

# Fotobiologie

Úvodní přednáška

A. Lojek

# Fotobiologie

---

Fotobiologie je biologickou vědní disciplínou, která studuje interakce světla (a neionizujícího elektromagnetického záření) s živými organismy.

Zahrnuje prospěšné i škodlivé účinky světla.

---

Fotobiologové studují:

- mechanismy těchto interakcí
  - jejich využitelnost pro léčbu chorob
  - jak chránit organismus před škodlivými účinky světla
- 

Studijní literatura - ???

*Digital Photobiology Compendium*

## Podobory fotobiologie

V materiálu *Digital Photobiology Compendium* (American Society for Photobiology)) je obor **fotobiologie** rozdělen do 12 podoborů.

11 podoborů se týká absorpce světla

1 podobor naopak emise světla živými organismy (bioluminescence).

# 1. Fotofyzika

Fyzikální interakce světla (a neionizujícího EM záření) s materiály na atomové a molekulární úrovni.

Fotofyzikální reakce zahrnují:

- ❖ Rozptyl
- ❖ Absorpci
- ❖ Formování excitovaných stavů

Význam podoboru:

Výzkum podstaty fotochemických a fotofyzikálních dějů a aplikace získaných poznatků pro pochopení fotobiologických dějů

Praktické aplikace fotofyziky:

- ✓ Design a výzkum materiálů a zařízení užitečných v nanotechnologiích
- ✓ Ukládání počítačových informací

## 2. Fotochemie

Studium chemických změn, které se objeví v molekulách po přímé absorpci světla, a reakcí mezi molekulami absorbujícími světlo s molekulami okolními.

Příklad:

Tvorba fotochemického smogu v troposféře (spodní vrstva atmosféry). Fotochemický smog je výsledkem interakce UV záření (ze slunečního světla) s oxidy dusíku a uhlovodíky především z výfukových plynů. Fotochemický smog vyvolává podráždění očí a špatnou viditelnost.

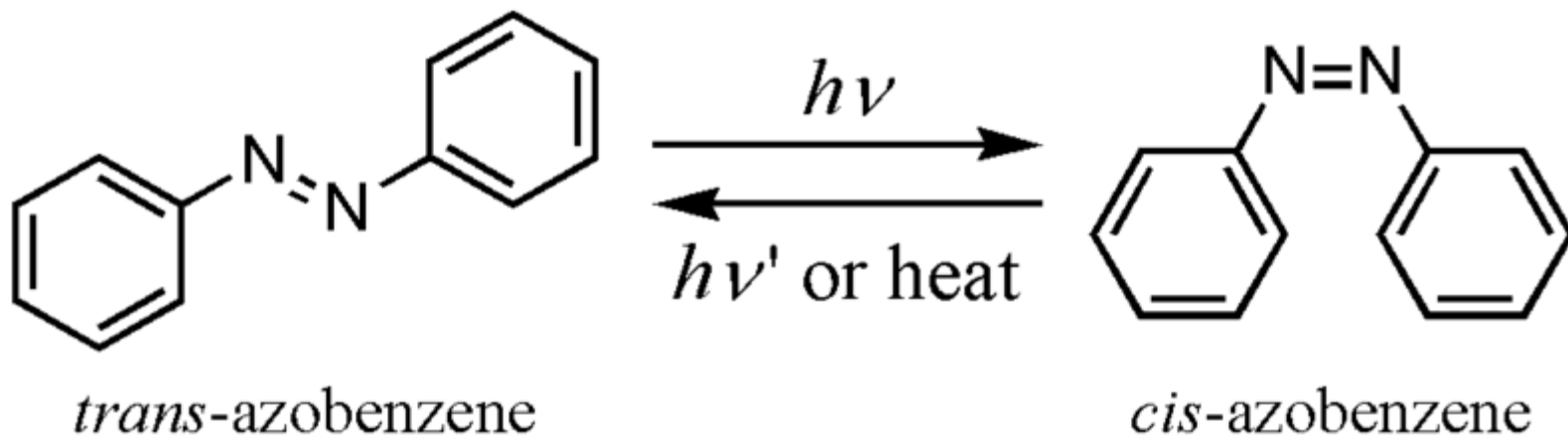
Příklad využití fotofyziky a fotochemie - nanotechnologie

## Mikromotorek se světelným pohonem

2002 - němečtí vědci z univerzity v Mnichově uvedli do chodu mechanismus sestávající z jediné molekuly, roztáčený světlem.

Konstrukčním materiálem nanomotoru se stal syntetický polymer azobenzenu, jehož molekula obsahuje pár dusíkových atomů s benzenovým jádrem navázaným na každé straně. Jakmile na dusíkový můstek začne působit světlo určité vlnové délky, narovná se – přechod z *trans*- do *cis*-konformace – změna délky molekuly. Světlo o jiné vlnové délce jej opět vrátí do staženého stavu. Vědci zkusili využít tento vratný pohyb ke konání užitečné práce.

Nanomotorek podává neskutečně nízký výkon: při každém taktu se vyvine práce jen  $4,5 \times 10^{-20}$  joule. Jednomolekulový mechanismus se přesto může uplatnit v měřítcích nanosvěta - dala by se jím například pohánět miniaturní čerpadla v budoucích tělových implantátech.



### 3. Fotosensitizace

Je to proces, ve kterém se v jedné nebo více molekulách projeví fotochemické a fotofyzikální alterace jako následek absorpce světla v jiné molekule nazývané fotosensitizér.

