su detaljno ispirane dejonizovanom vodom i sušene vazduhom pod pritiskom. Komore su punjene različitim rastvorima različite koncentracije sa 12 μ l (3 mm), 100 μ l (9 mm), 7 ml (27 mm), 10 ml (31 mm) i 14 ml (36 mm) i nivo tečnosti je bio \approx 1-1.5 mm. Visina korita je uticala na to da ne dođe do isticanja tečnosti i kapilarne akcije na tubi nafiona, što je značajno uticalo na optičku rezoluciju i vizuelizaciju, jer je senka u toku snimanja bila umanjena.



Slika 5.1: Komore sa otvorima prečnika 3 mm, 9 mm i 27 mm, respektivno (napravljene u Pollack Laboratory, University of Washington, Seattle).

Držać za tubu Nafiona

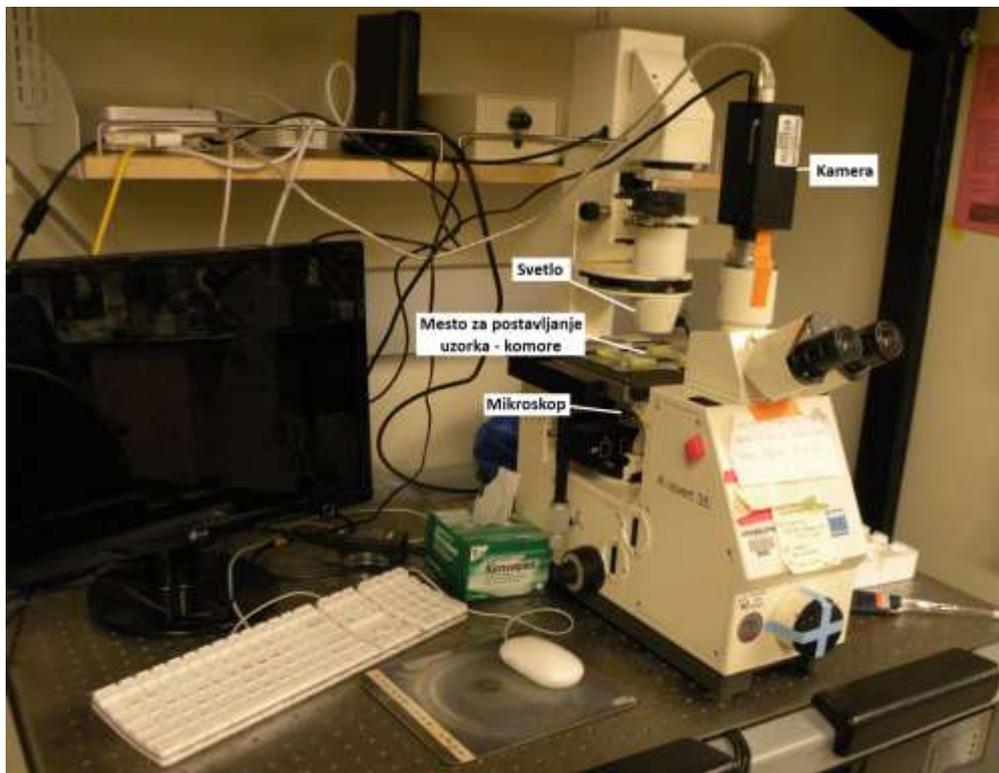
Tube nafiona (korišćene u 3 eksperimenta) koje utiču na stvaranje ekskluzivnih zona sečene su finim sklapelom na visinu od 2-3 mm pod mikroskopom sa uvećanjem 2x. Vertikalno postavljene tube su držane jednostavnom, pod pravim uglom savijenom žicom, koja je umetnuta u rupicu izbušenu na gornjem delu komore. Sve korišćene žice su bile od platine sa prečnikom koji je odgovarao unutrašnjem prečniku tube nafiona. Žice od platine su izabrane kako bi se umanjila mogućnost rđanja (korozijske) i površinskih reakcija sa tečnostima-rastvorima koji su sipani u komoru radi vršenja eksperimenta. Postolje je držalo tubu nepomično u jednoj poziciji tokom svakog eksperimenta. Svaki eksperiment za svaki rastvor, koncentraciju i komoru ponovljen je pet puta i svaki put je korišćena nova tuba.



Slika 5.2: Žica savijena pod pravim uglom sa tubom nafiona na kraju.

Slikanje i snimanje

Slikanje uzoraka i snimanje eksperimenata izvođeno je svetlosnom mikroskopijom svetlog polja (*bright field light microscopy*) sa objektivom uvećanja 2,5 x na invertorskom mikroskopu (*Axiovert 35, Zeiss, Inc.*). Video zapisi i slike stvaranja ekskluzivnih zona napravljeni su CCD kamera sistemom (*Color Digital Camera #CFW-1312C, Scion Corporation*) i analizirane programom ImageJ (*v1.46f, NIH*). Nakon kalibrisanja kamere, merenje veličine ekskluzivnih zona vršeno je merenjem veličina 5 različitih debljina EZ i usrednjavanjem vrednosti. Dobijanjem srednje vrednosti za eksperimente redukovana je mogućnost postojanja greške nastale pri merenju i povećan je statistički značaj.



Slika 5.3: Aparatura za izvođenje eksperimenata (Pollack Laboratory, mikroskop Axiovert 35, Zeiss, uvećanje sočiva 2,5x).

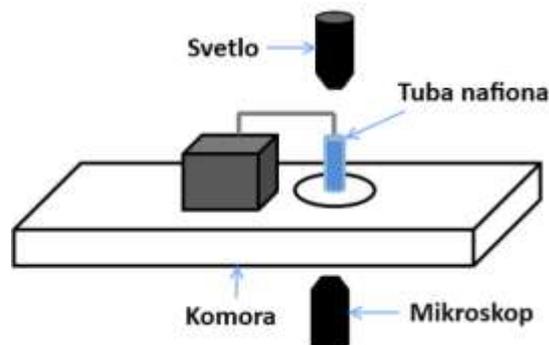
5.2 Postavke eksperimentalnih istraživanja

U disertaciji vršena su 4 tipa eksperimenata u kojima je istraživano ponašanje vode, tj. ekskluzivne zone, njena veličina i ponašanje s obzirom na različite koncentracije različitih rastvora i veličina komora:

1. rastvori dejonizovane vode sa mikrosferama
2. rastvori hidrogenizovanog nanomaterijala fullerola sa mikrosferama u dejonizovanoj vodi
3. biomolekul kolagen u različitim koncentracijama i oblicima sa mikrosferama u dejonizovanoj vodi
4. kontaktna sočiva sa rastvorima dejonizovane vode sa mikrosferama i rastvorima za sočiva sa mikrosferama u dejonizovanoj vodi.

Eksperiment 1 – Ispitivanje rastvora dejonizovane vode sa mikrosferama

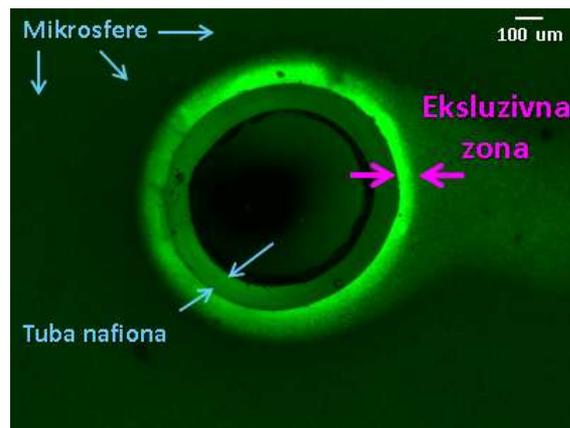
Za potrebe izvođenja eksperimenta napravljeni su rastvori dejonizovane vode sa karboksilatnim mikrosferama prečnika 1 μm u četiri različite koncentracijame: 1:25, 1:50, 1:100 i 1:500, po zapremini. Rastvori su sipani u pet različitih komora sa rupama prečnika 3mm, 9mm, 27mm, 31mm i 36mm. U svakoj komori tuba nafiona TT-030 bila je vertikalno postavljena (slika 5.4). Pri svakom ponavljanju eksperimenta (pet puta) sečena je nova tuba, a svaka komora je ispirana sa dejonizovanom vodom. Reakcija između hidrofobno-hidrofilnog nafiona i hidrofilnih mikrosfera dovela je do struktuiranja vode i stvaranja ekskluzivne zone.



Slika 5.4: Šematski prikaz postavke eksperimenta.

Slike i video zapisi su pravljene u tri vremenska intervala u odnosu na trenutak sipanja rastvora u komore: 10min, 15min, 20min.

Punu veličinu EZ dostiže nakon 7 min po sipanju rastvora u komoru.



Slika 5.5: Primer mikroskopskog prikaza ekskluzivne zone kod vodenog rastvora sa mikrosferama uz prisustvo tube nafiona uz uvećanje 2,5x (unutrašnji d = 635 μm , a spoljašnji d = 830 μm , debljina zida tube = 97.5 μm).

Eksperiment 2 – Ispitivanje rastvora hidrogenizovanog nanomaterijala fullerola sa mikrosferama u dejonizovanoj vodi

Za izvođenje eksperimenta prvo je napravljen vodeni rastvor fullerola koncentracije 1 μM . U taj rastvor dodate su karboksilatne mikrosfere prečnika 1 μm i napravljeni rastvori u tri različite koncentracije: 1:25, 1:100 i 1:500, po zapremini. Rastvori su sipani u komoru sa rupom prečnika 27 mm u kojoj je vertikalno postavljena tuba nafiona TT-030. Pri svakom ponavljanju eksperimenta (pet puta) sečena je nova tuba, a komora je ispirana dejonizovanom vodom. Reakcija između nafiona i mikrosfera u vodenom rastvoru fullerola dovela je do stvaranja, struktuiranja vode i pojave ekskluzivne zone. Zbog velike koncentrisanosti mikrosfera u rastvoru koncentracije 1:25, pretpostavlja se da je formiranje EZ pod dodatnim uticajem sila koje deluju među zgusnutim mikrosferama, pa ta koncentracija nije najmerodavnija za ispitivanja načina struktuiranja slojeva tečnosti.

Slikanje eksperimenta i video zapisi pravljene su u tri vremenska intervala u odnosu na trenutak sipanja rastvora u komore: 10 min, 15 min, 20 min.

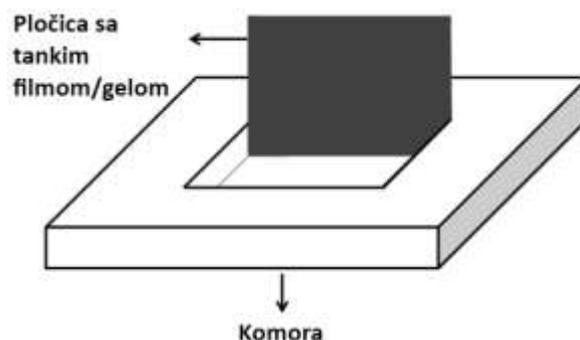
Punu veličinu EZ dostiže nakon 5 min po sipanju rastvora u komoru.

Eksperiment 3 – Ispitivanje biomolekula kolagena tipa I u različitim koncentracijama i oblicima sa mikrosferama u dejonizovanoj vodi

U ovom eksperimentu korišćene su dva vrste kolagena tipa I:

1. Liofilizovan kolagen tipa I (teleća koža) (*Sigma Aldrich, St Louis, MO*)
2. Tečni kolagen tipa I (rep pacova) (*BD Biosciences, cat.no. 354236*)

Za izvođenje eksperimenta korišćena je komora sa rupom prečnika 27 mm, napravljena prethodno opisanim postupkom.



Slika 5.6: Šematski prikaz postavke eksperimenta.

Eksperimenti u kojima je korišćen kolagen iz repa pacova rađen je na više različitih načina u cilju postizanja optimalnih uslova i koncentracija pri kojima će doći do stvaranja ekskluzivne zone. Kolagen je po protokolu pripremljen za izvođenje eksperimenata uz korišćenje 0,02 N acetatne kiseline. Sprovedeni su sledeći eksperimenti:

1. Rastvor kolagena sipan je u komoru sa tubom nafiona.
2. Pločica je premazana tankim slojem kolagena, postavljena je u komoru i dodat je rastvor dejonizovane vode sa mikrosferama u koncentraciji 1:25.
3. Pločica premazana gelom kolagena, dobijenim iz rastvora napravljenog po protokolu za izvođenje eksperimenata postavljena je u komoru i sipan je rastvor dejonizovane vode sa mikrosferama u koncentraciji 1:500.

Pri eksperimentima u kojima je korišćen kolagen iz teleće kože postupano je na isti način. Isprobavane su različite koncentracije i načini pripremanja kolagena.

1. Rastvor kolagena je sipan u komoru gde je postavljena tuba nafiona u jednom eksperimentu, i gde je postavljen list nafiona u drugom eksperimentu.
2. Rastvor kolagena u koje su dodate mikrosfere i dobijen rastvor koncentracije 1:500, po zapremini, sipan u komoru sa tubom nafiona.
3. Pločica je premazana sa gelom kolagena, sipan je rastvor dejonizovane vode vode sa mikrosferama u koncentraciji 1:500.
4. Pločica je premazana sa gelom kolagena, dobijenim iz rastvora po protokolu za izvođenje eksperimenata
[<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/collagen-product-protocols.html>], i sipan je rastvor fulerola sa mikrosferama u koncentraciji 1:500.
5. Ista vrsta gela postavljena je u komoru bez pločice, sipan rastvor dejonizovane vode sa mikrosferama u jednom eksperimentu, kao i rastvor fulerola sa mikrosferama u koncentraciji 1:500 u drugom eksperimentu.

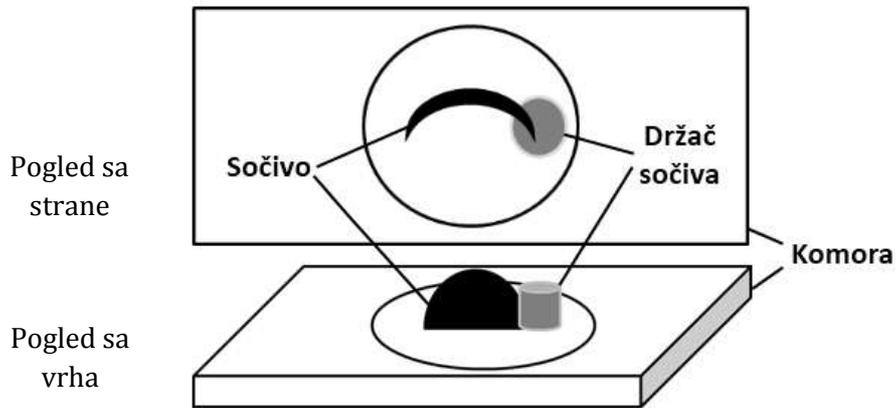
Eksperiment 4 – Ispitivanje kontaktnih sočiva sa rastvorima dejonizovane vode sa mikrosferama i rastvorima za sočiva sa mikrosferama

U eksperimentu su korišćene tri vrste RGP kontaktnih sočiva:

1. Europerm 30 Blue
2. SP-40
3. SP-40 + C₆₀(OH)₂₄

Za izvođenje eksperimenata napravljene su dve vrste rastvora. Za jedan eksperiment napravljen je rastvor dejonizovane vode sa dodatim mikrosferama prečnika 1 μm. Za drugi eksperiment napravljen je rastvor u kome je upotrebljen rastvor za sočiva sa mikrosferama istog prečnika. Oba rastvora su napravljena u tri različite koncentracije: 1:25, 1:100 i 1:500, po zapremini. Svako sočivo je isečeno finim skalpelom po sredini. Rastvori su sipani u komoru sa sočivom koje je postavljeno vertikalno. Reakcija između mikrosfera u oba rastvora i sve tri vrste sočiva dovela je do struktuiranja vode i stvaranja ekskluzivne zone.

Za eksperiment sa rastvorom dejonizovane vode i mikrosfera slike i video zapisi su pravljani 10 minuta nakon sipanja rastvora u komoru, a za eksperiment sa rastvorom sočiva i mikrosferama nakon 5 minuta. Svaki eksperiment je ponovljen 5 puta.



Slika 5.7: Šematski prikaz postavke eksperimenta.

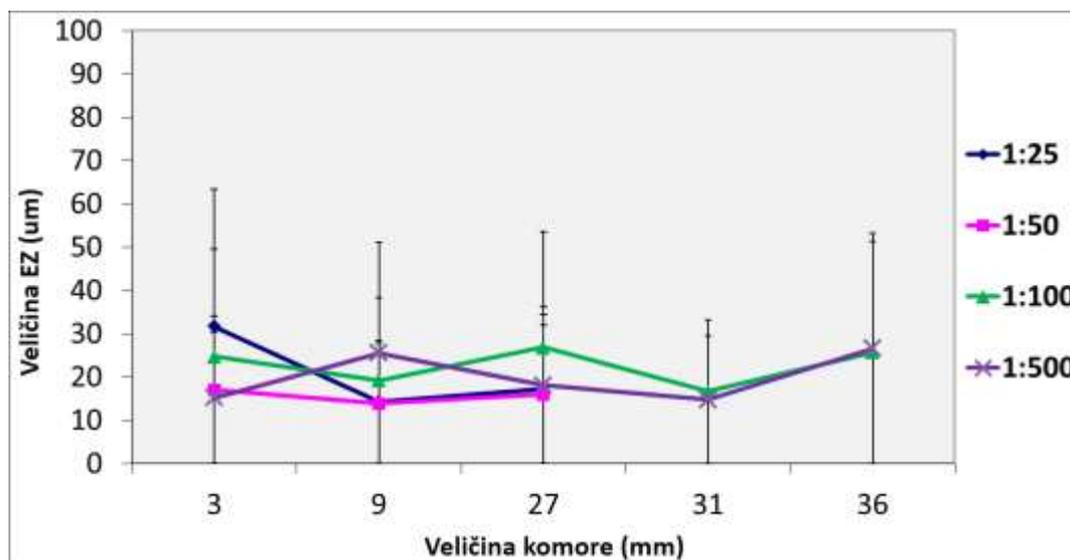
6. REZULTATI

6.1 Rezultati istraživanja interakcije dejonizovane vode sa hidrofobnim i hidrofilnim materijalima

Hidrofobni materijal nafion i hidrofilne mikrosfere korišćeni su u ovom eksperimentu (poglavlje 5. Metode i tehnike istraživanja).

Rezultati su posmatrani sa dva aspekta:

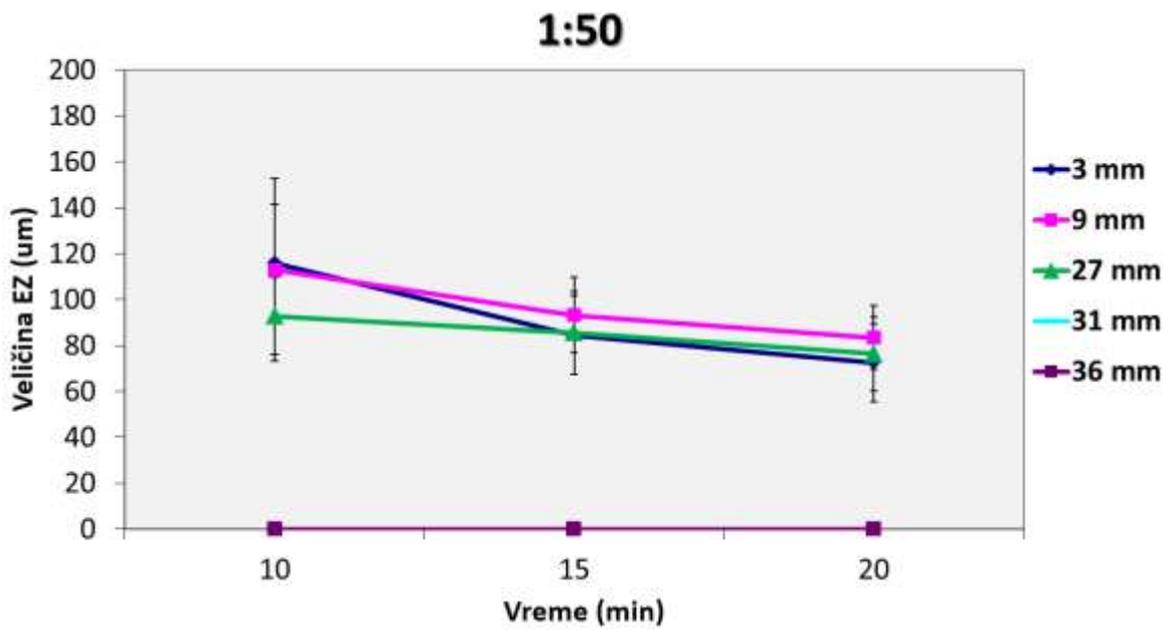
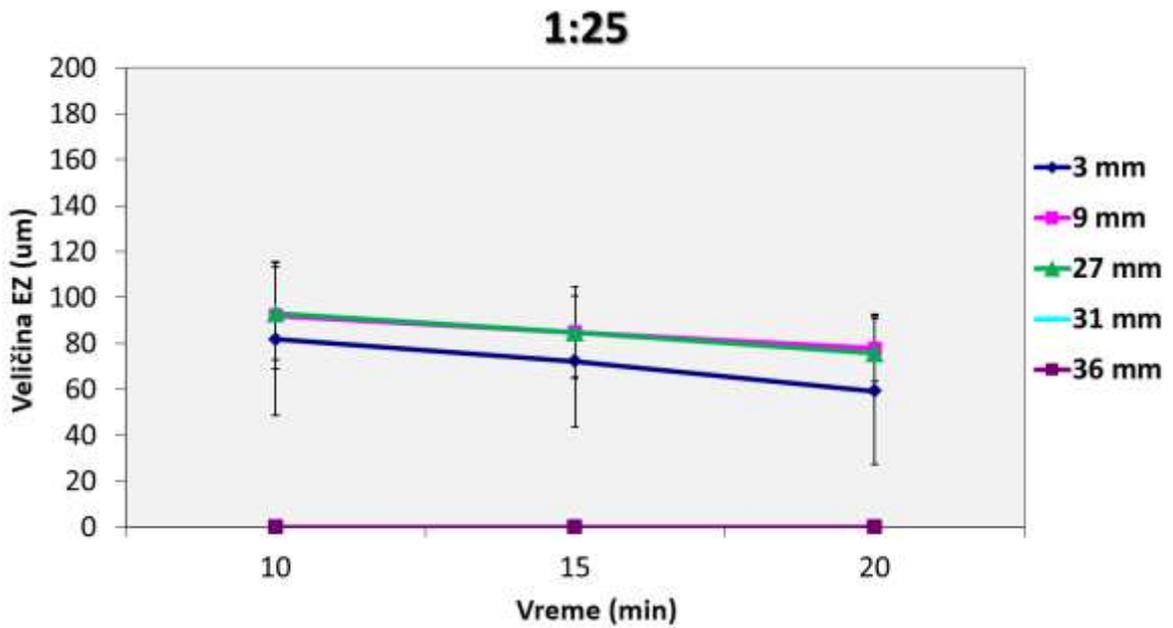
1. Ukupna zavisnost veličine EZ u odnosu na veličinu komore i koncentraciju rastvora:

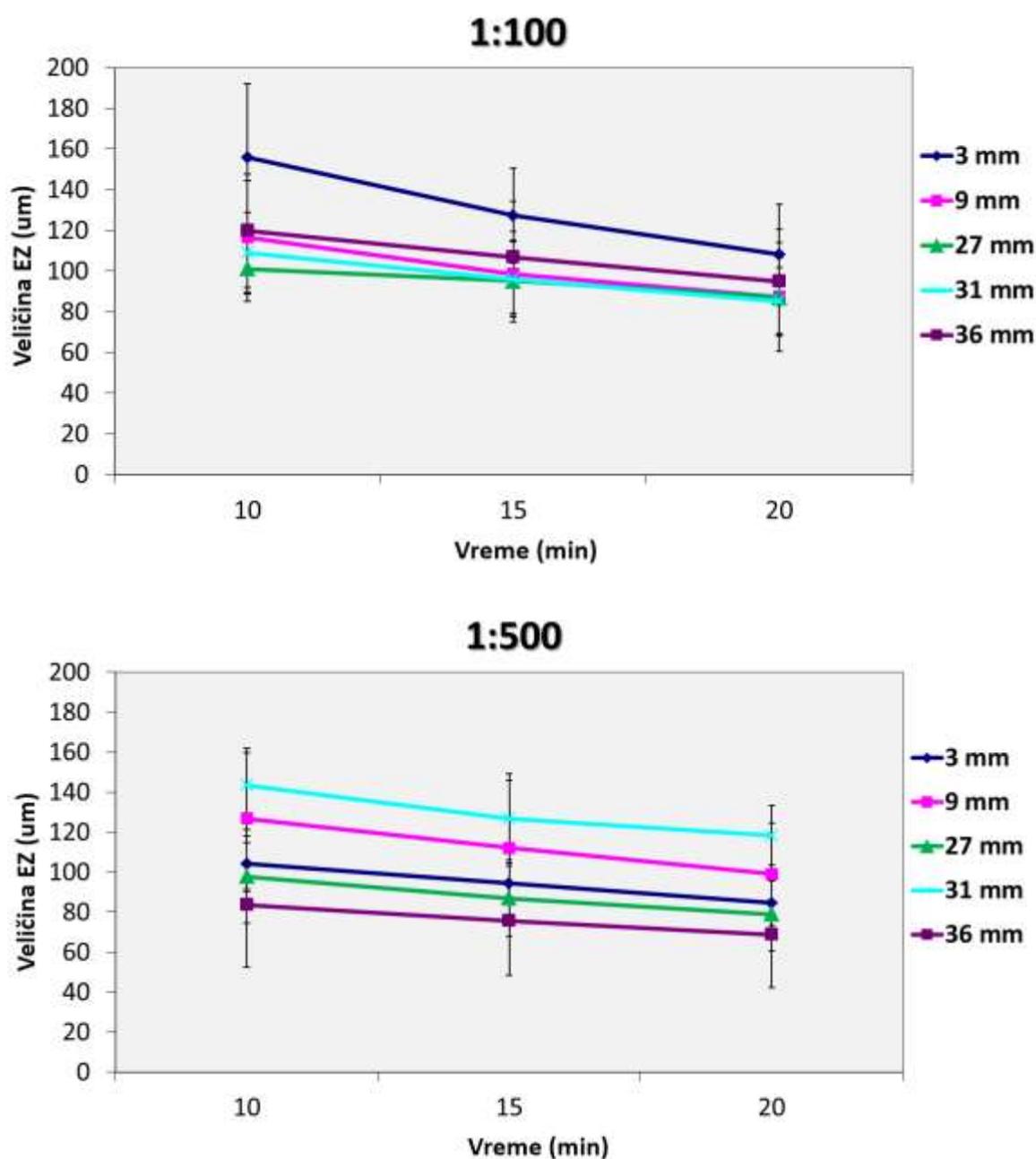


Slika 6.1: Dijagram pokazuje zavisnost veličine ekkluzivne zone u odnosu na veličinu komore i koncentraciju rastvora.

Kada se veličina EZ posmatra u odnosu na veličinu komore i koncentraciju rastvora, ne postoji zavisnost niti trend ponašanja veličina ekkluzivnih zona u odnosu na menjanje veličine komore. Takođe, ni koncentracija rastvora nije uticala na formiranje trenda.

2. Zavisnost veličine EZ u odnosu na koncentraciju rastvora i vreme slikanja

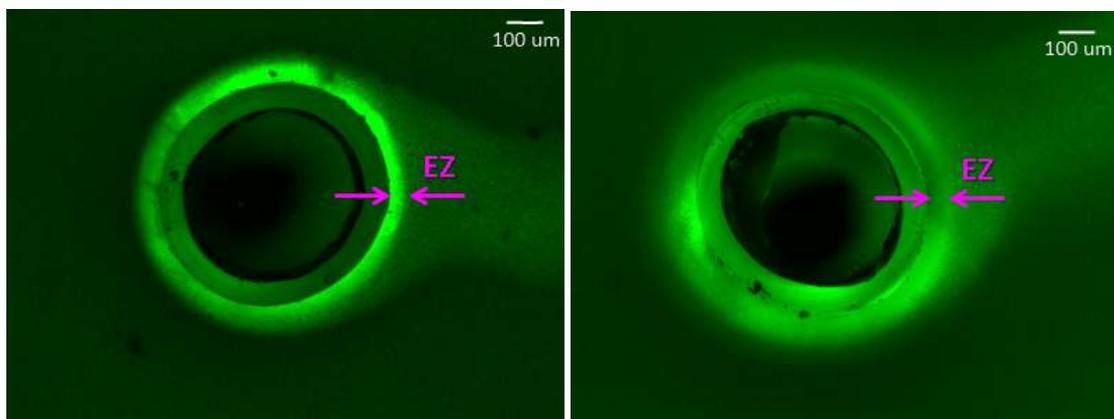




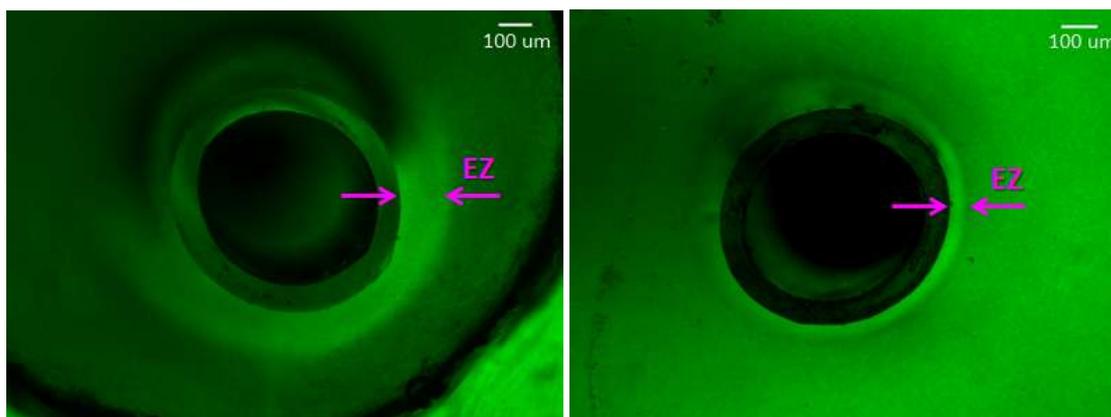
Slika 6.2: Dijagrami pokazuju zavisnost veličine ekskluzivne zone u odnosu na koncentraciju i vreme.

Kada se veličina EZ posmatra u odnosu na koncentraciju i vreme, ni veličina komore, ni koncentracija ne utiču bitno na veličinu EZ. Posmatranjem dijagrama (slika 6.2) može se zaključiti da u rastvorima manje koncentracije, veličina EZ je velika u svim komorama. Veličine EZ kreću se u opsegu od 57 do 97 μm pri koncentraciji 1:25, od 70 do 119 μm pri koncentraciji 1:50, 82 do 157 μm pri koncentraciji 1:100 i 63 do 142 μm pri koncentraciji 1:500. Primećuje se da je EZ

najveća pri koncentraciji 1:100. Tokom vremena, u svim komorama, veličina EZ se smanjuje.



Slika 6.3a: Eksluzivna zona kod rastvora dejonizovane vode sa mikrosferama koncentracije 1:25 u komori 27 mm (levo) i koncentracije 1:50 u komori 9 mm (desno).



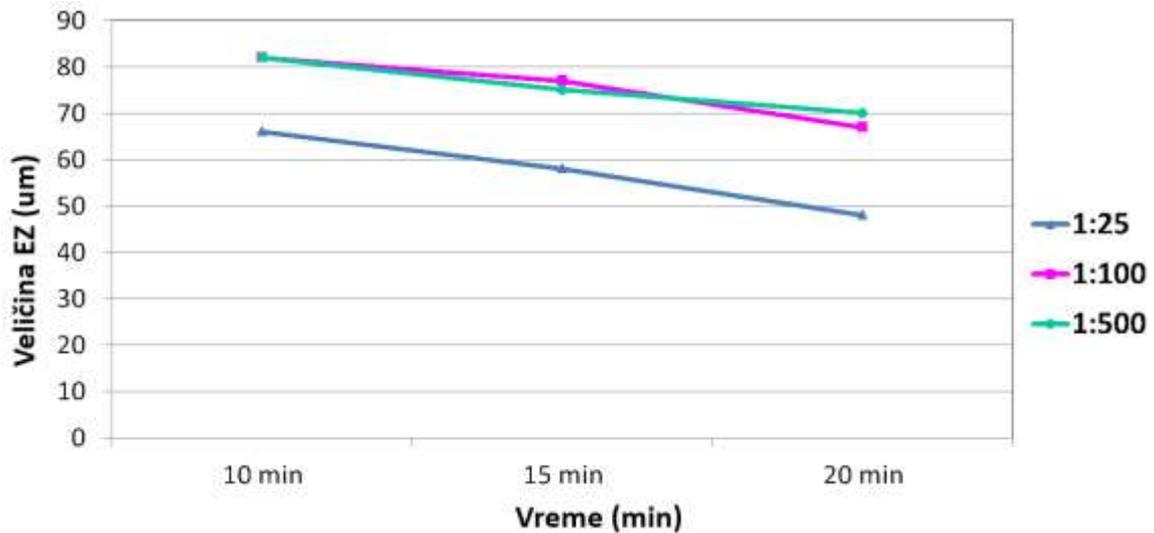
Slika 6.3b: Eksluzivna zona kod rastvora dejonizovane vode sa mikrosferama koncentracije 1:100 u komori 3 mm (levo) i koncentracije 1:500 u komori 36 mm (desno).

6.2 Rezultati istraživanja interakcije dejonizovane vode sa hidrogenizovanim ugljeničnim nanomaterijalom (fulerolom)

Tabela 6.1: Prikaz srednjih vrednosti merenja veličine eksluzivnih zona sa napravljenih slika, korišćenjem programa ImageJ.

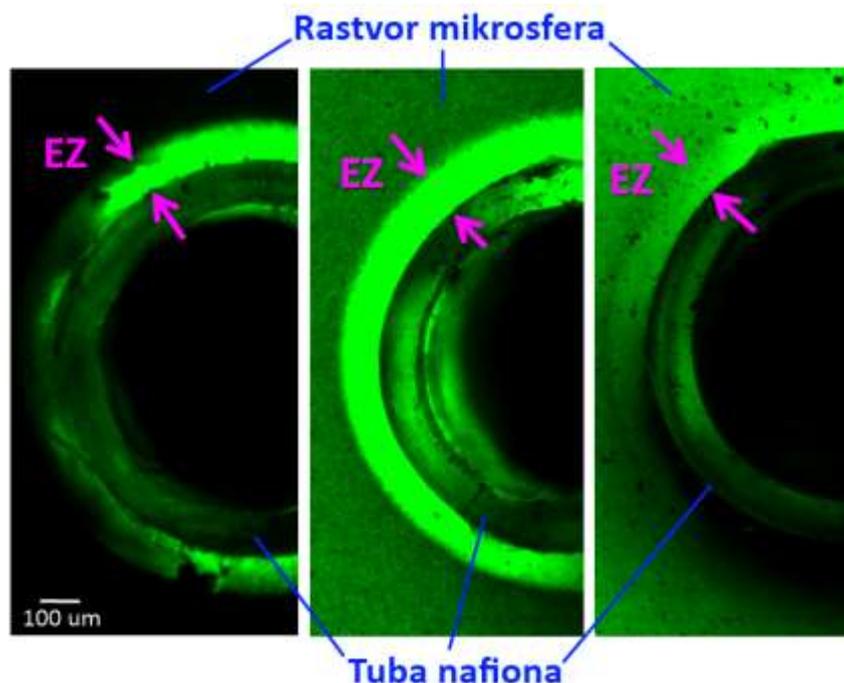
| | | Koncentracije mikrosfera u rastvoru | | |
|------------------------|--------|-------------------------------------|-------|-------|
| | | 1:25 | 1:100 | 1:500 |
| Vreme pravljenja slika | 10 min | 66 | 82 | 82 |
| | 15 min | 58 | 77 | 75 |
| | 20 min | 48 | 67 | 70 |

Rezultati su posmatrani kroz zavisnost veličine EZ u odnosu na koncentraciju mikrosfera u rastvoru po zapremini i vreme.



Slika 6.4: Dijagram pokazuje zavisnost veličine ekskluzivne zone u odnosu na koncentraciju mikrosfera u rastvoru i vreme.

Kada se veličina ekluzivne zone posmatra tokom vremena, u svim komorama, uočava se trend smanjenja veličine EZ. Do formiranja EZ dolazi brzo i zadržava oštar oblik tokom vremena.



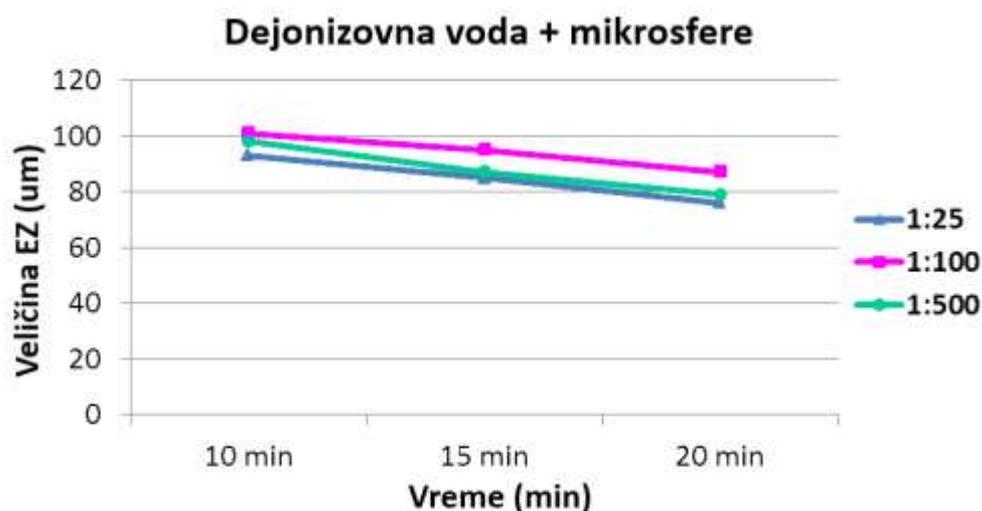
Slika 6.5: Ekskluzivna zona kod rastvora fullerola sa mikrosferama koncentracije 1:25 (levo), 1:100 (sredina) i 1:500 (desno).

Poređenje između eksperimenta 1 i 2

Tabela 6.2: Prikaz srednjih vrednosti merenja veličine ekskluzivnih zona sa napravljenih slika, korišćenjem programa ImageJ.

| Rastvor dejonizovane vode sa mikrosferama | | Koncentracije | | |
|---|--------|---------------|-------|-------|
| | | 1:25 | 1:100 | 1:500 |
| Vreme pravljenja slika | 10 min | 93 | 101 | 98 |
| | 15 min | 85 | 95 | 87 |
| | 20 min | 76 | 87 | 79 |

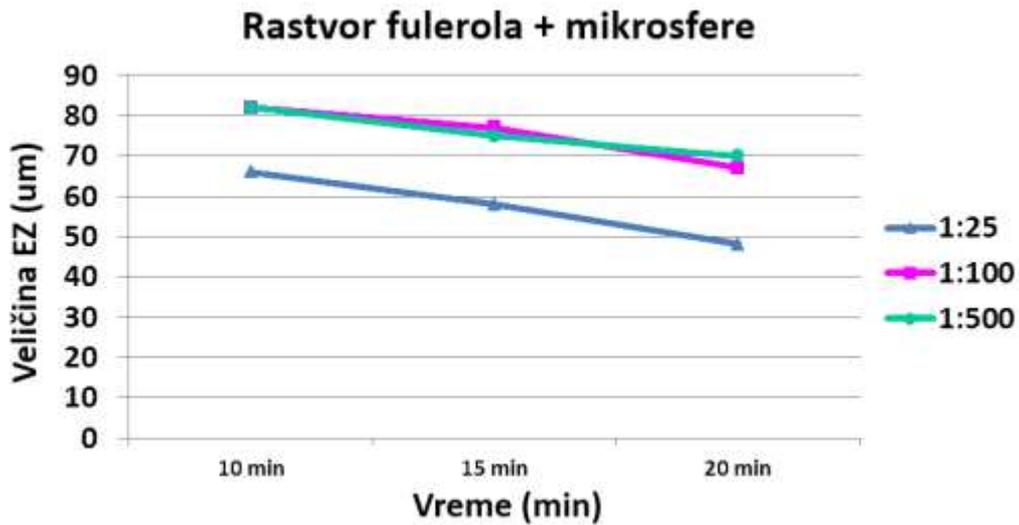
Rezultati su posmatrani kroz zavisnost veličine EZ u odnosu na koncentraciju i vreme.