Prakticky všechny organismy obsahují endogenní molekuly – potencionální fotosensitizéry:

- ✓ Bilirubin
- ✓ Chlorofyl (metaloporfyrin vázající  $Mg^{2+}$ )
- ✓ Porfyriny v biosyntéze hemu (metaloporfyrin vázající  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ )

#### **Hemoproteiny**

Hem je nejvýznamnějším metaloporfyrinem. Tvoří prostetickou skupinu v mnoha životně důležitých enzymech, jako jsou například:

Hemoglobiny

Myoglobiny

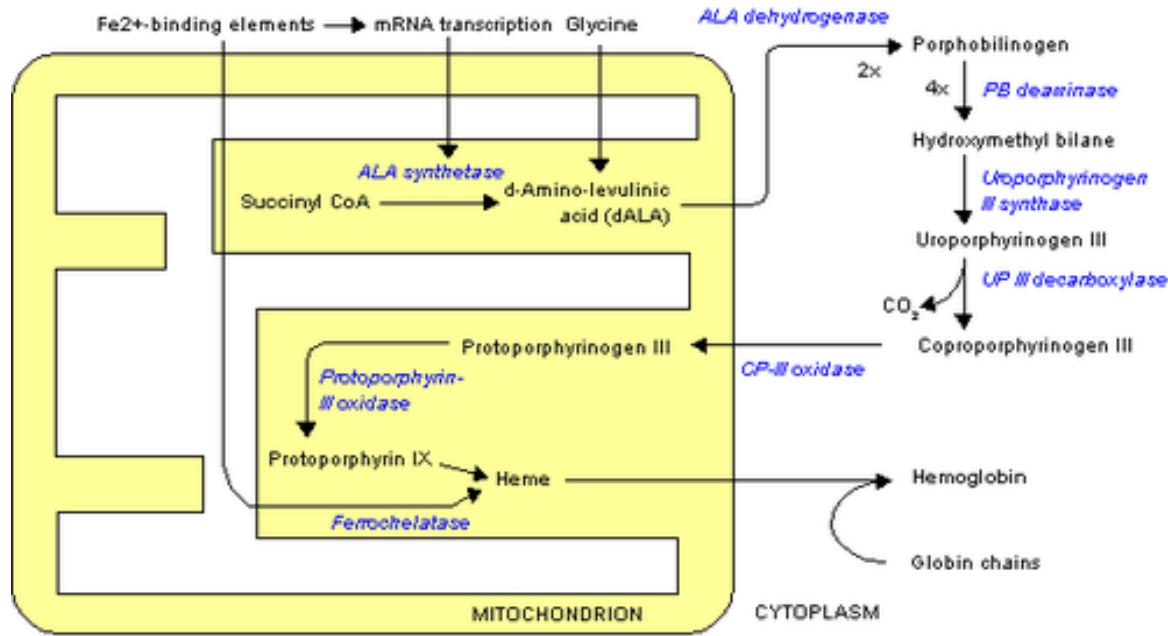
Cytochromy

    Cytochrom c

    Cytochrom P-450

Katalázy

# Porfyrinový metabolismus – vznik hemu



Fotodynamická terapie využívá fotosensitizující léky a světlo.

Používá se především v nádorové terapii (např. nádory plic, jícnu) – destruuje nádorové buňky.



## 4. Účinky UV záření

Fotofyzikální a fotochemické změny vyvolané účinkem UV radiace na DNA, RNA a proteiny.

Biologické důsledky těchto změn (letalita, mutace).

Biochemické a molekulárně biologické pochody vedoucí k nápravě fotochemicky poškozené DNA.

Snížená hladina ozónu ve stratosféře vede ke zvýšené intenzitě UV záření >>>> zvýšení zájmu o tyto efekty a jejich prevenci

UV záření je dobře známý zdroj různých forem rakoviny kůže. V současné době se intenzivně diskutuje podíl UV-B (280-320 nm) a UV-A (320-400 nm) na vzniku melanomu. Výsledky jsou využitelné ve výrobě protektivních prostředků.

## 5. Environmentální fotobiologie

Efekt radiace na celé organismy a na přežívání, složení a produktivitu druhů v přírodě, zemědělství a různých ekosystémech.

## 6. Fotomedicína

Zabývá se účinky záření na lidské zdraví a využitím záření pro léčbu chorob.

Zahrnuje:

- ✓ vznik nádorů po UV radiaci
- ✓ modulaci imunitního systému zářením (fotoimunologie)
- ✓ léčení SAD (Seasonal Affective Disorder) světelnou terapií
- ✓ použití světla spolu s fotosensitizéry k léčení chorob jako psoriáza, nádory apod.

## 7. Cirkadiánní rytmy

Jsou to cyklické změny v biochemii, fyziologii a chování.

Perioda změn je 24 hodin. Tyto rytmy mohou být ovlivněny změnou expozicí světlu.

## 8. Vidění

Vidění je smyslovým vjemem, který je zprostředkovaný okem a centrálním nervovým systémem živočichů. Tento systém umožňuje vnímání tvaru objektů

Podobor zahrnuje:

- ✓ zkoumání struktury a fotochemie pigmentů
- ✓ biochemické a fyziologické změny, které následují po aktivaci pigmentů vidění
- ✓ psychofyziku – vliv světla na mentální procesy

## Škodlivé účinky UV záření pro zrak:

- **keratitis**, zánětlivé onemocnění oční rohovky, dělí se na povrchovou keratitidu a hlubokou keratitidu a projevuje se buď pouze zánětlivými ložisky na krajích rohovky nebo rohovkovým vředem šířícím se do okolí, případně může postihnout celou tkáň rohovky a způsobit trvalou ztrátu její průhlednosti. Akční spektrum pro keratitis podle DIN 5031 nabývá maxima pro vln.délku 270 nm.