Slika 6.6: Dijagram pokazuje zavisnost veličine ekskluzivne zone u odnosu na koncentraciju i vreme u rastvoru dejonizovane vode sa mikrosferama.

Tabela 6.3: Prikaz srednjih vrednosti merenja veličine ekskluzivnih zona sa napravljenih slika, korišćenjem programa ImageJ.

| Rastvor fullerola sa mikrosferama | | Koncentracije | | |
|-----------------------------------|--------|---------------|-------|-------|
| | | 1:25 | 1:100 | 1:500 |
| Vreme pravljenja slika | 10 min | 66 | 82 | 82 |
| | 15 min | 58 | 77 | 75 |
| | 20 min | 48 | 67 | 70 |

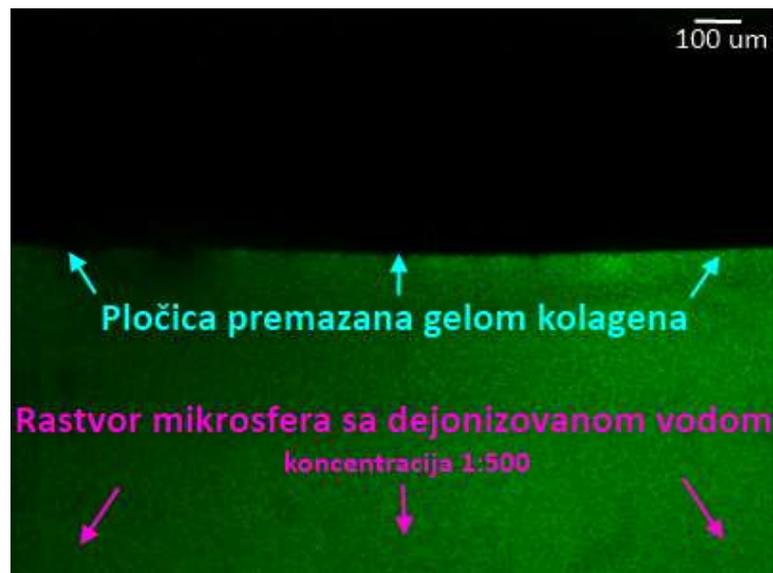


Slika 6.7: Dijagram pokazuje zavisnost veličine ekskluzivne zone u odnosu na koncentraciju i vreme u vodenom rastvoru fullerola sa mikrosferama.

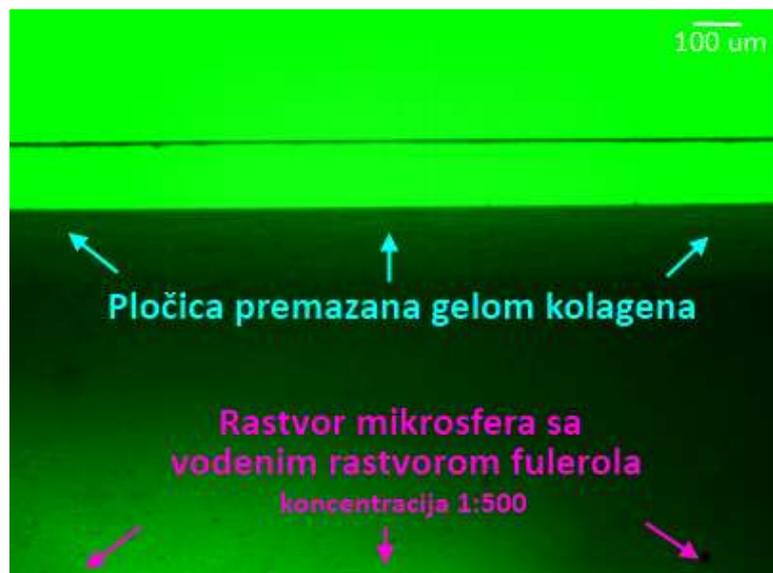
Veličina ekskluzivne zone značajno je manja u vodenim rastvorima fullerola sa mikrosferama, u odnosu na veličine u rastvorima dejonizovane vode sa mikrosferama. Najmanje veličine su primećene pri koncentracijama 1:25 za obe vrste rastvora, ali su veličine različite od rastvora do rastvora. Kada se ponašanje EZ posmatra tokom vremena, u svim komorama, uočava se trend smanjenja veličine.

6.3 Rezultati istraživanja interakcije dejonizovane vode sa biomolekulima

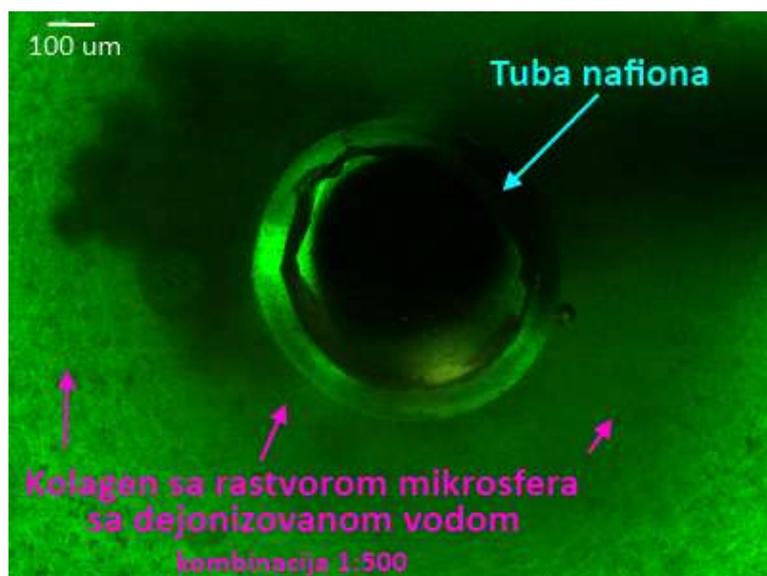
Bez obzira na različita porekla iste grupe kolagena, ispoštovanih protokola za spremanje uzoraka, menjanje koncentracija, menjanje načina priprema, ekskluzivna zona se nije formirala ni u jednom od pokušaja.



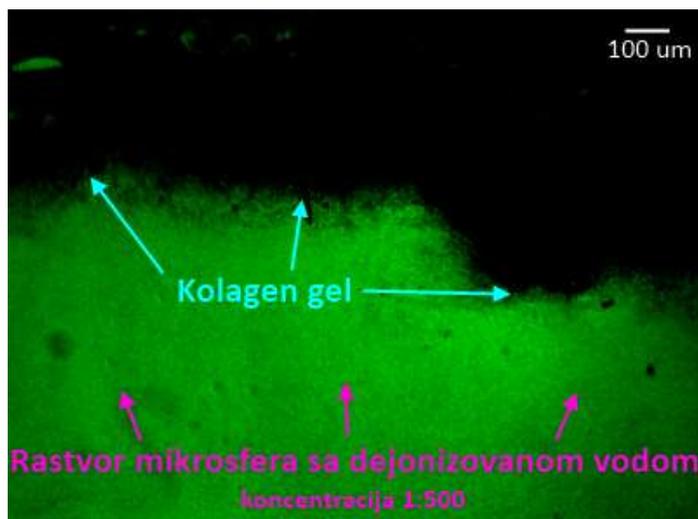
Slika 6.8a: Mikroskopski prikaz - kolagen (gel-rep pacova 3.44 mg/ml) + 1 μm MS (1:500).



Slika 6.8b: Mikroskopski prikaz - kolagen (50 mM) + 1 μm MS (1-500) + fullerol.



Slika 6.8c: Mikroskopski prikaz - kolagen (50 mM) + 1 μm MS (1-500) + tuba nafiona.



Slika 6.8d: Mikroskopski prikaz - kolagen (teleća koža) + 1 μm MS (1-500).

Postoji mogućnost da su potrebne veće koncentracije, ili drugačiji način pripremanja uzoraka. Takođe, metoda posmatranja tokom ispitivanja može biti od velike važnosti jer je senzitivnost metode vrlo značajna za dobijanje verodostojnih rezultata.

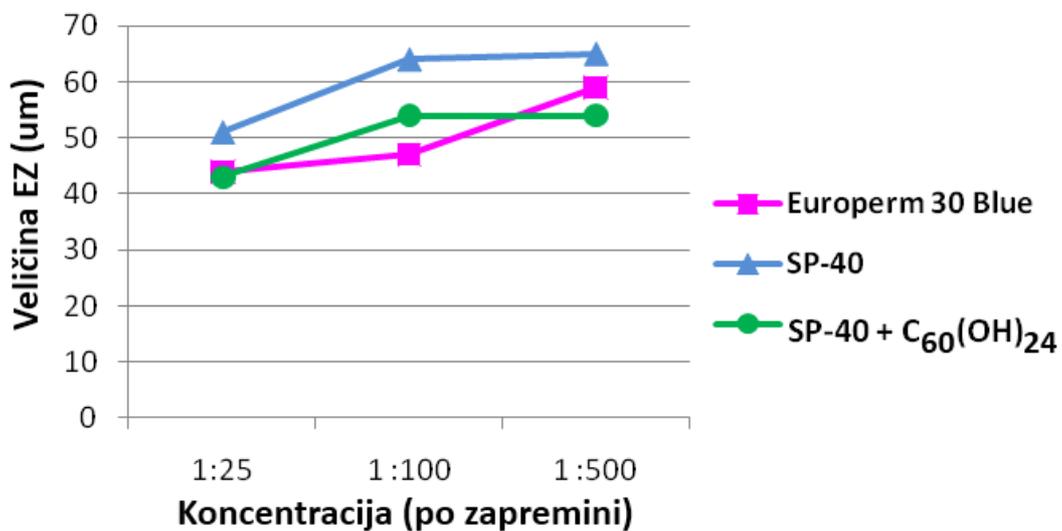
6.4 Rezultati istraživanja interakcije sočiva sa hidrofilnim materijalom

Kontaktna sočiva sa vodenim rastvorom mikrosfera

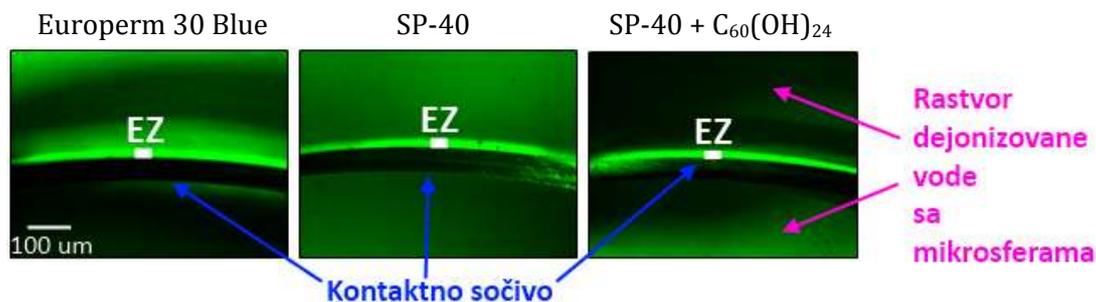
Nakon sipanja rastvora u komoru pored sočiva u svim eksperimentima mikrosfere su se rasporedile neuniformno. Dalje od sočiva distribucija je bila uniformnija.

Tabela 6.4: Prosečne veličine ekskluzivnih zona u μm u rastvoru dejonizovane vode sa mikrosferama za različite tipove kontaktnih sočiva.

| Dejonizovana voda + mikrosfere | | Koncentracije | | |
|--------------------------------|---|---------------|-------|-------|
| | | 1:25 | 1:100 | 1:500 |
| Tip kontaktnog sočiva | Euoperm 30 Blue | 44 | 47 | 59 |
| | SP-40 | 51 | 64 | 65 |
| | SP-40 + $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ | 43 | 54 | 54 |



Slika 6.9: Dijagram pokazuje zavisnost veličine ekskluzivne zone u odnosu na koncentracije rastvora dejonizovane vode sa mikrosferama i tipove kontaktnih sočiva.



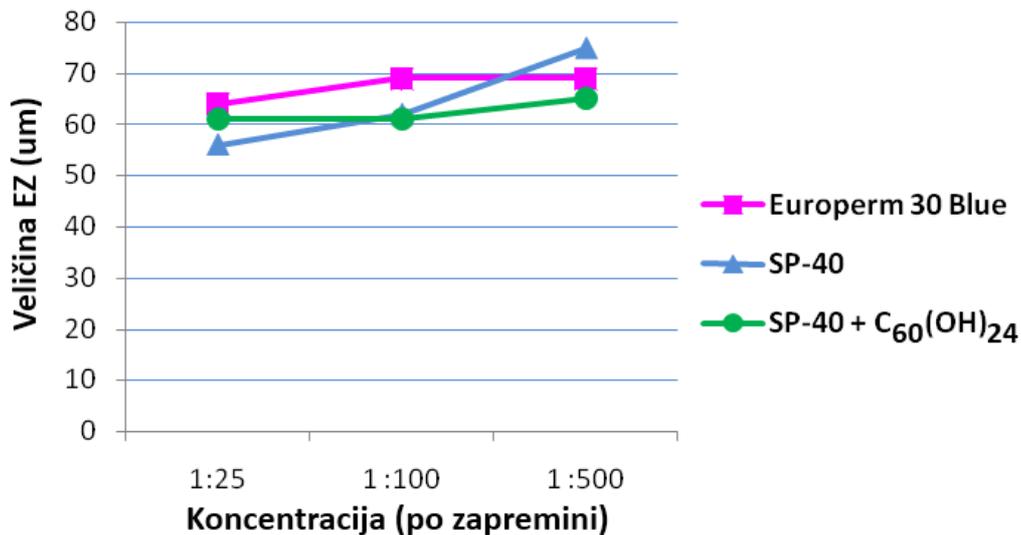
Slika 6.10: Mikroskopski prikaz – kontaktna sočiva u rastvoru deionizovane vode sa mikrosferama.

Fenomen ekskluzivne zone pojavio se na spoljašnjoj strani kontaktnih sočiva. Slikanje je vršeno 10 minuta nakon sipanja rastvora u komoru pored sočiva, kada je ekskluzivna zona dostigla svoju konačnu veličinu. Nakon 20 minuta, mikrosfere su počele da ulaze u prostor ekskluzivne zone i da je narušavaju. Ispoljeno ponašanje EZ je paralelno ponašanju pri interakciji mateijala nafiona i rastvora deionizovane vode sa mikrosferama.

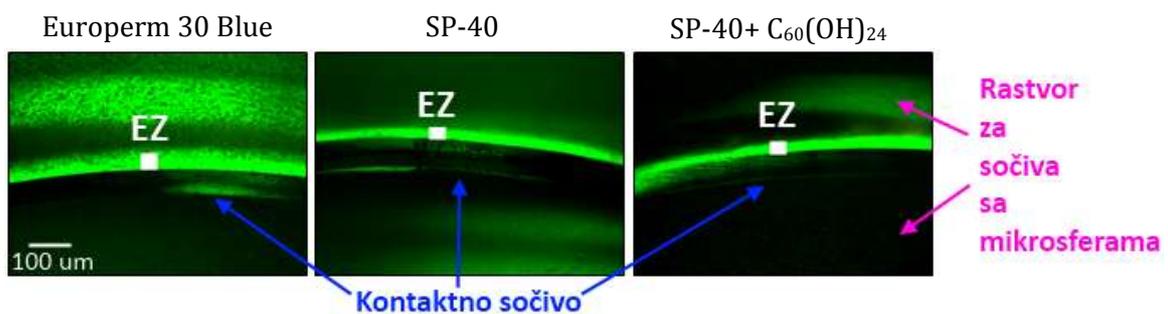
Kontaktna sočiva sa rastvorom za sočiva i mikrosferama

Tabela 6.5: Prosečne veličine ekskluzivnih zona u μm u rastvoru za sočiva sa mikrosferma za različite tipove kontaktnih sočiva.

| Rastvor za sočiva + mikrosfere | | Koncentracije | | |
|--------------------------------|---|---------------|-------|-------|
| | | 1:25 | 1:100 | 1:500 |
| Tip kontaktnog sočiva | Europerm 30 Blue | 64 | 69 | 69 |
| | SP-40 | 56 | 62 | 75 |
| | SP-40 + $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ | 61 | 61 | 65 |



Slika 6.11: Dijagram pokazuje zavisnost veličine ekskluzivne zone u odnosu na koncentracije rastvora za sočiva sa mikrosferama i tipove kontaktnih sočiva.



Slika 6.12: Mikroskopski prikaz – kontaktna sočiva u rastvoru za sočiva uz dodate mikrosfere.

U slučaju rastvora za sočiva sa mikrosferama isključenje mikrosfera i formiranje ekskluzivne zone bilo je nestabilno. Ekskluzivna zona je čista, ali je rastvor u ostatku ispitivanog uzorka bio veoma nestabilan. Zbog nestabilnosti rastvora slikanje je vršeno pet minuta nakon sipanja rastvora u komoru, budući da je nakon tog vremena dolazilo do ubrzanog narušavanja ekskluzivne zone. Prepostavlja se da hemijska reakcija koja se dešava između rastvora za sočiva i mikrosfera dovodi do nestabilnosti rastvora i utiče na nestabilnost i dugotrajnost struktuiranja. Veća koncentracija (1:25) je uticala na bolju definisanost i oštrinu ekskluzivne zone, što je logično zbog međusobnih sila nagomilanih mikrosfera.

U oba eksperimenta ne postoji značajna razlika između veličina ekskluzivne zone u zavisnosti od tipa materijala sočiva, kao ni koncentracije. Nanomaterijal fullerol inkorporiran u sočiva nije uticao na drugačije osobine isključenja mikrosfera, kao ni drugačiji nastanak ekskluzivnih zona. Jasna ekskluzivna zona pratila je spoljašnji deo kontaktnih sočiva, ne celom dužinom.



Slika 6.13: Pozicija pojavljivanja ekskluzivne zone na sočivima.

7. DISKUSIJA

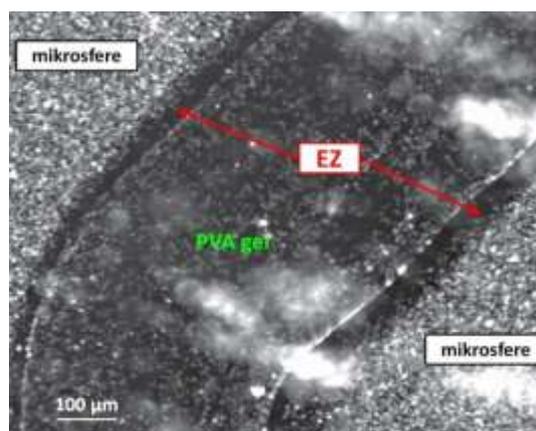
7.1. Diskusija rezultata ispitivanja interakcije vode sa hidrofobnim i hidrofilnim materijalima

Nazavisno od razmatranja „nemešanih“ slojeva čiste vode, studije o fizičkom ponašanju zona vode u blizini različitih hidrofilnih površina počele su pre nekoliko godina [Zheng, Pollack, 2003]. Ove studije nisu se ticale samo „nemešanih“ slojeva u blizini ćelija, već i prirode vodenih delova koji se nalaze u blizini mnogih hidrofilnih površina.

Poznata, mnogo puta citirana, studija tečno-čvrstih površina stara oko 60 godina [Henniker, 1949], ukazuje na uticaj površine koji se proteže u tečnost 2 do 3 molekularna sloja. Kasnija studija pokazala je da pored poliranog kvarca strukturirana voda može da se proteže i do 600 molekularnih slojeva [Pashley, Kitchener, 1979].

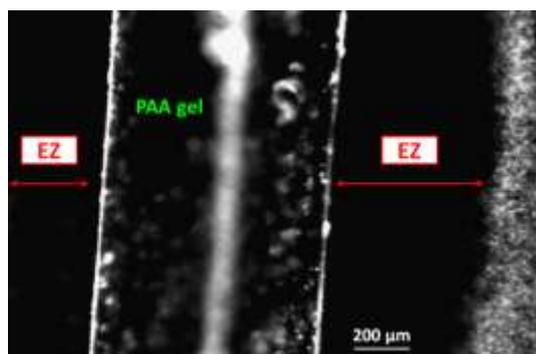
Eksperimenti koje su sproveli Zheng i Pollack 2003. godine bazirali su se na ispitivanju ponašanja koloidnih čestica pored hidrofilnih površina. Budući da je energetski povoljnije za koloidne čestice i rastvorene supstance da se smeste van strukturalnih delova kako bi lakše mogli da prihvatu vodu – hidriraju se, pokušano je da se ispita razdvajanje razdvojenih supstanci u blizini površina. Hipoteza je bila da ako su rastvorene supstance isključene od zona na graničnim područjima, da je zona bez supstanci strukturno drugačija od vode u ostatku ispitivanog uzorka.

U eksperimentu Zheng-a i Pollack-a polivinil-alkoholni gel postavljen je u komoru, a ivica gela posmatrana je optičkim mikroskopom. Rastvor lateks mikrosfera sipan je preko gela u komoru. Odmah po sipanju, mikrosfere su počele da se odvajaju i kreću od površine gela ka ostatku vode. Nakon nekoliko minuta mogla se videti zona bez mikrosfera pored ivica gela širine 50-100 μm (slika 7.1).



Slika 7.1: EZ (tamni delovi) na obe strane polivinil alkohol gela. Mikrosfere (gore levo i dole desno) su odvojene od dela u blizini gela. Beli magloviti delovi predstavljaju refleksioni artefakt [Pollack, Clegg, 2008].

Interesantnije od EZ formiranih oko polivinil-alkoholnog gela bile su EZ oko veoma naelektrisanog poliakril-kiselog gela. U tom slučaju veličina EZ protezala se i do 250 μm.

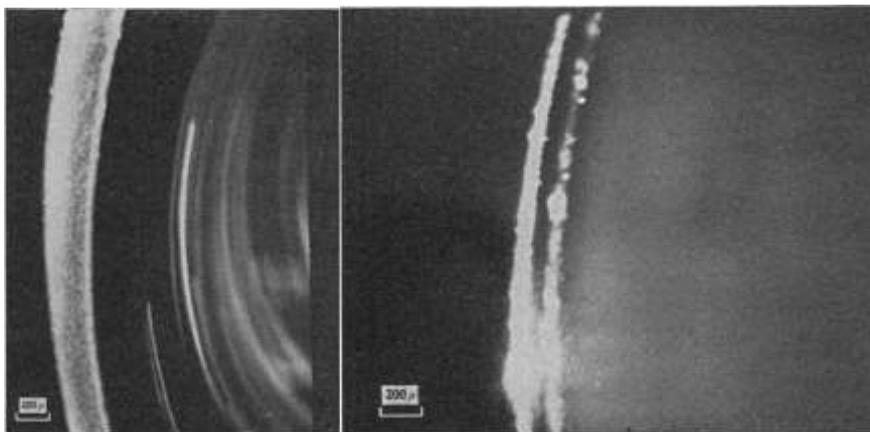


Slika 7.2: EZ (tamni delovi) na obe strane poliakrilnog kiselog gela. Mikrosfere koje su odvojene od površine gela su na krajnjem desnom delu. Vertikalna bela crta u sredini PPA gela predstavlja optički artefakt [Pollack, Clegg, 2008].

U ovoj disertaciji pokazano je da dolazi do odvajanja čestica i stvaranja zone drugačijih karakteristika u prisustvu hidrofobnog materijala nafiona koji nakon izlaganja vodi u toku određenog vremenskog intervala dobija hidrofilne karakteristike i hidrofilnih čestica mikrosfera. Ta zona je reda veličina od 60 do 160 μm u zavisnosti od koncentracija ispitivanog rastvora. Rezultati ovih istraživanja su u saglasnosti sa sličnim istraživanjima iz ove oblasti.

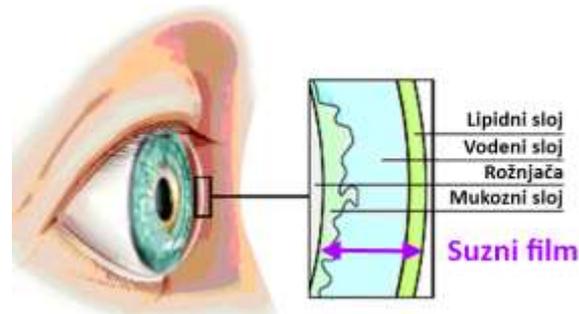
Nisu samo mikrosfere pokazale isključenje od površine gela. Takođe je pokazano da se različite rastvorene supstance isključuju i da im je opseg veličina

veoma različit: pesak, mulj, bakterije, eritrociti, proteini [Zheng et al, 2006]. Materijali koji „podstiču“ odvajanje takođe su raznovrsni hidrogelovi, polimerne površine (nafion), biološke površine kako kod čoveka mišići) tako i kod drugih živih organizama (morska trava). Ovi eksperimenti sprovedeni su nakon studije Green-a i Otori-ja koja je ukazala na povezanost između površina i mikrosfera sa „nemešanim“ slojevima čiste vode oko rožnjače oka [Green, Otori, 1970]. Oko rožnjače oka miša sipali su rastvor polisterin-lateks mikrosfera, na isti način kao što je urađeno u eksperimentima koje su sprovedli Zheng i Pollack (2003). Rezultati su bli slični. Green i Otori videli su čiste zone bez mikrosfera veličine 350 μm . Čiste zone su videli ne samo pored prirodne rožnjače, već i pored veštačkog kontaktnog sočiva.



Slika 7.3: Slika levo - Fotografija rožnjače 90min nakon sipanja mikrosfera u komoru. „Nemešani“ sloj deo je oko 400 μm , a koncentracija u ostaloj vodi iz uzorka je značajno drugačija od koncentracije u „nemešanom“ sloju. Rožnjača je tanja nego normalna zbog dugog izlaganja vazduhu sa prednje strane toku fotografisanja.
Slika desno - Fotografija kontaktnog sočiva 90min nakon sipanja mikrosfera u oko 150 μm [Green, Otori, 1970].

U ovoj disertaciji je pokazano da se ekskluzivna zona pojavljuje sa spoljašnje strane sočiva i pri svim promenama fokalnih ravni posmatranja na mikroskopu. Ne pojavljivanje ekskluzivne zone na unutrašnjoj strani može biti artefakt zbog konkavne unutrašnje površine sočiva [Golubovic, Koruga, 2012]. Posmatrano sa fiziološke strane suzni film je veoma bitan zbog svoje zaštitne uloge, služi kao podmazivač oka i održava oči vlažnim i smanjuje nelagodnost pri nošenju kontaktnih sočiva.



Slika 7.4: Suzni film i njegovi slojevi [Kojic et al, 2012].

Bez obzira na ključnu ulogu suznog filma, publikovani rezultati su veoma raznoliki. Prydal i Campbel su pronašli da je srednja vrednost debljine suznog filma 34 do 45 μm , prosečna veličina EZ posmatranih u blizini različitih materijala iznosi 40 do 65 μm [Prydal et al, 2006–2011]. Budući da je u mnoštvu studija pokazano da se ekskluzivna zona javlja u blizini različitih membrana (nafion itd.) i bioloških tkiva, u ovoj disertaciji se povlači paralela između ekskluzivne zone u *in vitro* uslovima i suznog filma u *in vivo* uslovima.

Rezultat Green-a i Otori-ja iz 1970. je paralela rezultatima Zheng-a i Pollack-a iz 2003. godine sa polyNIPAM gelom koji se koristi za izradu sočiva. Sva ova istraživanja i rezultati iz različitih perioda i laboratorija, ukazuju na to da su „nemešani“ slojevi čiste vode u klasičnoj fiziologiji i zone bez rastvorenih supstanci, u stvari isto.

Kada se razmatra priroda – struktura vode u „nemešanim“ slojevima i EZ, postoje dva gledišta. Sa jedne strane smatra se da je ova voda istih karakteristika kao i voda u ostatku ispitivanog uzorka (*bulk water*), a da se isključenje čestica odvija samo zbog blizine površina. Zbog entropijskih efekata, rastvorene supstance treba da budu u manjim koncentracijama u oblastima „u blizini“ površina. Smatra se da ovi efekti utiču da slojevi budu široki i desetine molekularnih slojeva. Međutim, razdaljine koje se ovde posmatraju su dosta veće i dostižu i 250-300 μm , što je ekvivalentno količini od oko 250.000 molekula vode. Sa druge strane, smatra se da je voda u ovoj zoni pod uticajem površine, tj. da veličina prostora i površinski napon utiču na strukturu vode daleko više nego što je očekivano. Prvobitnim eksperimentima ovo nije potvrđeno, ali skorašnji rezultati daju osnova za tvrdnju

da je voda u EZ različitih fizičkih karakteristika od vode u ostatku ispitivanih uzoraka.

Značajni pokazatelj razlika u strukturi vode u EZ izvodi se iz studija u kojima je korišćena UV-VIS spektroskopija [Zheng et al, 2006]. Pri ovim istraživanjima korišćen je nafion za koji je utvrđeno da generiše EZ značajnih dimenzija. List nafiona bio je zalepljen za jedan od četiri zida standardne kivete koja je onda napunjena destilovanom, dejonizovnom vodom. Spektrometar je modifikovan tako da tanak deo svetlosti može da apsorbuje paralelne zone na različitim udaljenostima od površine nafiona. Daleko od površine nafiona, apsorpcioni spektar nije se razlikovao od ostatka uzorka. Kako se snop svetlosti približvao površini nafiona, registrovan je apsorpcioni pik od 270 nm. Pik je postao izrazito vidljiv na granici EZ, oko 500 μm od površine nafiona. Budući da u ostaloj vodi iz uzorka nije primećen pik na 270 nm, prisustvo ovog pika u EZ ukazuje na činjenicu da je voda u EZ drugačijih karakteristika. Da bi se ispitala fizička različitost EZ, osim UV-VIS spektroskopije korišćeno je još pet metoda ispitivanja: NMR (nuklearna magnetna rezonanca), infra-crveno i snimanje dvostrukog prelamanja (*birefringence*), merenje električnog potencijala i viskoznosti. Došlo se do zaključka da se EZ voda razlikuje od ostale vode po kraćem vremenu relaksacije dobijenom slikanjem magnetnom rezonancom (MRI) T_2 , redukovanoj infra-crvenoj radijaciji i velikom gradijentu električnog potencijala [Zheng et al, 2006].

Kada se uzmu u obzir sva navedena razmatranja, dolazi se do zaključka da je EZ voda fizički i verovatno hemijski strukturno i energetske drugačija od ostatka ispitivane vode. Smanjena infra-crvena radijacija i kraće vreme T_2 naročito ukazuju na to da je voda u „nemešanim slojevima“, tj. EZ strukturo stabilnija od vode u ostatku ispitivanih uzoraka. Može se izvesti zaključak da do odvajanja rastvorenih materija i koloida dolazi jer je energetska sredina ostatka vode pogodnija za hidriranje od EZ, tj. struktura EZ ne omogućava dovoljnu hidrataciju. Voda u ovoj zoni je pod jakim uticajem površine materijala koju okružuje i reakcija koja nastaje strukturno teži da izdvoji čestice.

7.2 Diskusija rezultata ispitivanja interakcije vode sa biomolekulima

Ljudsko telo je kompleksna kombinacija tvrdih i mekih tkiva, čija interakcija vodi ka visokoj fleksibilnosti i dugotrajnosti. Strukturni i nehomogeni mekani i čvrsti materijali imaju ključne uloge u organizmu. Sluz, staklasto telo, hrskavica, ligamenti i krvni ugrušci predstavljaju oblike materijala poznate kao hidrogelovi. Karakteristika hidrogelova je da nisu ni tečni ni čvsti, već imaju osobine oba stanja. Strukturno, hidrogelovi predstavljaju 3D mreže materija(la) koje ogarničavaju i podržavaju vodu, ali u vodi nisu rastvorljivi, iako pojedinačni polimeri koji ih čine jesu. Hidrogelovi sadrže između 50 i 90% vode, zavisno od stepena i forme povezivanja. Želatin, materijal od velikog značaja za primenu u biomedicini, predstavlja najpoznatiji oblik hidrogelova, a dobija se denaturacijom kolagenskih struktura fizičkim ili hemijskim putem sve do najjednostavnijeg nivoa. Denaturacija kolagena zavisi od pH vrednosti, temeperature, jonskog potencijala rastvora i molekulske težine [Raković et al, 2010].

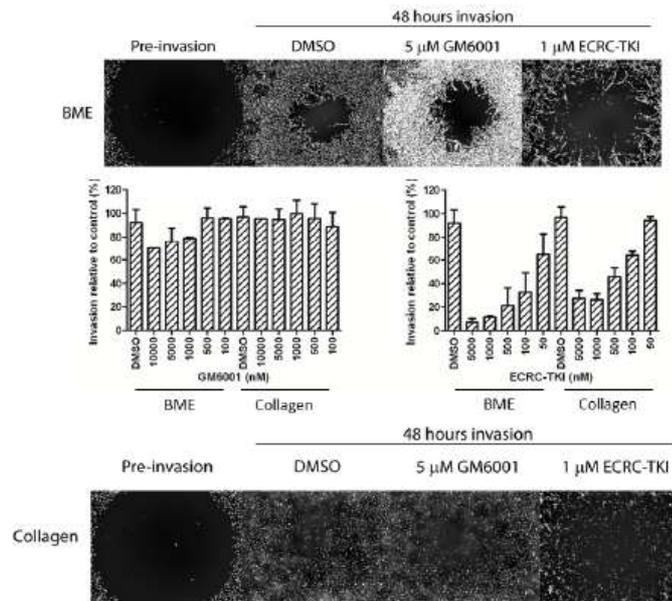
Proteini formiraju isprepletanu 3D strukturu hidrogelova koja sadrži vodu. Staklasto telo u oku i hrskavica sadrže proteinske hidrogelove koji potiču od kolagena. Odličan su primer kako, iako hemijski identični, mogu dati značajno različite osobine variranjem strukture isprepletane mreže, koja ide of providnog fluida male viskoznosti, do jakog, otpornog materijala [www.orthoworld.com/index.php/publications/view_article/221558].

Tokom prvih ispitivanja mikrotubula u ćelijama ljudskog organizma 1960. godine u poprečnom preseku primećeno je postojanje „čiste zone“, tj. ekskluzivne zone [Porter, 1960]. Takođe, nekoliko godina kasnije EZ su primećene u blizini membrana ili citoskeletnih struktura, aktinskih vlakana [Kamitsubo, 1972], a upotrebom elektronske miksorkopije u eukariotskim ćelijama, primećene su EZ na ultrastrukturnom nivou [Mollenhauer, Morre, 1978]. Ove oblasti definisane su kao „diferencirane oblasti citoplazme u kojima ribozomi, glikogen i organele kao što su mitohondrije, plastidi ili mikrotela, ne postoje“. Pažnja istraživača bila je usmerena na mogućnost da se čiste zone nalaze oko filamenata koji okružuju proteine, koji su manje prosečne gustine od mikrotubula. Pretpostavka je bila da ove zone služe kao

zaštita, tj. da štite zidove mikrotubula od prodora velikih čestica [Amos, 1979], a zabeležena širina zida kretala se između 5-20 nm.

Uticaj površinskog naelektrisanja na stvaranje čistih zona je razmatran i zaključeno je da su mikrotubule u pojedinim delovima okružene ribozomima koji su negativno naelektrisani i da je upravo to razlog zbog koga dolazi do stvaranja čistih zona [Stebbins, Hunt, 1982]. Potvrđeno je da je širina ovih zona oko 20 nm. Takođe, mikrotubule se često nalaze jedna pored druge, pa rastojanje koje ispunjavaju čiste zone iznosi oko 10 nm. Istraživanja su pokazala da veličina ovih zona nije konstantna i da zavisi od sastava ćelijskog okruženja svake mikrotubule. Takođe, pokazano je da čiste, ekskluzivne zone postoje oko mikrotubula čak i kada je većina vode osmotski uklonjena [Albrecht, Buschnell, 1982].

Napretkom nauke u današnje vreme, uz pomoć dostupnih savremenih tehnologija, istraživanja su postala raznovrsnija i detaljnija. Primer takvih istraživanja ogleda se u mogućnosti snimanja i slikanja u cilju razumevanja procesa metastaziranja raka. Ovakve studije su posebno značajne zbog mogućnosti pronalaženja načina za pravovremenu dijagnostiku, kao i što uspešnju primenu i doziranje lekova. Jedna od ovakvih studija zasniva se na posmatranju kretanja ćelija raka u ćelijskim kulturama i formiranja ekskluzivnih zona uz primenu pločica premazanih kolagenom tipa I i bazalnim membranama [http://www.platypustech.com/posters/AACR_poster_2012.pdf].



Slika 7.5: Kretanje tumorskih ćelija nakon 48 sati u prisustvu kolagena i rezultati predstavljeni putem dijagrama [http://www.platypustech.com/posters/AACR_poster_2012.pdf].

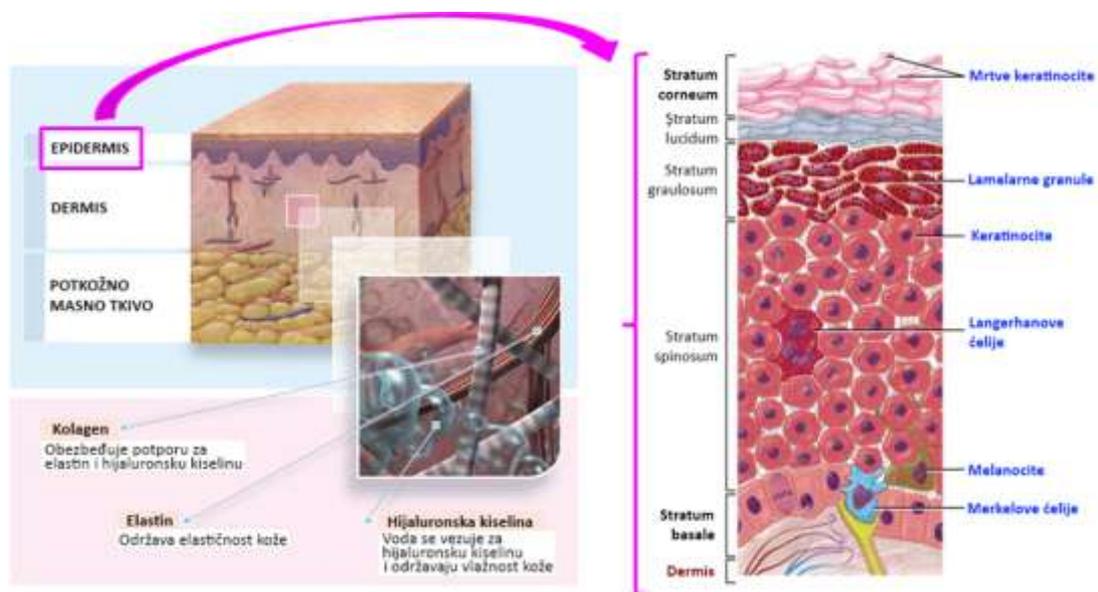
Pojavljivanjem ekskluzivnih zona i razmatranjem njihovih ponašanja, omogućeno je:

- posmatranje razvoja tumorskih ćelija u određenim stadijumima tumora
- razvoj optimalnih kombinacija lekova koje odgovaraju određenim stadijumima
- otkrivanje efikasnih kombinacija lekova koji će višestruko uticati na smanjenje napredovanja tumora i tako uticati na stepen smrtnosti pacijenata.

U određenim eksperimentalnim *in vitro* i *in vivo* uslovima dolazi do isključenja čestica i stvaranja zone koje su drugačije strukturane. Međutim, ne radi se uvek o upotrebi vode u uzorku. U ovoj disertaciji je pokazano da u navedenim koncentracijama, a kad se koristi kao jedna od supstanci dejonizovana voda, bilo da se radi o čistom kolagenu ili o kolaagenu u stanju gela, ne dolazi do srukturiranja vode.