- **konjunktivitis**, zánětlivé onemocnění oční spojivky, projevující se překrvením spojivkových cév, zvýšeným slzením a hlenovitou nebo hnisavou sekrecí.

Stejně jako u keratitidy se jedná převážně o oblast UVC. Maximální vlnová délka, která tuto reakci vyvolává je 260 nm.

- **katarakta**, šedý zákal, porucha průhlednosti oční čočky vlivem fotochemických reakcí, projevuje se zhoršením zrakové ostrosti. Akční spektrum pro šedý zákal lidského oka nebylo dosud určeno, neboť katarakta má dlouhou skrytou fázi a zakalování oční čočky probíhá velmi pomalu. UV záření je jedním z hlavních rizikových faktorů při rozvoji katarakty.

- **poškození sítnice**, představuje nepříznivé účinky UV záření na buňky sítnice. Poškození je navozováno již krátkodobým zářením (350 - 780 nm) a to cestou jak fotochemickou, tak termicky.

# Ochrana zrakového orgánu

Může být realizována pomocí různých materiálů, které brání přímému působení záření.

Tuto úlohu splňují nejlépe **protisluneční brýle**, které mohou být zhotoveny ze skla, ale i z plastových materiálů.

Účinnost materiálu roste s nanesením speciálního UV filtru. Praktická měření spektrální propustnosti protislunečních brýlí (jak skleněných, tak plastových), ukázala, že v oblasti UVA záření brýle propouští maximálně 2 - 3 % záření, což je zcela akceptovatelná hodnota. V oblasti UVB a UVC záření je materiál brýlí zcela absorpční.

Brýle s nanesenou odraznou vrstvou dosahují nejnižší propustnosti v oblasti UVA záření, a to maximálně 0,5 % .

**Protisluneční brýle jsou tedy nezbytným ochranným prostředkem při pobytu na slunci, neboť chrání oči:**

- před nežádoucími účinky UV záření
- před nadměrnými jasovými kontrasty (před oslněním)
- před nadměrnými účinky infračerveného záření (tepelné záření)

## **9. Fotomorfogeneze**

Zabývá se vlivem radiace na vývoj organismů, typicky na vývoj rostlin a hub (zrání semen, vývoj květů, indukce a vývoj reprodukčního ústrojí u hub).

Různé rostliny vyvíjejí květy v různých ročních obdobích. Je to způsobeno interakcí druhově specifických molekul s fytochromy – důležitými fytomorfogenetickými pigmenty u rostlin.

## **10. Fototaktický pohyb**

Radiace kontroluje pohyb mnoha rostlin, mikrobů, hub a nižších živočichů.

Příkladem je fototropismus – otáčení rostlin za sluncem.

Fototaxe – je to pohyb mobilního organismu vzhledem ke směru světla.

# 11. Fotosyntéza

Fotosyntéza je proces transdukce energie, ve kterém je sluneční energie konvertována na energii biochemickou.

Objevuje se u rostlin a některých mikrobů.

Tento proces zahrnuje absorpci světla chlorofylem nebo jinými pigmenty, transfer energie do jiných molekul a akumulaci energeticky bohatých molekul (škrob).

# 12. Bioluminiscence

Bioluminiscence je emise světla z biochemických reakcí, které se objevují v živých organismech.

Nejznámější příklad - světluška.

Bioluminiscence však je fylogeneticky rozšířený fenomén, který se rozvíjel nezávisle u mnoha živočichů a mikrobů.

# Světlo

Je formou energie. Ke vzniku světla je zapotřebí dodat jinou formu energie. Obvykle se tak děje dvěma způsoby:

## I. Incandescence

Je světlo vzniklé z tepelné energie (vlákno v žárovce, pec, slunce)

## II. Luminiscence

Je „studené světlo“, vznikající ve fyziologických nebo nižších teplotách. Dodaná energie „vykopne“ elektron z atomu do vyšší energetické hladiny (excitovaný stav). Poté elektron vyzáří dodanou energii ve formě světla a vrátí se zpět do základního stavu.



Existuje několik způsobů luminiscence:

1. Fluorescence a Fotoluminiscence – jsou to formy luminiscence, kde energie je dodána elektromagnetickým zářením

*Fotoluminiscencí je nazývána jakákoliv L z elektromagnetického záření*

*Fluorescence je luminiscence vyvolaná UV zářením*

*Pozor: Nezaměňovat fotoluminiscenci s odrazem, lomem nebo rozptylem světla*

2. Chemiluminiscence je L, kde energie je dodávána chemickou reakcí

3. Bioluminiscence je L, kde energie je dodávána chemickou reakcí v živých organismech

4. Elektroluminiscence je luminiscence způsobená elektrickým proudem (katodoluminiscence).

Další příklady:

5. Radioluminiscence (ciferník hodinek)

6. Triboluminiscence (spuštěna mechanicky – tlakem)

7. Fosforescence (opožděná luminiscence – TRAP elektronu),

# Hlavní biologické účinky světla

Světlo je nezbytná součást fotosyntézy – světlo je nezbytné pro růst rostlin

Světlo interaguje s buňkami oční sítnice = podstata vidění

Fotomedicína je lékařským oborem zabývajícím se použitím světla k zlepšení lidského zdraví. Fototerapie je použití světla k léčení různých chorob (rakovina, leukemie, kožní choroby)