Sa funkcionalnog i anatomskog stanovišta, koža u kojoj se nalaze različiti tipovi kolagena, je visoko kompleksan organ koji se nalazi između osetljivog biološkog sistema u kome vlada homeostatska ravnoteža i spoljašnje sredine u kojoj vladaju brojni agresivni faktori. Osnovna uloga kože je da zaštiti donje slojeve

tkiva od štetnih uticaja okoline, kao i da spreči prekomerni gubitak tečnosti iz tela [Gniadecka et al, 1998]. Kožu anatomski čine 3 sloja: epidermis, dermis i potkožno masno tkivo (slika 7.6). Površinski, spoljašnji sloj *epidermis* je tanak, omotač, bez krvnih sudova, podeljen na dva dela: spoljašnji rožnati (stratum corneum) gde se nalaze izumrle keratinozne ćelije i unutrašnji ćelijski gde se formiraju melanin i keratin (njega formira četiri sloja: svetli (stratum lucidum), zrnasti (stratum granulosum), trnoliki (stratum spinosum), bazalni sloj (stratum basale). *Dermis* je sloj bogat krvnim sudovima, ishranjuje epidermis, sadrži vezivno tkivo, lojne žlezde i deo folikula dlake. *Potkožno masno tkivo* sadrži masne naslage, lojne žlezde i ostatak folikula dlake [Bates, 1995].

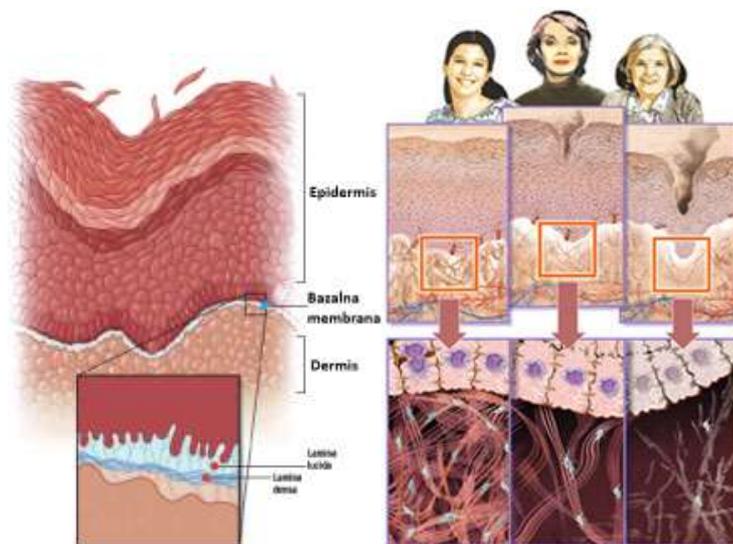


Slika 7.6: Anatomska podela kože (levo) i epidermisa (desno) [adaptirano prema: <http://interationalantiagingsystems.wordpress.com/tag/retin-a-cream-dosage/> i http://www.imperial.edu/~thomas.morrell/cha_5_tortora_integument.htm].

Prihvaćeno je da je deo kompleksnog, fiziološkog ponašanja kože zavisi od sastava vode, koji doprinosi funkciji barijere, kao i posebna specifična biomehanička ponašanja [Yamamura et al, 1989; Christensen et al, 1977; Berardesca, Maibach, 1990; Pierard, 1999; Pierard, 1989]. Zajedno, i epidermis i dermis utiču na ove karakteristike, iako osnovni strukturni aspekt zavisi od dermalne organizacije [Christensen et al, 1977; Berardesca, Maibach, 1990; Pierard, 1999], dok zaštita i integritet organa zavise od funkcionalnosti epidermisa [Pierard, 1999; Watanabe et al, 1991; Werner et al, 1982; Berardesca et al, 1990].

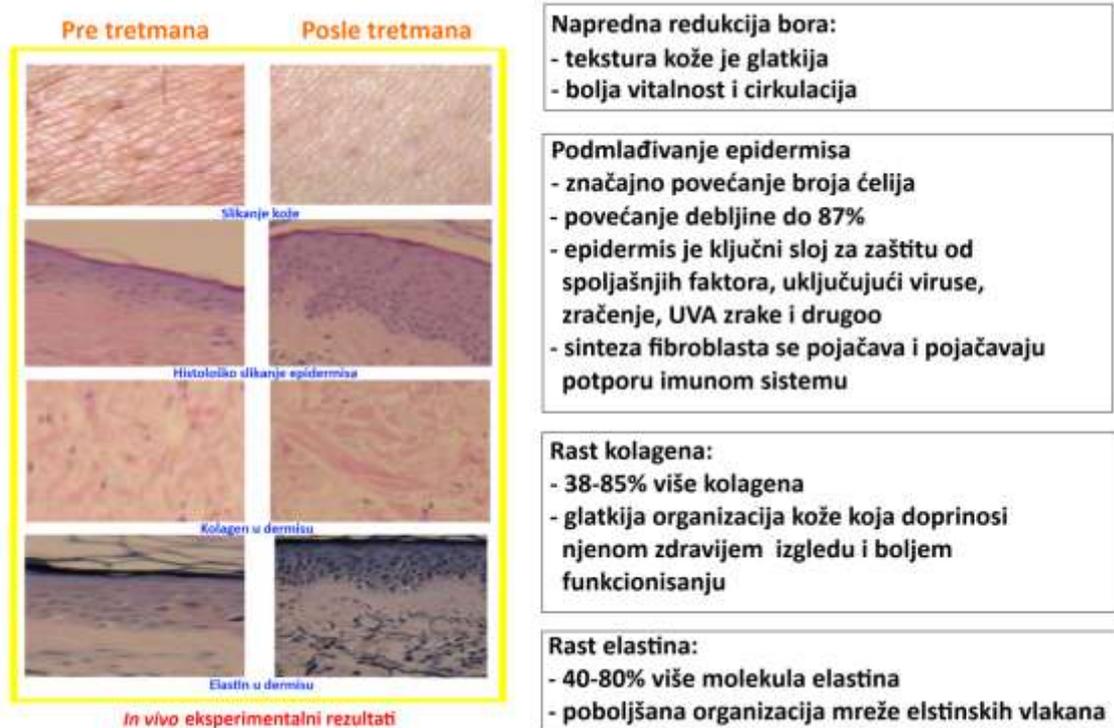
Studije su pokazale da je hidriranost živog epidermisa i dermisa veoma slična u smislu ravnoteže između elektrolita i hidratacije zbog prirodne bliskosti ova dva tkiva [Pierard, 1999; Pierard, 1989; Watanabe et al, 1991; Werner et al, 1982; Berardesca et al, 1990; Tagami et al, 1992; Rodrigues et al, 1999].

Poznavanje tipova kolagena koji se nalaze u koži čoveka veoma je važno iz više razloga. Jedan od razloga se ogleda u tome da ne utiču svi preparati koji se koriste u svrhu podmlađivanja, održavanja vitalnosti ili lečenja oboljenja kože, na isti način na sve tipove kolagena i njihovih struktura.



Slika 7.7: Ponašanje kolagena u koži. Nestabilnost bazalne membrane uzrokovana promenama kolagena tpa VII (levo). Promene u toku starenja (desno)[adaptirano prema: <http://www.jaapa.com/inherited-epidermolysis-bullosa-this-dermal-disease-is-beyond-skin-deep/article/124080/>].

Eksperimentalno je dokazano da upotreba hidrogenizovanih nanomaterijala fullerola u lečenju i nezi oštećenih struktura kože doprinosi podmlađivanju kože ne samo na kliničkom, već i na histološkom nivou [Matija et al, 2004]. Pokazano je da postoji povratna sprega između nukleusa u ćelijama kože i sistema kolagen-fulerol. Ispoljene su značajne razlike u debljini dermisa, kao i broju ćelija fibroblasta, kolagena i elastina i kvaliteta tkiva, pre i posle tretmana nanoharmoničnim supstancama na bazi fullerola koje su u vidu krema aplcirane na kožu.



Slika 7.8: Promene u koži posle dejstva hidrogenizovanog i energetski stabilizovanog molekula C60 na kožu preko vode – zdravlje kože pod uticajem debljine, gustine i uniformnosti elastina, kolagena i epidermisa (Matija et al, 2004).

7.3 Diskusija rezultata ispitivanja interakcije vode sa hidrogenizovanim ugljeničnim nanomaterijalima

Četiri za živi svet posebno značajna biomolekula: DNK, mikrotubule, klatrin i kolagen, struktuirani su po Fibonacci-jevoj sekvenci zakona Zlatnog preseka [Rakocevic, 1998; Matija et al, 2004]. Dokazano je da nanomaterijal fuleren (C₆₀) generiše vibracije po zakonu Zlatnog preseka. Takođe, otkriveno je da sa fizičke tačke gledišta poseduje netoksične karakteristike, dok nasuprot tome sa hemijskog aspekta poseduje toksične karakteristike. Koncentracije čistog fulerena preko 10 ppb su toksične, ali nakon dodavanja hidroksilnih grupa i postizanja rastvorljivosti u vodi, koncentracije koje su netoksične dostižu i do 10⁴ – 10⁹ ppb. Prisustvo hidroksilnih grupa koje na nano-nivou stvaraju vodenu ljusku oko fulerena priznato je kao korisno i bezbedno za medicinske i kozmetičke svrhe [Koruga, 2011].

Energetski stabilizovane nano-harmonizovane supstance predstavljaju biomimetički materijal. Prisustvo ovakvih supstanci na bazi vode u biološkim tkivima predstavlja osnovnu pokretačku silu Zlatnog preseka u prirodnom procesu samo-sastavljanja, a koja je neophodna u procesu vraćanja funkcija oštećenim biomolekulima [Matija, Koruga, 2012].

Matija et al [2012] sprovodili su eksperimente u kojima su ispitivali nano-harmonizovane supstance za koje se smatra da utiču na regulaciju, nano-kontrolu, konformacionih stanja biomolekula i čiji sastav prati harmonizovanu formu (Φ/φ). Prenosjenjem vibracija na molekule vode u blizini, biomolekuli bi mogli da povrate svoje prirodno stanje vibriranja. Korišćenjem infracrvene spektroskopije i akvafotomike pokazano je da su molekuli vode jako vezani nerastvorenim nano-harmonizovanim supstancama, dok ostatak ispitivane vode ima više od jedne vodonične veze, tj. vodenog klastera. Prisustvo nano-harmonizovanih čestica u rastvoru ukazuje na to da je organizacija molekula vode oko hidrogenizovanog nanomaterijala uglavnom u vidu „hidratacionih ljuski“. Ove ljuske predstavljaju slojeve molekula vode oko hidrogenizovanih nanomaterijala koje ukazuju na to da oscilacije koje se dešavaju prate zakon Zlatnog preseka, kao i da bi mogle da se prenose u okolne slojeve molekula vode [Matija et al, 2012].

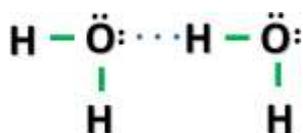
U ovoj disertaciji je na osnovu mikroskopskih istraživanja i snimanja kamerom visoke rezolucije, a sa drugačijeg stanovišta i pristupa, pokazano da se voda strukturiira u prisustvu hidrogenizovanog nanomaterijala fullerola, čime su potvrđena prethodna istraživanja.

7.4 Eksluzivna zona i klasično-kvantne osobine vodoničnih veza

Klasično-kvantne osobine vodonične veze

Između naelektrisanih molekula postoje međumolekularne interakcije: dipol-dipol, Londonove disperzne sile i vodonične veze. Ove tri interakcije zajedno predstavljaju Van der Waals-ove interakcije. Pored ovih, u rastvoru postoje još i jon-dipol interakcije. Značajna i potpuno originalna prirodna pojava je vodonična veza i predstavlja specijalan tip privlačnih interakcija između vodikovog atoma

koji je vezan za neki elektronegativan atom (najčešće H-O) i slobodnog elektronskog para koji se nalazi na obližnjem elektronegativnom atomu (najčešće O). Ta sila privlačenja dosta je slabija od one koja nastaje u N-O hemijskoj vezi, ali je znatno jača od uobičajenog međumolekulskog privlačenja jer je uslovljena dimenzijama i naelektrisanjem vodonika. Klasično tumačenje vodonične veze zasniva se na tome da je delimično kovalentna kao hemijska veza, mada joj se daje i čisto elektrostatički karakter. Molekul vode obrazuje četiri vodonične veze: dve kao donor (davalac) i dve kao akceptor (primalac) vodonika i one se neprekidno stvaraju i raskidaju tako da ima molekula i sa manje od četiri veze.



Slika 7.9: Šematski prikaz povezanosti dva molekula vode vodoničnom vezom.

U ledu je takav raspored očuvan kroz celu kristalnu rešetku i u čvrstom stanju svaki molekul vode ima četiri vodnične veze koje održavaju molekule u privlačnom geomterijskom rasporedu čime nastaje kristalna rešetka.

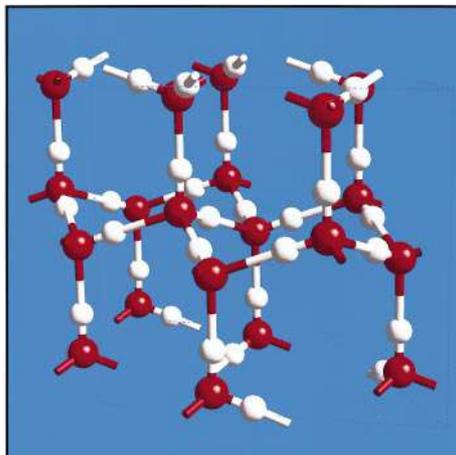
Pauling je još 1939. godine predstavio vodonične veze u vodi ne samo kao klasično, električno privlačenje između pozitivnog atoma vodonika i negativno naelektrisanog kiseonika, već i da su pod uticajem σ veza, tj. veza koj se formiraju preklapanjem para 1s orbitala, po jedne od svakog vodonikovog atoma. 1999. je Paulingovo istraživanje eksperimentalno potvrđeno i ukazano je na kovalentne klasične i kvantne osobine vodoničnih veza [Isaac et al, 1999]. Vodonične veze su od velikog značaja u funkcionisanju biomolekula. U slučaju kada dolazi do narušavanja jačine vodoničnih veza menja se konformmaciono stanje molekula, što utiše na njegovu funkcionalnost i vodi ka pogrešnom pozicioniranju proteina.

Vodonične veze utiču na obrazovanje i stabilizaciju različitih nivoa strukture proteina. Strukture proteina čiji su glavni vidovi α -spirala i β -nabrana struktura obrazuju se uglavnom na bazi stvaranja vodoničnih veza između atoma koji se nalaze relativno blizu u peptidnom lancu peptidne veze. Vodonične veze se grade između karbonilnog kiseonikovog atoma svakog prvog ostatka

aminokiseline u nizu i atoma vodonika iz NH-grupe svakog petog ostatka. U najstabilnijoj konformaciji proteina koju karakteriše uvijanje polipeptida u prosotoru, pored elektrostatičke interakcije, hidrofobne interakcije i kovalentne veze, vodonične veze igraju veliku ulogu u stabilizaciji te najstabilnije konformacije proteina. Vodonične veze su direktna veza između normalnih i abnormalnih stanja proteina što značajno utiče na zdravlje organizma [Matija et al, 2012].

Vodonične veze igraju ključnu ulogu u određivanju bitnih osobina vode. Tako kod leda, vodonik formira dva odvojena tipa veza sa okolnim kiseonikom. Kraća kovalentna veza između kiseonika i vodonika je β veza (0.10 nm). Duža veza (0.175 nm) jednostavno se naziva vodonična veza i delimično je kovalentna.

Da bi se bolje razumeo udeo kovalentnosti u anizotropiji, sprovedena su dva potpuno paralelna proračuna Komptonovog profila leda bazirana na dva ekstremna načina vezivanja [Isaacs et al, 1999]. U prvom slučaju vodonične veze su tretirane kao potpuno elektrostatičke, tj. klasičnim pristupom gde ne postoji kovalentnost. U ovom slučaju, Komptonov profil leda sastoji se od sume uticaja individualnih H₂O molekula orjentisanih prema Bernal-Fowler-ovom pravilu leda (slika 7.10).

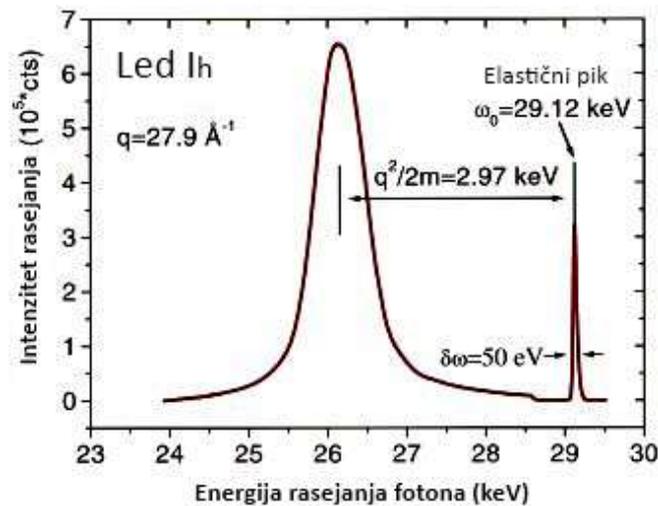


Slika 7.10: Kristalna struktura Bernal-Fowler-obog leda *Ih* [Isaacs et al, 1999].

Komptonov profil izolovanog H₂O molekula zavisi od pravca \mathbf{q} u odnosu na molekularnu osu. Ovo prvenstveno zavisi od orijentacije σ veza. Drugi način predstavlja potpuno kvantni proračun elektronske talasne funkcije leda. Kao i u

svakom kvantnom računu kovalentnost, tj. faza koherentnosti talasne funkcije između susednih molekula je eksplicitno uključena.

Na slici 7.11 predstavljeni su izmereni intenzitet rasejanja svetlosti kao funkcija energije (Komptonov profil leda – veoma visok prenos količine energije rasejanja x-zraka) za heksagonalni led sa q koje je paralelno heksagonalnoj c osi. Centar Komptonovog profila je pomeren energijom odbijanja $q^2/2m = 2,97$ keV, relativno u odnosu na elastični pik na 29,12 keV. Pri tako velikim energijama odbijanja, korekcije na tzv. aproksimaciji impulsa su $\sim 10^{24}$ ili 0,01 % ($\sim E_H$ veza/ $E_{\text{odbijanje}}$) manje skoro za 2 reda veličina nego karakteristike u Komptonovom profilu anizotropije.



Slika 7.11: Komptonov profil za led *Ih* sa prenosom količine kretanja [Isaaces et al, 1999].

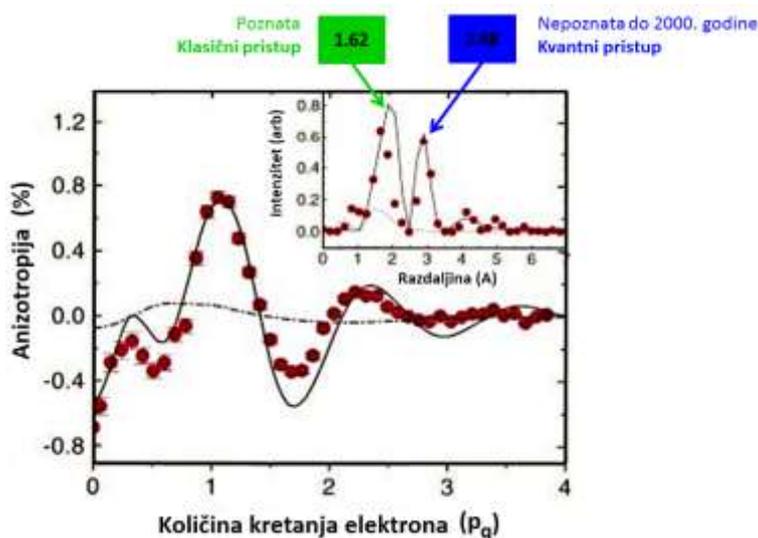
Oba dela dijagrama, skok na 26 keV i elastični pik na 29,12 keV, predstavljeni su funkcijom istog oblika sa različitim koeficijentima. Taj problem može se prikazati sledećom parcijalnom diferencijalnom jednačinom drugog reda:

$$\frac{\partial y}{\partial t} = \frac{w^2}{8} \frac{\partial^2 y}{\partial x^2},$$

gde su $y = y(x, t)$, x and $t > 0$ koordinate prostora i vremena, respektivno, a w je poznata konstanta. Rešenje te jednačine može se naći u obliku

$$y(x,t) = \frac{1}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} t^{\frac{1}{2}} e^{-\frac{2(x-x_c)^2}{w^2t}}$$

Na slici 7.12 uočava se da vodonična veza na bazi anizotropije količine kretanja elektrona pokazuje dvostruku prirodu: klasičnu i kvantnu (tačkasta linija sa anizotropijom oko 0.0%) i izrazito talasnu (kvantnu) prirodu (tačke su rezultat eksperimenta, a puna linija aproksimacija eksperimenta).

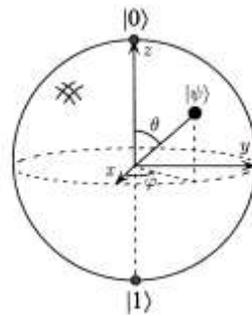


Slika 7.12: Komptonova anizotropija [Isaacson et al, 1999].

Eksperiment je pokazao da sa stanovišta kvantne mehanike dužina vodoničnih veza može imati vrednosti 0.162 nm, 0.288 nm, 0.416 nm i 0.498 nm. Prve dve dužine vodonične veze (0.162 nm i 0.288 nm) imaju približno podjednak intenzitet, s tim što dužina 0.162 nm odgovara Kulonovskoj interakciji (KI)^q, a 0.288 nm klasično-kvantnoj interakciji (KKI)^ψ na bazi talasne funkcije. (KKI)^ψ omogućava interakciju ne samo dva molekula vode preko jedne vodonične veze, nego apsolutno čiste vode čiji molekuli ostvaruju stanje “preklapajućeg vezivanja” preko vodoničnih veza.

EZ kao superpozicija vodoničnih veza molekula vode kao čvrste i tečne faze

Stanje u kvantnoj mehanici može se predstaviti kao vršna tačka Bloch-ove sfere (slika 7.13).



Slika 7.13: Bloch-ova sfera.

Bloch-ova sfera predstavlja generalizaciju dvodimenzionalne reprezentacije kompleksnog broja z sa $|z|^2 = 1$ kao tačke na jediničnoj kružnici u kompleksnoj ravni.

Kako je $z = x + iy$, gde su x i y realni brojevi, tada važi:

$$|z|^2 = z^* z = (x - iz)(x + iy) = x^2 + y^2$$

$x^2 + y^2 = 1$ je jednačina jedinične kružnice sa centrom u početku.

Za proizvoljno $z = x + iy$ i koordinate $x = r \cos \theta$, $y = r \sin \theta$, tačke na kružnici u ravni Oxy , može se pisati

$$z = r(\cos \theta + i \sin \theta)$$

Koristeći Euler-ovu jednačinu:

$$e^{i\theta} = \cos \theta + i \sin \theta$$

dobija se

$$z = r e^{i\theta}$$

odnosno za krug jediničnog poluprečnika

$$z = e^{i\theta}.$$

U kvantnoj mehanici stanje u prostoru prikazuje se pomoću dva osnovna vektora $|0\rangle$ i $|1\rangle$ koji zamenjuju klasičan bit.

Opšti izraz za kubit može se izraziti u obliku linearne kombinacije stanja, tj. superpozicije stanja:

$$|\psi\rangle = \alpha|0\rangle + \beta|1\rangle$$

gde su α i β kompleksni brojevi, uslov normiranosti glasi:

$$|\alpha|^2 + |\beta|^2 = 1$$

Izraz za kubit se tada može izraziti kao

$$|\psi\rangle = r_\alpha e^{i\Phi_\alpha} |0\rangle + r_\beta e^{i\Phi_\beta} |1\rangle$$

Tako da je kubit izražen preko 4 realna parametra r_α , Φ_α , r_β i Φ_β . Množeći prethodni izraz sa $e^{-i\Phi_\alpha}$ dobija se:

$$|\psi'\rangle = r_\alpha |0\rangle + r_\beta e^{i(\Phi_\beta - \Phi_\alpha)} |1\rangle$$

gde je $|\psi'\rangle = |\psi\rangle e^{-i\Phi_\alpha}$. Ako se označi: $\Phi = \Phi_\beta - \Phi_\alpha$, prethodni izraz postaje:

$$|\psi'\rangle = r_\alpha |0\rangle + r_\beta e^{i\Phi} |1\rangle$$

ili

$$|\psi'\rangle = r_\alpha |0\rangle + (x + iy) |1\rangle$$

Uslov normiranosti sada glasi:

$$|r_\alpha|^2 + |x + iy|^2 = r_\alpha^2 + x^2 + y^2 = 1$$

što predstavlja jednačinu sfere u realnom 3D prostoru sa Dekartovim koordinatama (x, y, r_α) .

Koordinate tačke na toj jediničnoj sferi date su sa:

$$x = r \sin \theta \cos \phi, \quad y = r \sin \theta \sin \phi, \quad z = r \cos \theta$$

i zamenjujući r_α sa z , sledi:

$$\begin{aligned} |\psi'\rangle &= z |0\rangle + (x + iy) |1\rangle = \\ &= \cos \theta |0\rangle + \sin \theta (\cos \phi + i \sin \phi) |1\rangle \\ &= \cos \theta |0\rangle + e^{i\phi} \sin \theta |1\rangle \end{aligned}$$

Time je tačka na jediničnoj sferi definisana preko dva parametra. Ali to još nije Bloch-ova sfera.

Prethodni izraz se može pisati i kao:

$$|\psi\rangle = \cos \theta' |0\rangle + e^{i\phi} \sin \theta' |1\rangle$$

Treba zapaziti da je

$$\theta' = 0 \Rightarrow |\psi\rangle = |0\rangle$$

$$\theta' = \frac{\pi}{2} \Rightarrow |\psi\rangle = e^{i\phi} |1\rangle$$

što sugeriše da je

$$0 \leq \theta' \leq \frac{\pi}{2}$$

i što može prikazati sve tačke na Bloch-ovoj sferi. Preslikavajući tačke sa gornje hemisfere na tačke sfere definicijom:

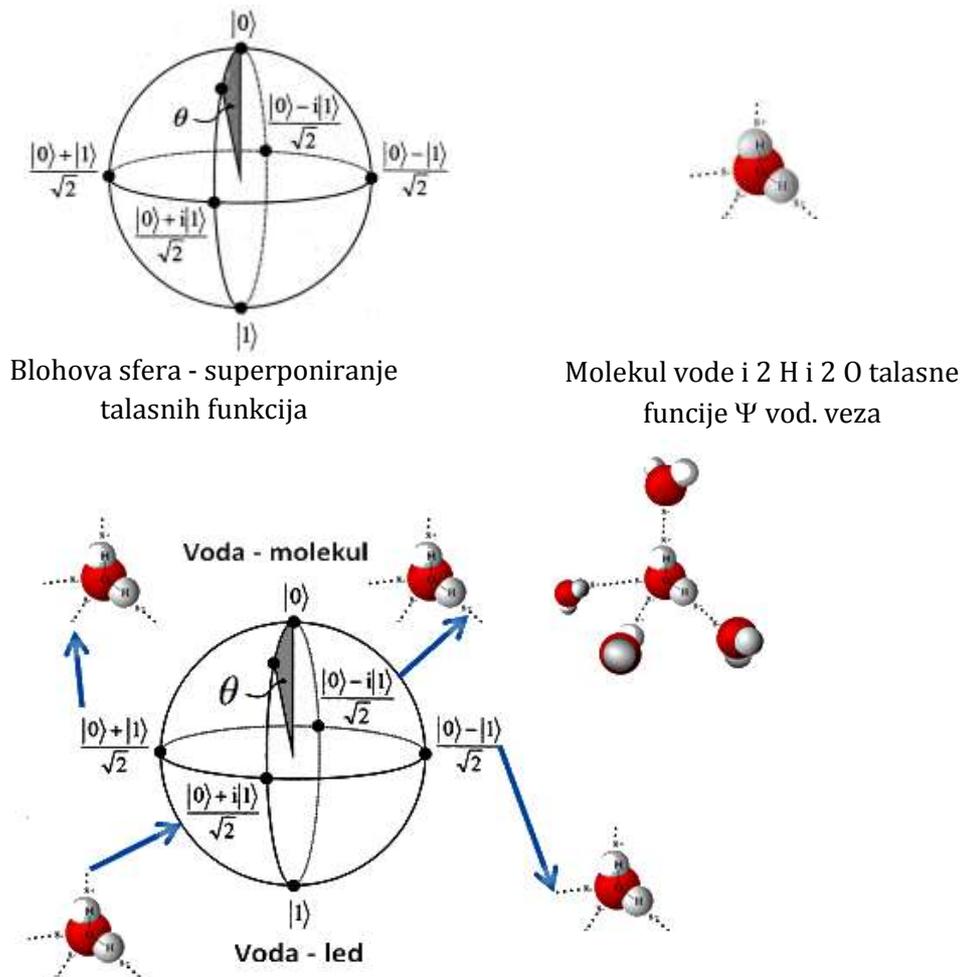
$$\theta = 2\theta'$$

koja se može pisati:

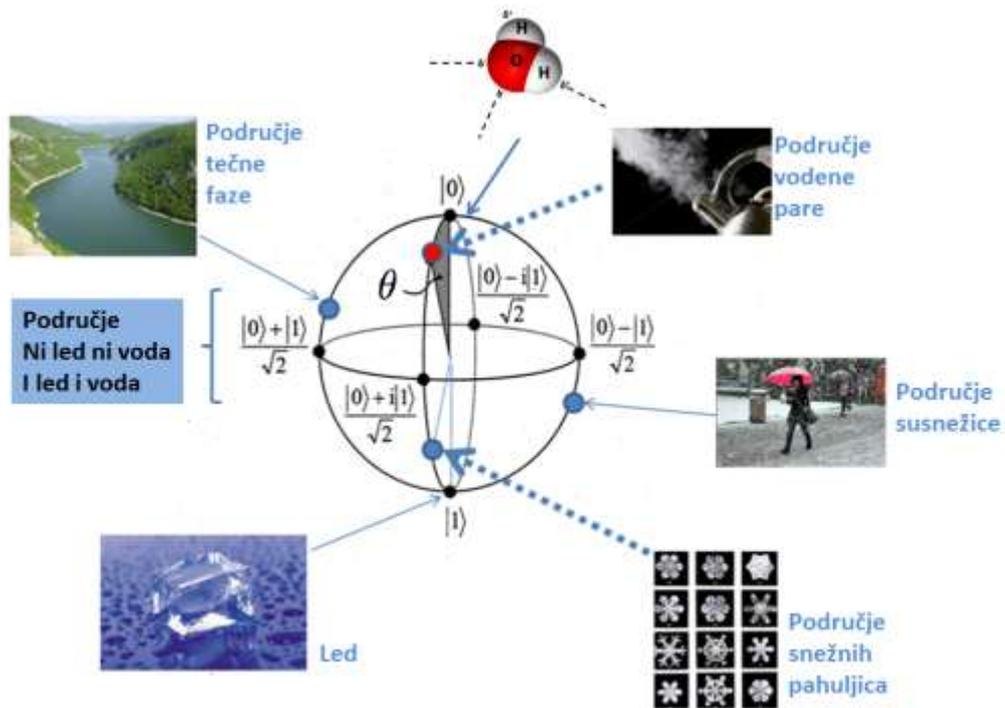
$$|\psi\rangle = \cos\frac{\theta}{2}|0\rangle + e^{i\phi}\sin\frac{\theta}{2}|1\rangle$$

gde su $0 \leq \theta \leq \pi$, $0 \leq \phi \leq 2\pi$ koordinate tačke na Bloch-ovoj sferi.

Iz prethodnog izraza mogu se dobiti karakteristična kvantna stanja prikazana na slikama 7.13, 7.14 i 7.15.



Slika 7.14: Blohova sfera i superponirana kvantna stanja vodoničnih veza [Koruga, 2012a].



Slika 7.15: Blohova sfera i superponirane talasne funkcije vodoničnih veza molekula vode čvrste i tečne faze u ekvatorijalnoj oblasti je stanje vode kao EZ [Koruga, 2012a].

8. ZAKLJUČAK

Eksluzivna zona predstavlja jedinstveno rešenje odnosa tečne i čvrste faze vode, kada su sve četiri vodonične veze jednog molekula vode interaktivne i zadovoljavaju superpoziciju kvantnog stanja vodoničnih veza čvrste i tečne faze.

EZ nije samo četvrto agregatno stanje vode, tj. stanje tečnog kristala, nego jedinstveno stanje, superpozicija, čvrste i tečne faze vodoničnih veza molekula vode, jer su svi istraživači EZ objašnjavali sa fenomenološkog aspekta migracija sfera, a ne sa suštinskog aspekta vodoničnih veza, što je originalni doprinos ove disertacije.

Do ove pretpostavke došlo se na osnovu:

- detaljno razmatranih dosadašnjih eksperimentalnih istraživanja o EZ
- ponovljenih eksperimenata vodenih rastvora mikrosfera kojim smo pokazali EZ, reprodukovali i verifikovali fenomen
- po prvi put urađenih eksperimenata sa nanosferama (fulerolom) i pokazanim fenomenom EZ
- urađenog eksperimenata sa kontaktnim sočivima i uočenog fenomena EZ
- dosadašnjih istraživanja biomolekula i EZ objavljenih u literaturi
- objašnjenog fenomena EZ sa aspekta vodoničnih veza.

Stručni doprinos ove disertacije, pored već navedenog naučnog, ogleda se u:

1. Ponovljenom eksperimentu EZ sa vodom, mikrosferama i nafionom (ovladanost metodom)
2. Po prvi put ova istraživanja i tema su rađeni na Beogradskom Univerzitetu
3. tome što se formira eksperimentalna baza kod nas za dalja istraživanja.

Istraživanja eksluzivnih zona kao fenomena prirodnog uspostavljanja lokalnog stanja čiste vode i struktuiranja vode oko različitih hidrofiličnih površina ukazalo je na različite skrivene aspekte ponašanja vode. Voda, kao molekul

neophodan za život, neophodna je za razumevanje mehanizama koji se dešavaju u ćelijama, kao i struktuiranjima materija u različitim biološkim procesima.

Struktuiranje vode u određenim oblastima organizma predstavlja paralelu formiranju strukture. Kada je obična voda izložena sunčevoj svetlosti i kada se nalazi pored hidrofилnih površina različitih struktura, uključujući i ćelijske membrane, voda se samostalno struktuirava i jonizuje i na taj način aktivno učestvuje u ćelijskom metabolizmu.

Na osnovu istraživanja postojeće literature i izvršenih eksperimentalnih ispitivanja u laboratoriji prof.dr Gerald Pollack-a, na katedri za Bioinženjering, Univerzitet Vašington, Sijetl (SAD) („Pollack's Laboratory“, Department of Bioengineering, University of Washington, Seattle, USA), mogu se izvesti sledeći opšti zaključci:

1. Utvrđeno je da postoji interakcija između dejonizovane vode, hidrofилnih čestica mikrosfera i hidrofobnog materijala nafiona. Veličine ekskluzivnih zona zavise od koncentracije mikrosfera u ispitivanim rastvorima. Pored hidrofobnog materijala nafiona koji nakon izlaganja vodi u određenom vremenskom periodu poprima karakteristike hidrofилnosti, veličine ekskluzivnih zona pri interagovanju sa rastvorom dejonizovane vode i mikrosfera su: pri koncentraciji 1:25 u opsegu 50-100 μm , pri koncentraciji 1:50 u opsegu 70-120 μm , pri koncentraciji 1:100 u opsegu 80-120 μm , 1:500 u opsegu 60-150 μm .
2. Stanje vode u koži, naročito između slojeva lipida u epidermisu, može se smatrati da poseduje osobine ekskluzivne zone.

EksPLICITNI naučni doprinosi ogledaju se u:

1. Originalni doprinos je u ispitivanju i dobijenim rezultatima interakcije između dejonizovane vode i hidrogenizovanog ugljeničnog nanomaterijala (fulerola). U prisustvu rastvora fullerola sa mikrosferama, a u blizini materijala nafiona postoji struktuiranje vode, tj. zona vode sa drugačijim karakteristikama. IR metodom na bazi akvafotomike (eksperimenti urađeni

na Kobe Univerzitetu, Japan i reprodukovani u BMI laboratoriji na Mašinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu) potvrđeno je postojanje uređenih slojeva vode oko nanomaterijala (fullerola) koji odgovaraju fenomenu ekskluzivne zone.

2. Tri različita tipa kontaktnih sočiva korišćenih u eksperimentima u doktorskoj disertaciji interaguju sa rastvorima mikrosfera pri čemu dolazi do formiranja EZ. Veličine ekskluzivnih zona pri interagovanju sa rastvorom dejonizovane vode i mikrosfera su:

- pri koncentraciji 1:25 - za Europerm 30 Blue sočiva iznosi 44 μm , za SP-40 sočiva iznosi 51 μm , za SP-40+C₆₀(OH)₂₄ iznosi 43 μm
- pri koncentraciji 1:100 - za Europerm 30 Blue sočiva iznosi 47 μm , za SP-40 sočiva iznosi 64 μm , za SP-40+C₆₀(OH)₂₄ iznosi 54 μm
- pri koncentraciji 1:500 - za Europerm 30 Blue sočiva iznosi 59 μm , za SP-40 sočiva iznosi 65 μm , za SP-40+C₆₀(OH)₂₄ iznosi 54 μm .

Najveće EZ stvarale su se pored RGP sočiva tipa SP-40. Fenomen stvaranja EZ je od značaja pri razmatranjima stvaranja i funkcionisanja suznog filma i karakteristika vlažnosti oka.

3. Preko istovremnog angažovanja broja vodoničnih veza jednog molekula vode objašnjavaju se osobine dejonizovane vode.
4. EZ je sa aspekta vodoničnih veza stanje okupiranosti većeg broja molekula vode sa sve četiri vodonične veze (istiskuje sve primese jer nema slobodnih vodoničnih veza, ostaju samo molekuli vode koji formiraju vodene strukture slične tečnom kristalu).

9. LITERATURA

- [1] Adolph EF, Dill DB: Observations on water metabolism in the desert. *Am J Physiol.* 123:369– 499, 1938.
- [2] Aikawa S, Yoshida Y, Hatae S, Nishiyama S, Kumar DS. Synthesis and characterization of a fullerene derivatives, *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 463, 237–244, 2007.
- [3] Ajayan PM, Zhou OZ. Applications of carbon nanotubes, *Carbon Nanotubes* 80, 391–425, 2001.
- [4] Alsten JV, Granick S. Molecular tribometry on ultrathin liquid films. *Physical Review Letters* 61(22):2570-2573, Nov 1988.
- [5] Albrecht-Buehler G, Bushnell A Reversible compression of the cytoplasm. *Exp Cell Res* 140:173–18, 1982.
- [6] Amos LA. Structure of microtubules. In: Roberts K. Hyams JS (eds) *Microtubules*. Academic Press, New York London, p.1-64, 1979.
- [7] Badger RM, Bauer SH, *J. Chem. Phys.* 1937, 5, 839-51.
- [8] Badireddy AR, Hotze EM, Chellam S, Alvarez P, Wiesner MR. Inactivation of bacteriophages via photosensitization of fullerol nanoparticles, *Environmental Science and Technology* 41, 6627–6632, 2007.
- [9] Bangs LB. *Uniform Latex Particles*, Seragen Diagnostics Inc., Seradyn, Indianapolis, 1987.
- [10] Basnayake R, Peterson GR, Casadonte DJ Jr, Korzeniewski C. Hydration and interfacial water in Nafion membrane probed by transmission infrared spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* 110(47):23938-23943, Nov 2006.
- [11] Bates B. *A Guide to Physical Examination and History Taking*. 6th Edition, J.B. Lippicott Company, 1995.
- [12] Beavers CM, Zuo T, Duchamp JC, Harich K, Dorn HC, Olmstead MM., Balch AL. An improbable, egg-shaped endohedral fullerene that violates the isolated pentagon rule, *Journal of the American Chemical Society* 35, 11352–11353, 2006.