Některé organismy (luminiscenční bakterie, světlušky) vyzařují světlo jako výsledek chemických reakcí odehrávajících se ve specializovaných orgánech

Intensita světla během dne má vliv na tvorbu hormonů, vitamínu D atd., může i ovlivňovat chování

Světlo může mít škodlivé účinky na organismy – např. nadměrné slunění může vyvolat rakovinu kůže, předčasné stárnutí kůže, poškození očí

UV světlo může indukovat mutace a změněné exprese genů

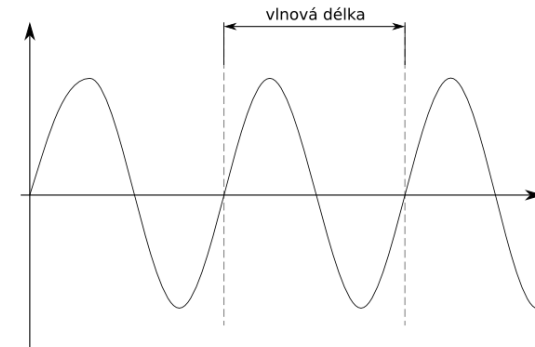
# Sluneční záření je elektromagnetické vlnění.

Vlnový rozsah celého spektra překrývá více než 15 řádů.

Rozsah působení a vedlejších účinků je závislý:  
na vlnové délce

na dávce ozáření

$$\lambda = \frac{v}{f}$$



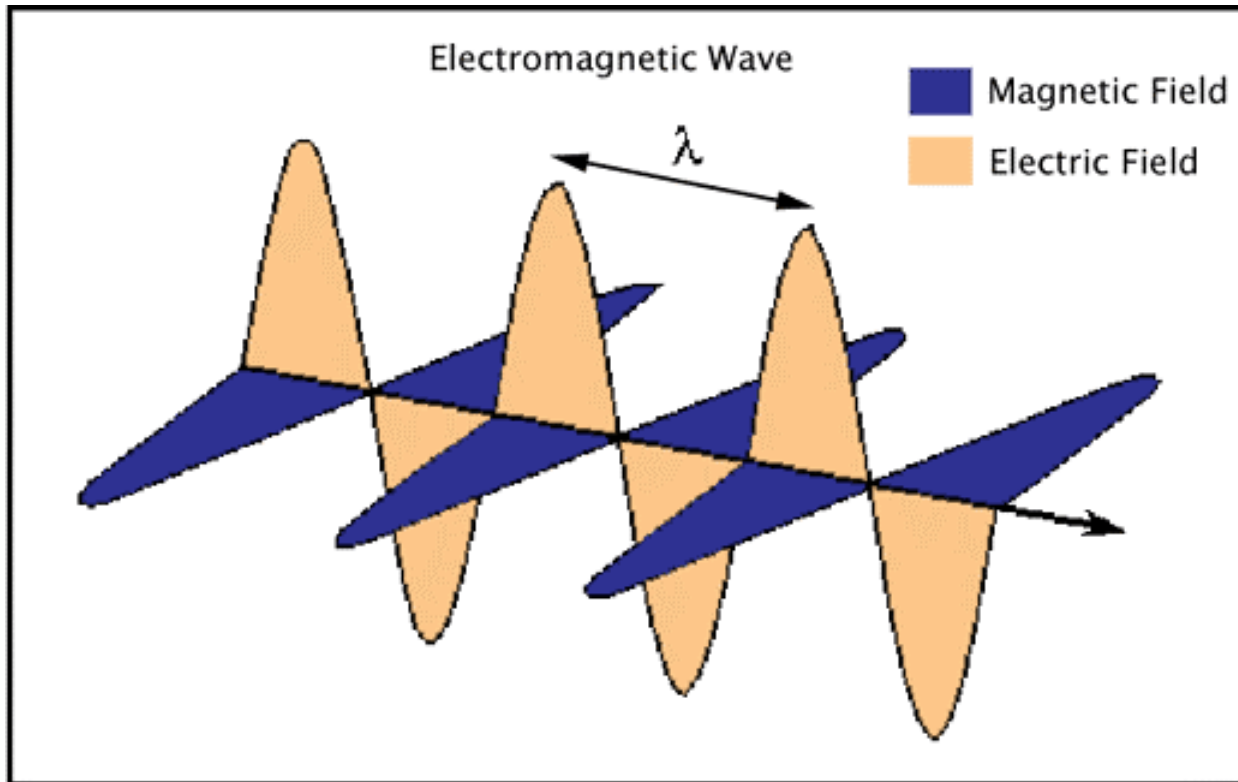
**Čím je vlnová délka kratší, tím má záření větší energii.**

Záření, které dopadá na zemský povrch, je velmi odlišné od záření, které slunce vlastně vyzařuje.

Sluneční záření, které se vyskytuje vně zemské atmosféry, se tam rozptyluje, odráží se od mraků a je absorbováno různými částmi atmosféry (vodní páry, ozón, kyslík, aerosoly).

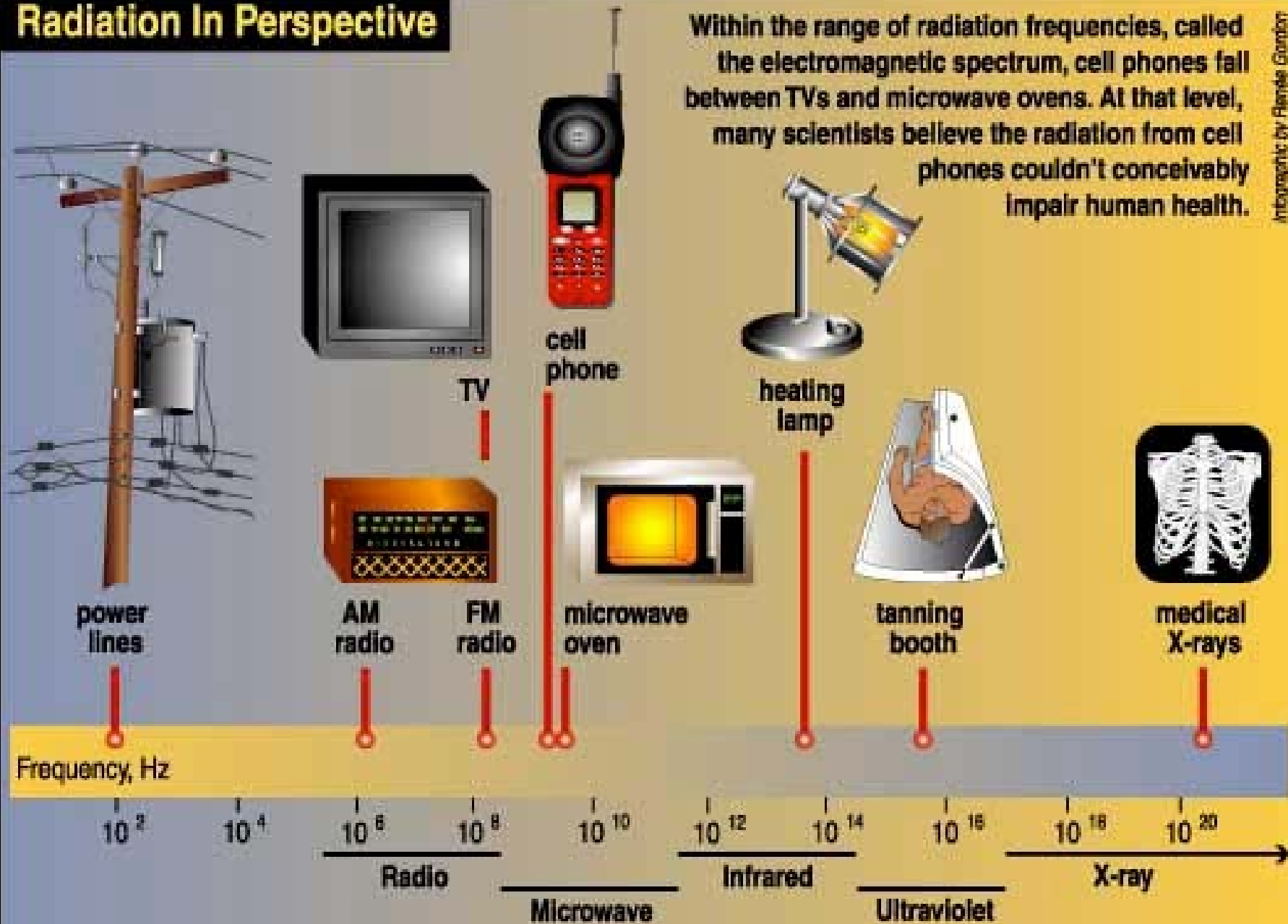
## Světlo je elektromagnetické vlnění

James Clerk Maxwell (1864) ukázal, že elektrické a magnetické vlny jsou vyzařovány současně a mají stejnou rychlost. Světlo tvoří pouze malou část elektromagnetického spektra.



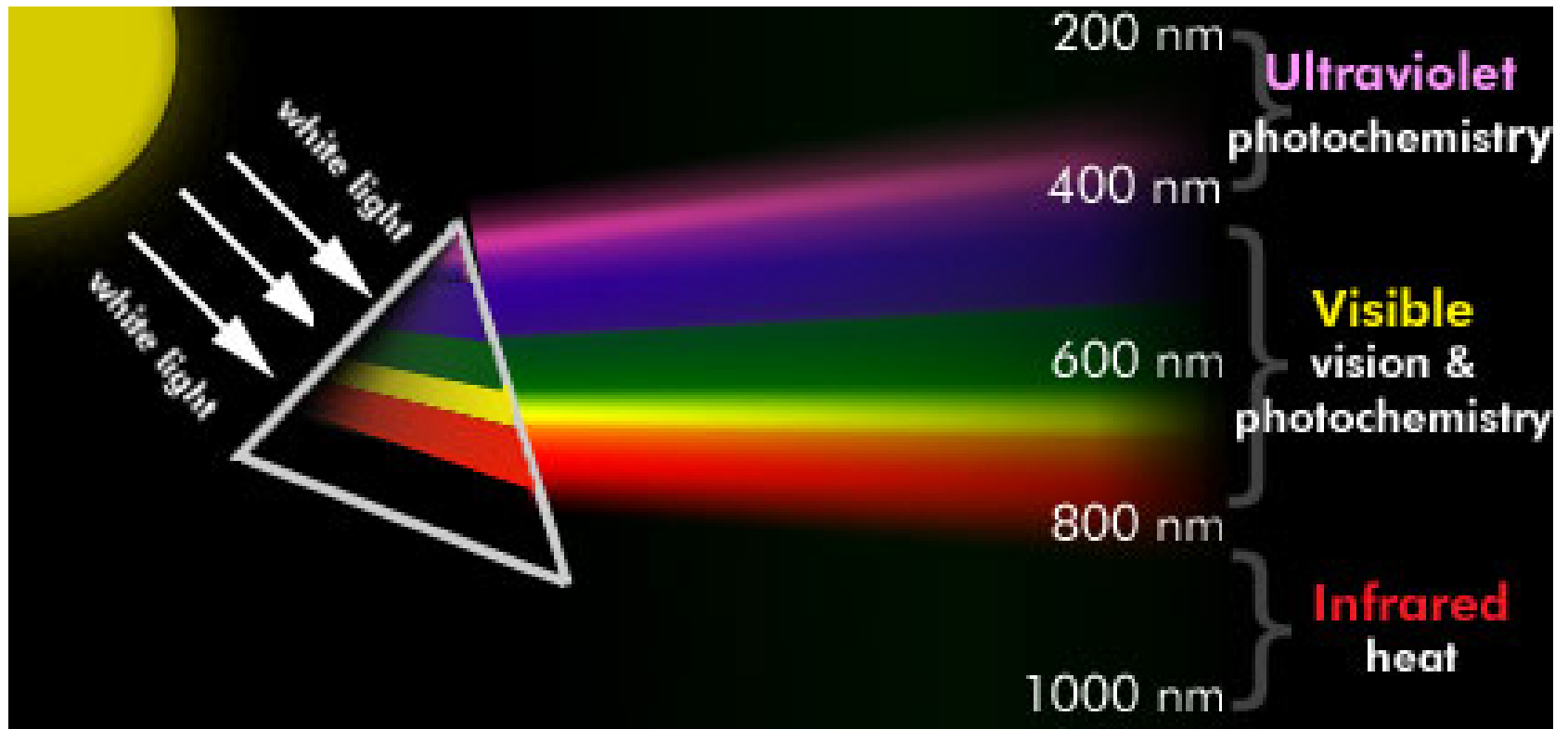
Jak může vznikat fotoelektrický efekt? Einstein rozšířil kvantovou teorii termální radiace. Objevil, že světlo a jiné druhy elektromagnetické radiace se šíří jako malá světelná kvanta, nebo také **fotony**. Energie fotonu je proporcionální jeho frekvenci.

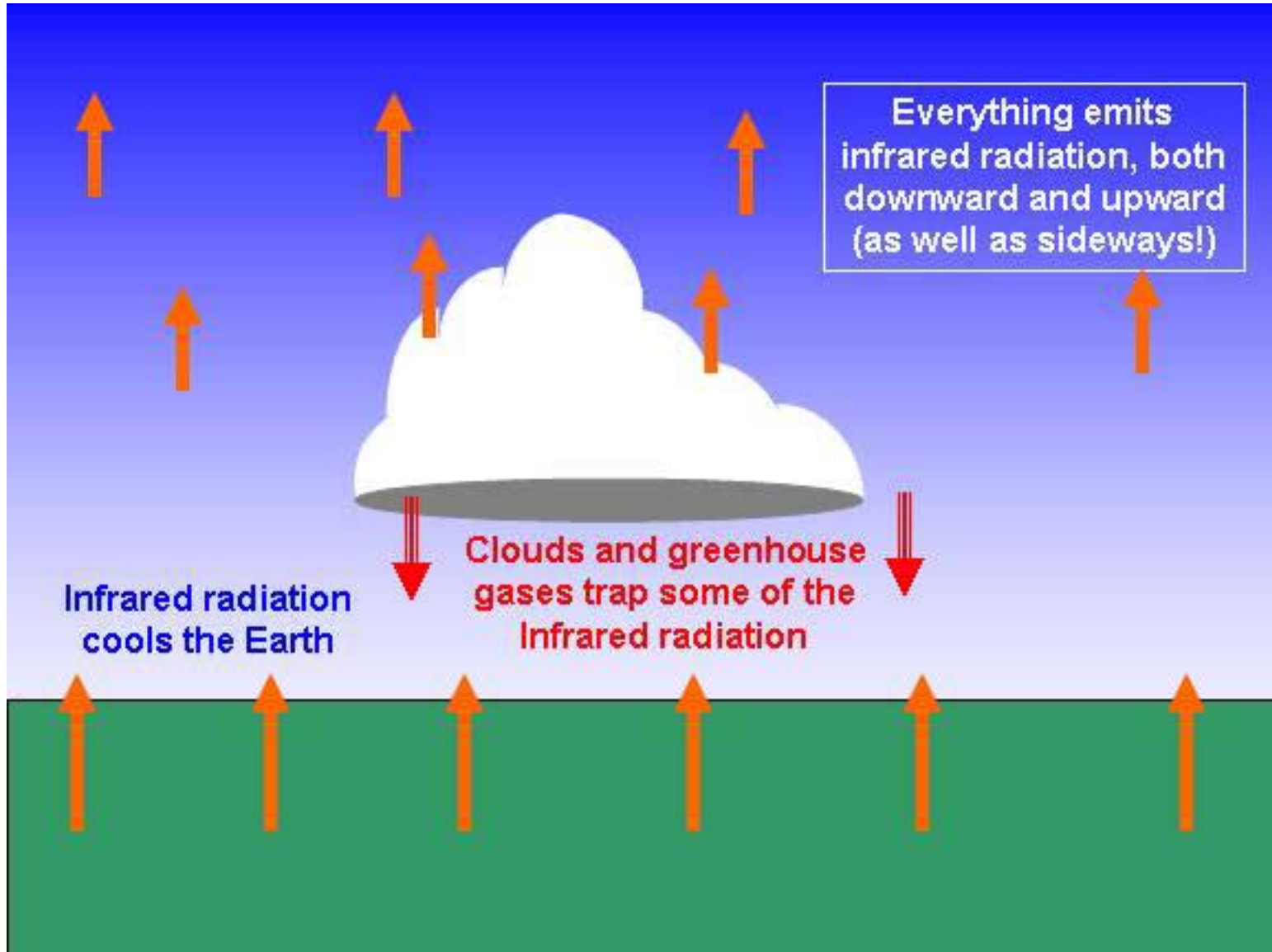
# Radiation In Perspective



Within the range of radiation frequencies, called the electromagnetic spectrum, cell phones fall between TVs and microwave ovens. At that level, many scientists believe the radiation from cell phones couldn't conceivably impair human health.

Infographic by Renee Gordon

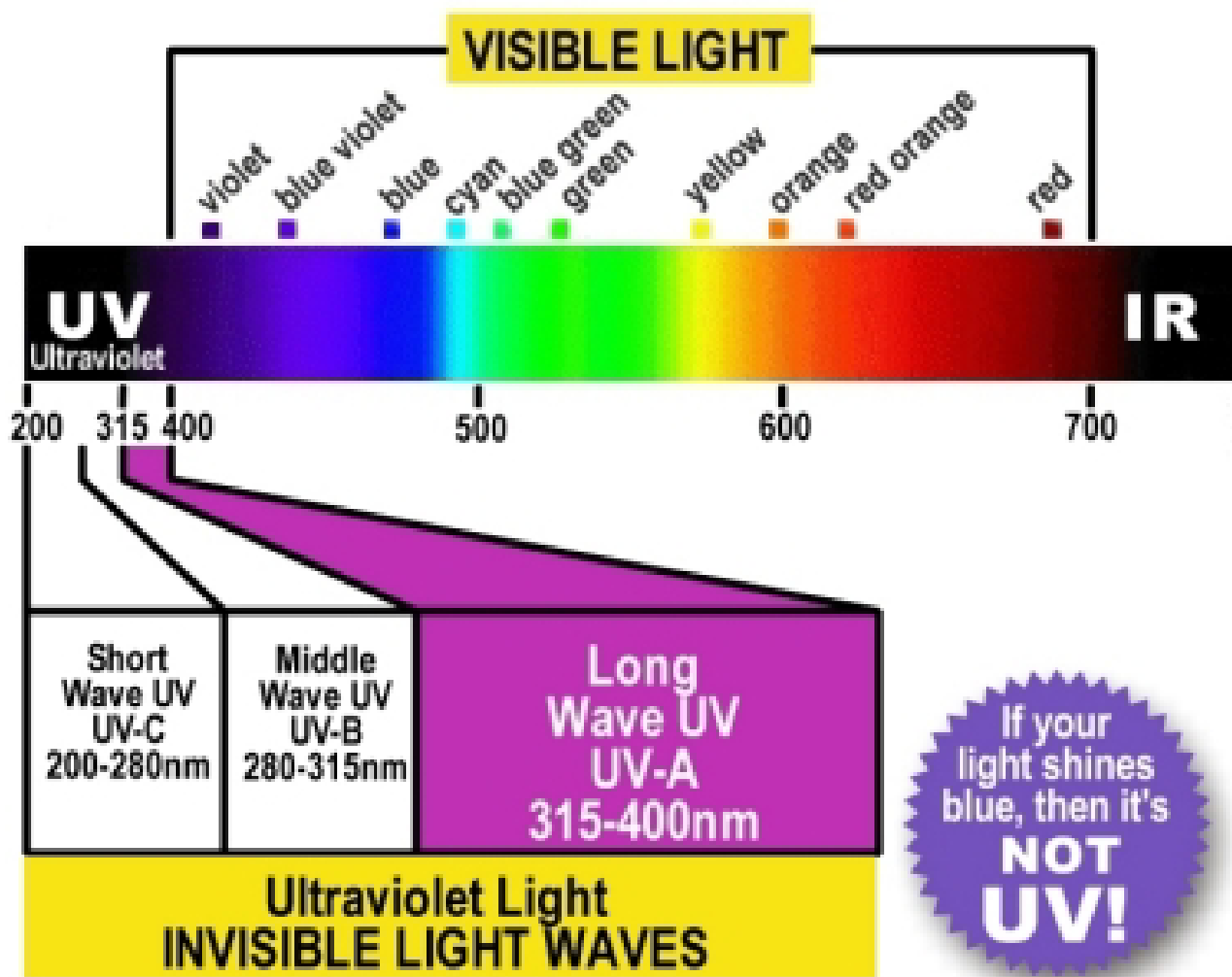




Everything emits infrared radiation, both downward and upward (as well as sideways!)

Infrared radiation cools the Earth

Clouds and greenhouse gases trap some of the Infrared radiation





Výzkum ve fotochemii, fotobiologii a biologických vědách vůbec se neobejde bez spektroskopických metod.

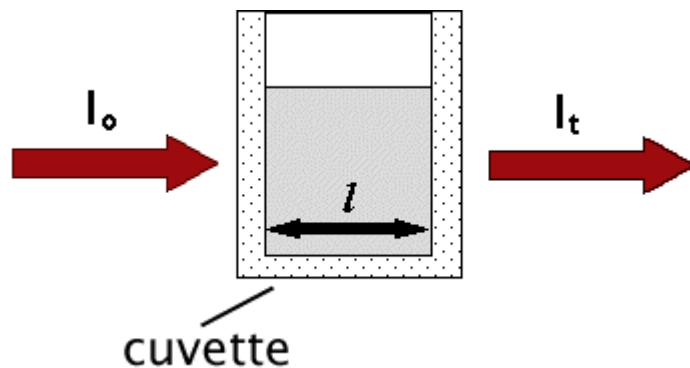
Nejpoužívanější jsou:

- ✓ absorpce
- ✓ fluorescence

Co je Beer-Lambertův zákon?

Lambertův zákon – podíl světla absorbovaného materiálem je nezávislý na intenzitě radiace.

Beerův zákon – absorpce je proporcionální koncentraci vzorku



**A** is the absorbance  
(T – transmittance, propustnost)

$$A = \log \frac{I_0}{I_t}$$

## **Nefelometrie (nefelometr = zákaloměr)**

Obsahuje - li kapalina nerozpuštěné pevné částice, pak je světlo procházející kapalinou pohlcováno a zároveň rozptylováno, přičemž stupeň zákalu je ovlivňován jak velikostí a tvarem pevných částic, tak jejich poměrným zastoupením.

Nefelometr měří rozptýlené světlo většinou pod úhlem (zpravidla  $90^\circ$ ).

## **Turbidimetrie**

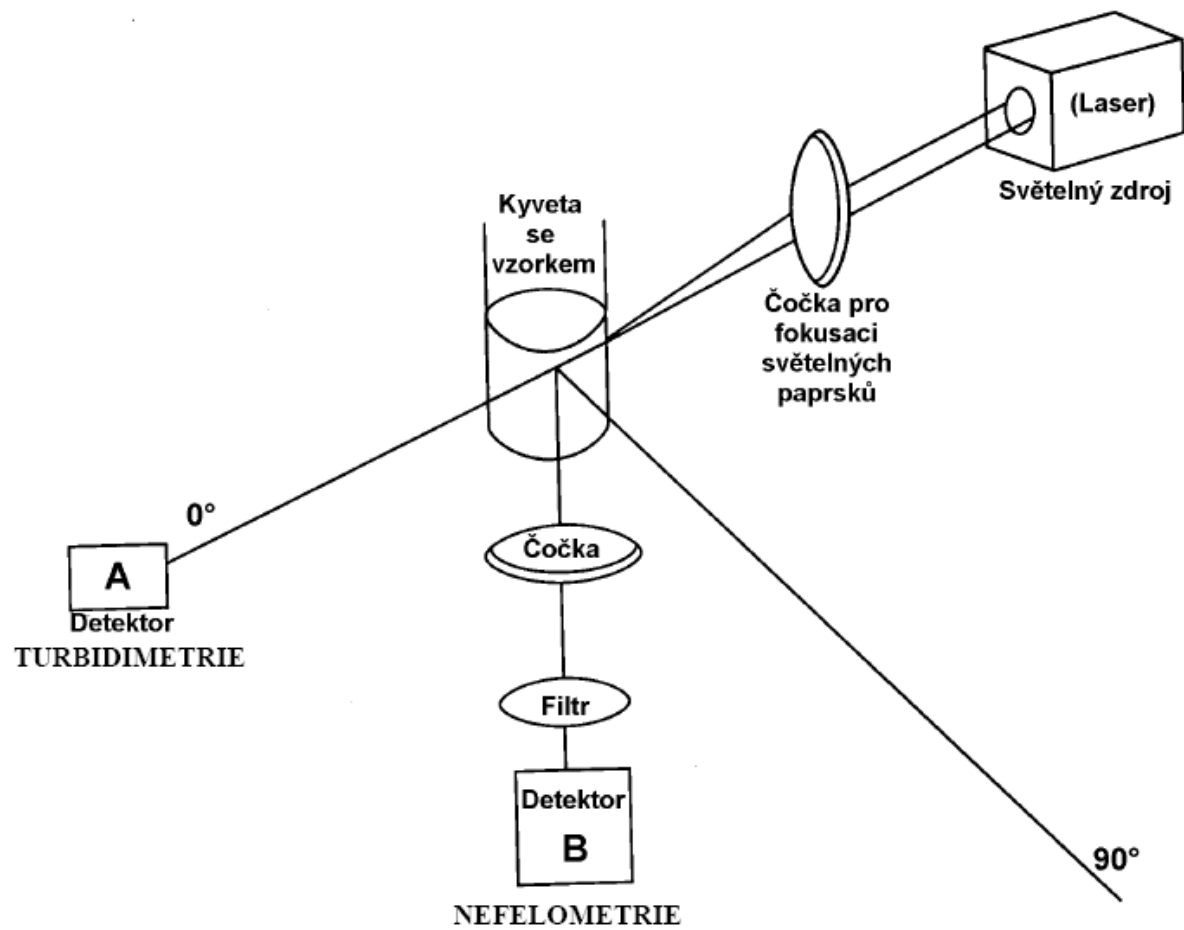
Příbuzná technika k nefelometrii založená na měření rozptylu světla v roztoku obsahujícím dispergované částice. Měří se úbytek intenzity kolimovaného světla jako výsledek rozptylu, absorpce nebo odrazu světla.

### **Volba metody:**

Závisí na stupni rozptylu světla.

je-li velký - turbidimetrie