- [13] Bojović B, Istraživanje interakcije stanja inženjerskih površina i fraktalne geometrije. Doktorska disertacija, mentor: prof.dr Kalajdžić M, Mašinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2009.
- [14] Brant JA, Labille J, Bottero J-Y, Wiesener MR. Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry, *Langmuir* 22, 3878–3885, 2006.
- [15] Brant JA, Labille J, Ogilvie-Robichaud C, Wiesener MR. Fullerol cluster formation in aqueous solution: Implications for environmental release, *Journal of Colloid and Interface Science* 314 (1), 281–288, 2007.
- [16] Chai BH, Zheng JM, Zhao Q, Pollack GH. Spectroscopic studies of solutes in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry A* 112(11):2242-2247, Feb 2008.
- [17] Chai B, Yoo H, Pollack GH. Effect of radiant energy on near-surface water. *Journal of Physical Chemistry B* 113(42):13953-13958, Sep 2009.
- [18] Chapman DL, *Phil. Mag.* 6(475), 1913.
- [19] Cheng HM, Yang QH, Liu C. Hydrogen storage in carbon nanotubes, *Carbon* 39 (10), 1447–1454, 2001.
- [20] Chopra S, McGuire K, Gothard N, Rao AM, Pham A. Selective gas detection using a carbon nanotube sensor, *Applied Physics Letters* 83 (11), 2280–2282, 2003.
- [21] Chiang LY, Wang LY, Swirczewski JW, Soled S, Cameron S. Efficient synthesis of polyhydroxylated fullerene derivatives via hydrolysis of polycylosulfated precursors, *Journal of Organic Chemistry* 59 (14), 3960–3968, 1994.
- [22] Christensen MS, Hargens CW, Nacht S, Gans EH. Viscoelastic properties of intact human skin, instrumentation, hydration effect and the contribution of the stratum corneum I *Invest Dermatol*, 69: 282-296, 1977.
- [23] Clegg JS. Alternative views on the role of water in cell function. In: Franks F, Mathias SF (ed.) *Biophysics of Water*. John Wiley and Sons, New York, pp. 365–385, 1982.
- [24] Cotton CU, Reuss L. Measurement of the effective thickness of the mucosal Unstirred Layer in *Necturus gallbladder epithelium*. *The Journal of General Physiology* 93(4):631-647, Apr 1989.

- [25] Das R. Interfacial water at hydrophilic surfaces: Charge separation at the Nafion-water interface. *PhD Thesis Proposal*, Bioengineering Department, University of Washington, Seattle (Dec 2011).
- [26] Dawson JC, Carragher NO, Fronczak JA, Hulkower KI. A high-throughput cell invasion assay combined with reverse phase protein microarrays for rational development of drug combination strategies targeting tumour invasion. *Cancer Research*: April 15, 2012; Volume 72, Issue 8, Supplement 1.
- [27] Derjaguin B, Landau L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta. Physicochim. USSR* 14:633-662, 1941.
- [28] Djordjevic A, Bogdanovic. Fullerenol-a new nanopharmaceutic? *Arch Oncol*, 10 (3-4): 42-5, 2008.
- [29] Dresselhaus MS. *Carbon Nanotubes Synthesis, Structure, Properties, and Applications*, Springer, Heidelberg, Germany, 2001.
- [30] Duck AF. *Physical Properties of Tissue*, Academic Press, London, p.323, 1990.
- [31] Edelman and Leibman. *American Journal of Medicine* 27, 256-277, 1959.
- [32] Fratzl P (ed.): *Collagen: Structure and Mechanics*. Springer Science + Business Media, LLC, 2008.
- [33] Freundl E, Steudle E, Hartung W. Water uptake by roots of maize and sunflower affects the radial transport of abscisic acid and its concentration in the xylem. *Planta* 207(1):8-19, Jul 1998.
- [34] Gawkrödger DJ. *Dermatology*, p.2., fig.2b, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002.
- [35] Gniadecka M, Farkusov Nielsen O, Christensen DH, Wulf HC. Structure of water, protein and lipids in human intact skin. *J Invest Dermatol* 110: 393-398, 1998.
- [36] Golubovic Z, Koruga Dj. Exclusion zone formation next to the surface of contact lenses. *Metalurgia International*, 17(9):101-105, 2012. ISSN: 1582-2214.

- [37] Goertz MP, Houston JE, Zhu X-Y. Hydrophilicity and the viscosity of interfacial water. *Langmuir* 23(10):5491-5497, Feb 2007.
- [38] Goswami S, Klaus S, Benziger J. Wetting and absorption of water drops on Nafion films. *Langmuir* 24(16):8627-8633, Jul 2008.
- [39] Gouy G. *J. Phys.* 4(457), 1910.
- [40] Granick S. Motions and relaxations of confined liquids. *Science* 253(5026):1374-1379, Sep 1991.
- [41] Green K, Otori T. Direct measurements of membrane Unstirred Layers. *Journal of Physiology* 207(1):93-102, Mar 1970.
- [42] Guilford H. *Chem. Soc. Rev.* 2 (2) (1973) 249.
- [43] Guo X, Imhof RE, de Rigal J. Spectroscopic Study of Water-Keratin Interactions in Stratum Corneum. *Analytical Sciences* April 2001, Vol.17 Special Issue, 2001.
- [44] Hahn MS, Tepley BA; Stevens MM, Zeitels SM, Langer R. Collagen composite hydrogels for vocal fold lamina propria restoration. *Biomaterials*, 27(2006), 1104-1109.
- [45] Handbook of Nanophysics – Clusters and Fullerenes, edited by Klaus D. Sattler, © 2011 by Taylor and Francis Group, LLC, ISBN: 978 -1-4200 -7554 -0).
- [46] Helmholtz H. *Pogg. Ann.* 89(211), 1853.
- [47] Henniker JC The depth of the surface zone of a liquid. *Rev Mod Phys* 21(2):322-34, 1949.
- [48] Heymann D. Solubility of fullerenes C-60 and C-70 in seven normal alcohols and their deduced solubility in water, *Fullerene Science and Technology* 4 (3), 509-515, 1996.
- [49] Heyrovská R, *Chem. Phys. Lett.* 429, 600 (2006).
- [50] Heyrovská R. *Chem. Phys. Lett.* 436, 287 (2007).
- [51] Hidalgo IJ, Hillgren KM, Grass GM, Borchardt RT. Characterization of the Unstirred Water Layer in Caco-2 cell monolayers using a novel diffusion apparatus. *Pharmaceutical Research* 8(2):222-227, Feb 1991.

- [52] Horn RG, Israelachvili JN. Direct measurement of structural forces between two surfaces in a nonpolar liquid. *Journal of Chemical Physics* 75(3):1400-1411, Aug 1981.
- [53] Houston JE, Michalske TA. The interfacial-force microscope. *Nature* 356:266-267, Mar 1992.
- [54] Husebo LO, Sitharaman B, Furukawa K, Kato T, Wilson J. Fullerenols revisited as stable radical anions, *Journal of the American Chemical Society* 126 (38), 12055–12064, 2004.
- [55] Institute of Medicine: Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate. Washington, DC: The National Academies Press, 2005.
- [56] Isaacs ED et al.. Covalency of the Hydrogen Bond in Ice: A Direct X-Ray Measurement, *Physical Review Letters*, Vol.82, 3: 600-603, 1999
- [57] Israelachvili JN. Direct measurements of forces between surfaces in liquids at the molecular level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(14):4722-4724, Jul 1987.
- [58] Israelachvili JN. *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd edn. Academic Press, Harcourt Brace, 1992.
- [59] Israelachvili JN, McGuiggan PM. Forces between surfaces in liquids. *Science* 241(4867):795-800, Aug 1988.
- [60] Israelachvili J, Wennerstrom H. Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. *Nature* 379:219-225, Jan 1996.
- [61] Kam NWS, O'Connell M, Wisdom JA, Dai HJ. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and nearinfrared agents for selective cancer cell destruction. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 2005, 102, 11600–11605.2.
- [62] Kamitsubo E. Motile protoplasmic fibrils in cells of the Characeae. *Protoplasma* 74:53–70, 1972.
- [63] Kettle, S.F.A., *Symmetry and structure*, John Wiley&Sons, Chichester, 1995
- [64] Klingman A. *J Am Acad Dermatology*. 21, 614-22 (1989).

- [65] Kojic D, Bojovic B, Stamenkovic D, Jagodic N, Koruga Dj. Contact Lenses Characterization by AFM MFM, and OMF. Biomedical Science, Engineering and Technology, Monograph book, Chapter 15, (2012), p.371-388.
- [66] Koruga Dj et al: Fullerine C: history, physics, nanobiology, nanotechnology. Amsterdam ; New York : North-Holland, 1993.
- [67] Koruga Đ, Tomić A. Kolagen: Nova naučna saznanja. Zbornik radova 7. Kongres kozmetičara i estetičara Jugoslavije, Hotel Hayatt, 28-29. septembar 2002, Beograd.
- [68] Koruga Dj, Miljkovic S, Ribar S, Matija L, Kojic D. Water Hydrogen Bonds Study by Opto-Magnetic Fingerprint Technique. Acta Physica Polonica A, Vol.117(5), p.777-781, 2010.
- [69] Koruga Dj, Tomic A. Method and algorithm for analysis of light-matter interaction based on spectral convolution, US Pat. App. No. 61/061, 852, 2008, PCT/US2009/030347, Publ. No: WO/2009/089292, Publ. Date: 2009-07-16.
- [70] Koruga Dj. Composition of matter containing harmonized hydroxyl modified fullerene substance, US Patent Number 8,058,483 B2, November 15, 2011.
- [71] Koruga Dj (Beograd, RS). US Patent application title: Golden Mean Harmonized Water and Aqueous Solutions. Patent application number: USA 20080219917, Publication date: 2008-09-11, PCT20120080305, Publication date: 2012-04-05
<http://www.faqs.org/patents/app/20120080305#ixzz23NLeQ5nt> (a)
- [72] Koruga Đ. Fraktalna mehanika. Klasično-kvantni pristup interakciji svetlost-materija, DonVas/Nauka, Beograd 2012. (b)
- [73] Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE. C₆₀: Buckminsterfullerene. Nature 318, 162 - 163 (14 November 1985)
doi:10.1038/318162a0
- [74] Kuijpers AJ, Engebers GHM, Feijen J, De Smedt SC, Meyvis TKL, Demeester J, Krijgsveld J, Zaat SAJ, Dankert J. Characterization of the network structure

- of carbamide cross-linked gelatin gels. *Macromolecules*, 32(1999), 3325-3333.
- [75] Kunimatsu K, Bae B, Miyatake K, Uchida H, Watanabe M. ATR-FTIR study of water in Nafion membrane combined with proton conductivity measurements during hydration/dehydration cycle. *Journal of Physical Chemistry B* 115(15):4315-4321, Apr 2011.
- [76] Langa F, Nierengarten J-F. *Fullerenes Principles and Applications*, RCS Publishing, Cambridge, U.K., 2007.
- [77] Ling GN. *A Revolution in the Physiology of the Living Cell*. Krieger Publishing Company, Malabar, 1992.
- [78] Lu Z, Polizos G, Macdonald DD, Manias E. State of water in perfluorosulfonic ionomer (Nafion 117) proton exchange membranes. *Journal of The Electrochemical Society* 155(2):B163-B171, Dec 2008.
- [79] Lyon D.e.Y, Adams L.a.K, Falkner JC, Alvarez P.e.J. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size, *Environmental Science and Technology*, 40 (14), 4360–4366, 2006.
- [80] Majsztrik P, Bocarsly A, Benziger J. Water permeation through Nafion membranes: the role of water activity. *Journal of Physical Chemistry B* 112(51):16280-16289, Oct 2008.
- [81] Marcus Y, Smith AL, Korobov MV, Mirakyan AL, Avramenko NV, Stukalin EB, Solubility of C₆₀ fullerene, *Journal of Physical Chemistry B* 105, 2499–2506, 2001.
- [82] Mauritz KA, Moore RB. State of understanding of Nafion. *Chemical Reviews* 104(10):4535-4585, Oct 2004.
- [83] Martin CR, Kohli P. The emerging field of nanotube biotechnology. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2003, 2, 29–37.
- [84] Matija L, Koruga Dj, Jovanovic J, Dobrosavljevic D, Ignjatovic N. In vitro and in vivo investigation of collagen - C₆₀(OH)₂₄ interaction. *Materials Science Forum*, Vol.453-454, p.557-563, 2004.

- [85] Matija L, Koruga, Dj. Golden mean as a driving force of self-assembly, in: 10th *Foresight Conference on Molecular Nanotechnology*, pp. 42-43, 2002 11-13 October 2012, Bethesda, Maryland, USA.
- [86] Matolsky AG, Downes AM, Sweeney TM. Studies of the epidermal water barrier. Part II. Investigations of the chemical nature of the water barrier. *J Invest Dermatol* 50:19-26, 1968.
- [87] Miljković, S., Koruga,Dj.,Bandić, J., Dobrosavljević,D., Matija, L., Inovacije u nezi kože, Zbornik III Simpozijum Zaštita od UV zračenja,st. 6-10, Beograd, 2009.
- [88] Miller AJ. Chemistry of collagens and their distributions. In K.A. Piez, A.H. Reddi, eds., *Extracellular Matrix Biochemistry*, p.41-82 (Elsevier, New York, 1984).
- [89] Mollenhauer HH, Morre DJ. Structural compartmentation of the cytosol: zones of exclusion, zones of adhesion, cytoskeletal and intercisternal elements. In: Roodyn DB (ed.) *Subcellular Biochemistry*, vol. 5, Plenum Press, New York, pp. 327–362, 1978.
- [90] Morimoto T. Thermoregulation and body fluids: role of blood volume and central venous pressure. *Jpn J Physiol*40:165– 179, 1990.
- [91] Mujovic M. Značaj voda u održavanju homeostatske harmonije organizma. Narodna knjiga, 117-145, 1996.
- [92] McCane KL, Huether SE. *Pathophysiology – The Biologic Basis for Disease in Adults and Children*. Third Edition, Mosby – Year Book, Inc., 1998.
- [93] Nielsen B, Hales JR, Strange S, Christensen NJ, Warberg J, Saltin B. Human circulatory and thermoregulatory adaptations with heat acclimation and exercise in a hot, dry environment.*J Physiol*, 460:467– 485, 1993.
- [94] OstiguyC, Soucy B, Lapointe G, Woods C, Ménard L, Trottier M. *Health Effects of Nanoparticles*. Second edition, Bibliothèque et Archives nationales 2008 ISBN: 978-2-89631-320-4.
- [95] Pauling L. *The nature of the Chemical Bond*, Cornel University Press, Ithaca NY 1939.

- [96] Pierard GE, the EEMCO Group. EEMCO guidance to the in vivo assesment of tensile functions of the skin. Part5 1: relevance of the structures and ageing of the skin and subcutaneous tissues. *Skin Pharmacol Appl Skin Pjysiol* 1999; 12: 352-362.
- [97] Pierard GE. A critical approach to in vivo mechanical testing of the skin. In: Leveque JL, ed. „Cutaneous Investigation in Health and Disease“, Ch. 10, pp. 215-240, 1989.
- [98] Pilgram GSK, Van Felt AME, Bouwstra JA, Koerten HK. Electron diffraction provides new information on stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature. *Journal of Investigative Dermatology* 113:403-409, 1999.
- [99] PlumridgeT, WaighRJ. *Pharmacy & Pharmacology* 54, 1155, 2002.
- [100] Pohl P, Saporovand SM, Antonenko YN. The size of the Unstirred Layer as a function of the solute diffusion coefficient. *Biophysical Journal* 75(3):1403-1409, Sep 1998.
- [101] Pollack GH. *Cells, Gels and the Engines of Life*. Ebner & Sons, Seattle, 2001.
- [102] Pollack GH. The role of aqueous water interfaces in the cell. *Advances in Colloid and Interface Science* 103(2):173-196, Apr 2003.
- [103] Pollack GH. *Water and the cell*. Springer, 2006.
- [104] Pollack GH, Cameron IL, Wheatley DN (ed.). *Water and the Cell*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 165–174, 2006.
- [105] Pollack GH, Chin WC. *Phase Transitions in Cell Biology*. Springer Science, 2008.
- [106] Pollack GH, Clegg J. Unexpected linkage between unstirred layers, Exclusion Zones and water. *Phase Transitions in Cell Biology*, pp 143-152. Ed: GH Pollack, and W-C Chin, Springer, 2008.
- [107] Projekt III45009 Ministarstva za prosvetu i obrazovanje 2011-2014, Rukovodilac projekta prof.dr Đuro Koruga.
- [108] Prydal JI, Artal P, Woon H, Campbell FW. Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33:2006–2011.

- [109] Rakocevic M. Genetic code as a Golden mean determined system, *Biosystems*, Vol. 46, pp. 283-291, 1998.
- [110] Raković i sar. *Biomaterijali*. Institut tehničkih nauka srpske akademije nauka i umetnosti: Društvo za ispitivaje materijala, Beograd, 2010.
- [111] Raman A, Schoeller DA, Subar AF, Troiano RP, Schatzkin A, Harris T, Bauer D, Bingham SA, Everhart JE, Newman AB, Tylavsky FA. Water Turnover in 458 American Adults 40-79 yr of age. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F394-F401, 2004.
- [112] Rawlings AV, Hope J, Watkinson AW, Harding CR, Egelrud T. The biology effect of glycerol. *J Invest Dermatol* 100:526-530, 1993.
- [113] Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser P. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 103:731-740, 1994.
- [114] Rinzler AG, Hafner JH, Nikolaev P, Lou L, Kim SG, Tomanek D, Nordlander P, Colbert DT, Smalley RE. Unraveling nanotubes - Field emission from an atomic wire, *Science* 269 (5230), 1550–1553, 1995.
- [115] Ruan C-Y, Lobastov VA, Vigliotti F, Chen S, Zewail AH. Ultrafast electron crystallography of interfacial water. *Science* 304(5667):80-84, Apr 2004.
- [116] *Human physiology. An Integrated Approach*. Dee Unglaub Silverthorn. Third Edition. University of Texas – Austin. Pearson Education, Inc. 2004. ISBN: 0-8053-5957-5.
- [117] Sha'afi RI, Rich GT, Sidel VW, Bossert W, Solomon AK. The effect of the Unstirred Layer on human red cell water permeability. *Journal of General Physiology* 50(5):1377-1399, May 1967.
- [118] Shahar M, Meshulam H, Margel S. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 24 (1986) 203.
- [119] Shirreffs SM, Maughan RJ. Volume repletion after exercise-induced volume depletion in humans; replacement of water and sodium losses. *Am J Physiol* 274(5 Pt 2): F868-F875, 1998.
- [120] Simonetti O, Hoogstraate AJ, Bialik W, Kempenaar JA, Schrijvers AHGJ, Bodde HE, Ponc M. Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy. *Arch Dermatol Res* 287:465-473, 1995.

- [121] Smith M, March J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, mechanisms, and Structure*, 6th, New York: Wiley-Interscience. ISBN 0-471-72091-7, 2007.
- [122] Stamenković D, *Istraživanje i razvoj gaspropusnih nanofotonskih kontaktnih sočiva na bazi polimetilakrilata i fulerena*. Doktorska disertacija, mentor: prof.dr Koruga Đ, Mašinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2012.
- [123] Stavros AK, Costas AA. *Water Physiology: Essentiality, Metabolism, and Health Implications Nutrition Today*, Volume 45, Number 6S, November/December, 2010.
- [124] Stebbings H, Willison JHM. *Structure of microtubules: a study of freeze-etched and negatively stained microtubules from the ovaries of Notonecta*. *Z. Zellforsch u Mikrosk Anat* 138(3):387–396, 1973.
- [125] Stebbings H and Hunt C *The nature of the clear zone around microtubules*. *Cell and Tissue Res* 227:609–617, 1982.
- [126] Tsenkova R. *AquaPhotomics: water absorbance pattern as a biological marker for disease diagnosis and disease understanding*. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, vol. 18, issue 2, p. 14-16, 2007.
- [127] Tsenkova R. *Introduction: Aquaphotomics: dynamic spectroscopy of aqueous and biological systems describes peculiarities of water*. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, Volume 17 Issue 6, p.303–313, 2009.
- [128] Vander A, Sherman J, Luciano D. *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function* Eight Edition. McGraw-Hill, New York, 2001.
- [129] Van Duzee BF. *Thermal analysis of human stratum corneum*. *J Invest Dermatol* 65:404-408, 1975.
- [130] Van Oss CJ. *Acid-base interfacial interactions in aqueous media*, *Colloids and Surfaces A* 78, 1, 1993.
- [131] Verwey EJW, Overbeek JThG. *Theory of the stability of lyophobic colloids*. *The Journal of Physical Chemistry* 51(3):631-636, Mar 1947.
- [132] Vilenko B, Marcoux PR, Lekka M, Sienkiewicz A, Feher T, Forro L. *Spectroscopic and photophysical properties of a highly derivatized C-60 fullerol*, *Advanced Functional Materials* 16 (1), 120–128, 2006.

- [133] Wan-Ho M. The Rainbow And The Worm. The Physics of Organisms. World Scientific Publishing Co.Pte. Ltd, 2008.
- [134] Warner RR, Stone KJ, Boissy YL. Hydration disrupts human stratum corneum ultrastructure. *Journal of Investigative Dermatology* 120(2):275-284, 2003.
- [135] Weitzman RE, Kleeman CR. The clinical physiology of water metabolism- Part I: The physiologic regulation of arginine vasopressin secretion and thirst (Medical Progress). *West J Med* 131:373-40 Nov 1979.
- [136] Wiesner MR, Lowry GV, Alvarez P, Dionysiou D, Biswas, P. Assessing the risks of manufactured nanomaterials, *Environmental Science and Technology*, 4336–4345, 2006.
- [137] Winter B, Aziz EF, Hergenbahn U, Faubel M, Hertel IV. Hydrogen bonds in liquid water studied by photoelectron spectroscopy, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 124504.
- [138] Xiang G, Zhang J, Zhao Y, Tang J, Zhang B, Gao X, Yuan H, Qu L, Cao W, Chai Z, Ibrahim K, Su R. *Journal of Physical Chemistry B* 108 (11), 473, 2004.
- [139] Yamamura T, Tezuka T. The water holding capacity of the stratum corneum measured by ¹H-NMR. *J Invest Dermatol*, 93: 160-168, 1989.
- [140] Yu D, Xue D, Ratajczak H, *J. Mol. Struct.* 783, 210 (2006).
- [141] Zhao Q, Zheng J-M, Chai B, Pollack GH. Unexpected effect of light on colloidal crystal spacing. *Langmuir* 24(5):1750-1755, Jan 2008.
- [142] Zheng J-M, Pollack GH. Long-range forces extending from polymer-gel surfaces. *Physical Review Letters* E 68(3):0314081-0314087, Sep 2003.
- [143] Zheng J-M, ChunW-C, KhijniakE, KhijniakE Jr., PollackGH. Surfaces and interfacial water: evidence that hydrophilic surfaces have long-range impact. *Advances in Colloid and Interface Science* 127(1):19-27, Nov 2006.
- [144] Zhu Y, Granick S. Viscosity of interfacial water. *Physical Review Letters* 87(9):0961041-0961044, Aug 2001.
- [145] <http://www.lsbu.ac.uk/water/molecule.html>
- [146] www.tdsmeter.com/what-is?id=0015
- [147] www.aquatechnology.net/industrial_deionization.html

- [148] www.pakwatercare.org/technical/filtration-method/filtration-methods/
- [149] www.apswater.com/article.asp?id=302&title=Conductivity_Vs._Resistivity_Vs_P.P.M._Quick_Chart
- [150] www.polysciences.com/Catalog/Department/Product/98/categoryId_322/productId_542/
- [151] www.bangslab.com
- [152] www.allaboutvision.com/contacts/rgps.htm
- [153] https://www.orthoworld.com/index.php/publications/view_article/221558
- [154] http://www.rephile.com/news/newsDetail_148.html
- [155] www.alexandria.healthlibrary.ca/documents/notes/bom/unit_1/L-36%20Skin-1%20Collagen%20and%20Extracellular%20Matrix.xml
- [156] http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nafion_structure.png
- [157] <http://clarkie5.wikispaces.com/>

10. PRILOZI

Prilog 1 - Trideset osam anomalija vode

Obično se tvrdi da život zavisi od anomalnih svojstava vode. Posebno, veliki toplotni kapacitet i visok nivo vode u organizmu doprinose termičkoj regulaciji i prevenciji od lokalnih temperaturnih fluktuacija. Visoka latentna toplota isparavanja doprinosi sprečavanju dehidracije i značajnom hlađenju pri isparavanju. Voda je izvrstan rastvarač zahvaljujući svojoj polarnosti, visokoj dielektričnoj konstanti i maloj veličini posebno za jonske i polarne sastave. Ona ima jedinstvene hidratacione osobine koje su bitne za bio-makromolekule (posebno za proteine i nukleinske kiseline) tako određujući njihovu trodimenzionalnu strukturu, a samim tim i njihove uloge u rastvorima. Voda jonizuje i stvara protonsku razmenu između molekula doprinoseći jonskim interakcijama u biologiji.

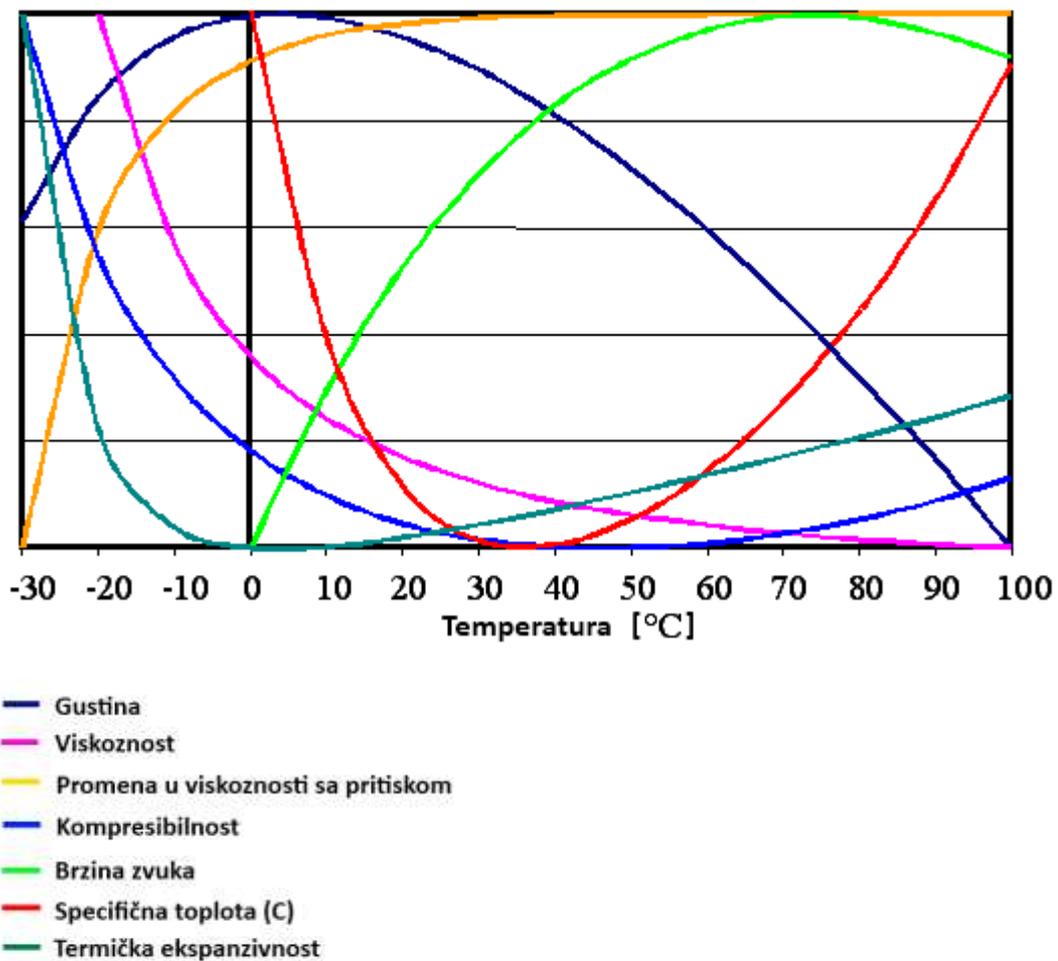
Maksimalna gustina na 4°C i manja gustina leda rezultiraju u sledećem: zamrzavanje reka, jezera, okeana, je od vrha ka dnu, tako da se štiti voda od daljeg zamrzavanja i dopušta se lako topljenje, veliki toplotni kapacitet okeana i mora dopušta im da se ponašaju kao toplotni rezervoari tako da temperatura okeana varira samo za trećinu u odnosu na temperaturu kopna tako da modelira našu klimu. Kompresija vode snižava nivo mora za oko 40m dajući nam 5% više kopna.

Anomalije :

1. Voda ima neočekivano visoku tačku topljenja. (0°C)
2. Voda ima neočekivano visoku tačku ključanja.(100°C)
3. Voda ima neočekivano visoku kritičnu tačku. (374°C)
4. Voda ima velik površinski napon i može da odskače.(72,75mJ/m² na 20°C)
5. Voda ima neočekivano veliku viskoznost.(0.89 cP na 25°C)

6. Voda ima neočekivano veliku toplotu isparavanja (40.7kJ/mol)
7. Voda se skuplja pri topljenju.
8. Voda ima veliku gustinu koja raste sa zagrijavanjem (3,984°C)
9. Broj susednih članova raste pri topljenju.
10. Broj susednih članova raste sa temperaturom
11. Pritisak snižava tačku topljenja (13.35 MPa daje tačku topljenja od -1°C)
12. Pritisak smanjuje temperaturu maksimalne gustine
13. D₂O i T₂O se razlikuju u svojim fizičkim svojstvima više nego što se očekivalo od njihovog povećanja mase (njihove temperature maksimalne gustine su 11.185°C i 13.4°C respektivno).
14. Voda pokazuje povećanje viskoznosti sa porastom temperature
15. Viskoznost vode opada sa porastom pritiska (na temperaturi ispod 33°C)
16. Voda ima malu kompresibilnost (0.46 Gpa⁻¹ na 20°C)
17. Kompresibilnost opada kako temperatura raste sve do minimuma na 46,5°C. Ispod ove temperature vodu je lakše kompresovati kad temperatura opada.
18. Voda ima nizak koeficijent ekspanzije (termičke ekspanzije) (0.00021/°C)
19. Termička ekspanzija vode opada (postaje negativna) na nižim temperaturama.
20. Brzina zvuka raste sa temperaturom (maksimum na 73°C)
21. Voda ima preko dva puta veći specifični toplotni kapacitet u odnosu na led ili paru. ($C_{p \text{ tečno}} = 1.03 \times C_{p \text{ čvrsto}}$)
22. Specifični toplotni kapacitet (C_p i C_v) su neočekivano veliki (C_v i $C_p = 4.18\text{J/gK}$)

23. Specifični toplotni kapacitet C_p ima minimum na 36°C
24. NMR spin-rešetke relaksacije je veoma mali na ni`im temperaturama
25. Rastvori imaju različite efekte na viskoznost i gustinu
26. Nijedan rastvor se nije ni približio termodinamičkoj idealnosti čak ni D_2O nije idealan
27. Difrakcija X-zraka pokazuje neobično kompleksnu strukturu
28. Superhladna voda ima 2 faze i druga kritična tačka je na oko -50°C
29. Tečna voda može biti superohlađena, u vidu malih kapljica, do oko -70°C , ona može se dobiti iz staklastog amorfno g leda između -123°C i -149°C i može koegzistirati sa kubičnim ledom na -63°C
30. Čvrsta voda ima širok varijetet stanja (i metastanja) kristala i amorfni h struktura više od bilo kog materijala
31. Vrela voda se može brže zamrznuti od hladne vode; Mpemba efekat
32. Refrakcioni indeks vode ima maksimalnu vrednost na 0°C
33. Rastvorljivost nepolarnih gasova u vodi opada do određenog minimuma, a zatim raste
34. Na niskim temperaturama, samodifuzija vode opada kako gustina i pritisak opadaju
35. Toplotna provodnost vode raste do maksimuma na oko 130°C i posle toga opada
36. Pokretljivost protona i hidroksidnog jona u električnom polju je veoma brza
37. Toplota fuzije vode pokazuje maksimum na -17°C
38. Dielektrična konstanta je visoka (78.4 na 25°C)



Slika 10.1: Dijagram osobina vode.

Prilog 2 - Otpornost i provodljivost vode

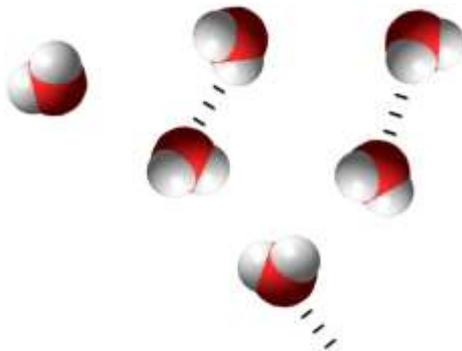
$$\frac{1}{\text{megohm}} = \text{microsiemens (microhm)} \qquad \frac{1}{\text{microsiemens (microhm)}} = \text{megohm}$$

Slika 10.2: Konverzija jedinica.

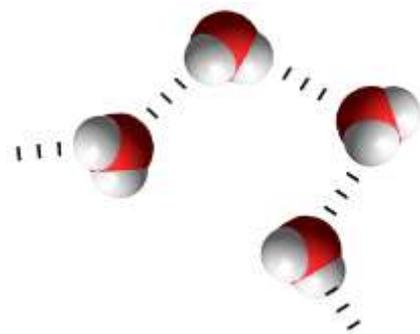
Tabela 10.1: Veza između vrednosti otpornosti i provodljivosti.

| Otpornost (ohm) | Provodljivost (microsiemens) |
|-----------------|------------------------------|
| 18.000.000 | 0,055 |
| 10.000.000 | 0,1 |
| 100 | 10 |
| 2 | 500 |
| 200 | 5 |
| 20 | 50 |

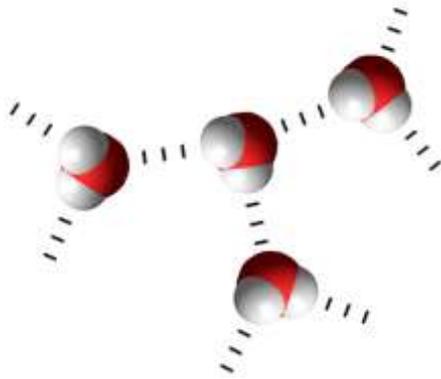
Prilog 3 - Vodonične veze



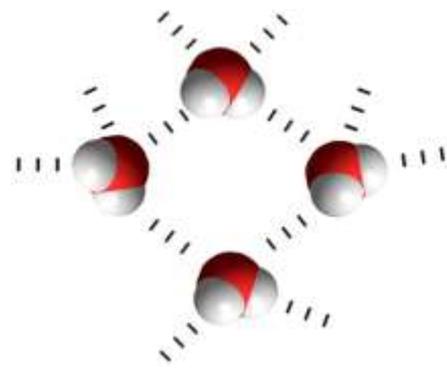
Slika 10.3: Samo jedna OH veza je aktivna po molekulu vode.



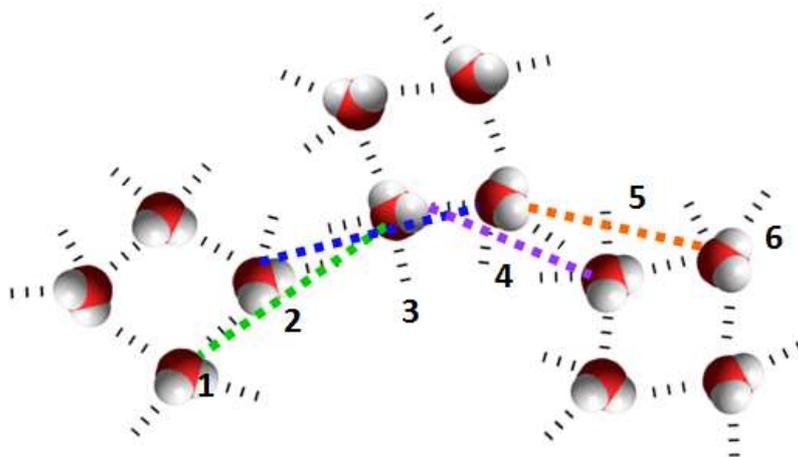
Slika 10.4: Dve OH veze su aktivne po molekulu vode.



Slika 10.5: Tri OH veze aktivne po molekulu vode.



Slika 10.6: Četiri OH veze aktivne po molekulu vode.



Slika 10.7: Preklapajuće vodonične veze.

Klasično ponašanje: 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6

Klasično-kvantno ponašanje: 1-2-3, 2-3-4, 3-4-5, 4-5-6 (preklapajuće vodonične veze)

11. BIOGRAFIJA

Zorana Golubović rođena je 14.04.1982. godine u Beogradu. Osnovnu školu i XI beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu sa odličnim uspehom. Diplomirala je u januaru 2006. godine sa diplomskim radom na temu „Modelovanje metodom konačnih elemenata sa strukturnim analizama“, na odseku za Vazduhoplovno inženjerstvo na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Po diplomiranju januara 2006. godine zaposlila se u firmi „Vitalek“, a zatim u „Aquatech“ gde se bavila filtracijom i tretmanom vode, a 2007. godine se zaposlila u firmi „Würth“ gde je radila kao asistent direktora sektora. Od 2008. godine do decembra 2010 je saradnik na projektima u Inovacionom centru Mašinskog fakulteta, kao i saradnik u nastavi na smeru Biomedicinsko inženjerstvo na predmetima: Biomehanika tkiva i organa, Anatomija i fiziologija čoveka za inženjere, Projekovanje biomedicinskih aparata i uređaja, Osnove biomedicinskog inženjerstva, Stručna praksa BSc i Stručna praksa MSc. Od januara 2011. godine je zaposlena na Mašinskom fakultetu u Beogradu kao saradnik na projektima na odseku za Biomedicinsko inženjerstvo: „Razvoj novih metoda i tehnika za ranu dijagnostiku kancera grlića materice, debelog creva i melanoma na bazi digitalne slike i ekscitaciono-emisionih spektara u vidljivom i infracrvenom domenu - III45009“ i „Funkcionalizacija nanomaterijala za dobijanje nove vrste kontaktnih sočiva i ranu dijagnostiku dijabetesa - III41006“. Bila je istraživač na ISHEDS Tempus projektu Univerziteta u Beogradu u periodu od 2009 do 2011. godine. U periodu od 4 meseca 2011. godine boravila je na jednom od najprestižnijih svetskih univerziteta Univerzitetu Vašington, Sijetl, SAD, na katedri za Bioinženjering pod mentorstvom prof.dr Džeralda Polaka dobitnika „Pirogine“ nagrade, u cilju istraživanja neophodnih za izradu ove doktorske disertacije. Autor je i koautor 17 radova, koji su saopšteni na naučnim skupovima ili objavljeni u časopisima različitih kategorija, a koautor je na 6 radova vrhunskog i istaknutog međunarodnog značaja. Aktivno se služi engleskim jezikom, a koristi se španskim i nemačkim jezikom.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Зорана Голубовић

број индекса Д10/05

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ИСТРАЖИВАЊЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ ДЕЈОНИЗОВАНЕ ВОДЕ СА ХИДРОФИЛНИМ И ХИДРОФОБНИМ МАТЕРИЈАЛИМА, БИОМОЛЕКУЛИМА И ХИДРОГЕНИЗОВАНИМ УГЉЕНИЧНИМ НАНОМАТЕРИЈАЛИМА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Зорана Голубовић

Број индекса Д10/05

Студијски програм Биомедицинско инжењерство

Наслов рада ИСТРАЖИВАЊЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ ДЕЈОНИЗОВАНЕ ВОДЕ СА ХИДРОФИЛНИМ И ХИДРОФОБНИМ МАТЕРИЈАЛИМА, БИОМОЛЕКУЛИМА И ХИДРОГЕНИЗОВАНИМ УГЉЕНИЧНИМ НАНОМАТЕРИЈАЛИМА

Ментор Проф.др Ђуро Коруга

Потписани/а Зорана Голубовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ИСТРАЖИВАЊЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ ДЕЈОНИЗОВАНЕ ВОДЕ СА ХИДРОФИЛНИМ И ХИДРОФОБНИМ МАТЕРИЈАЛИМА, БИОМОЛЕКУЛИМА И ХИДРОГЕНИЗОВАНИМ УГЉЕНИЧНИМ НАНОМАТЕРИЈАЛИМА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду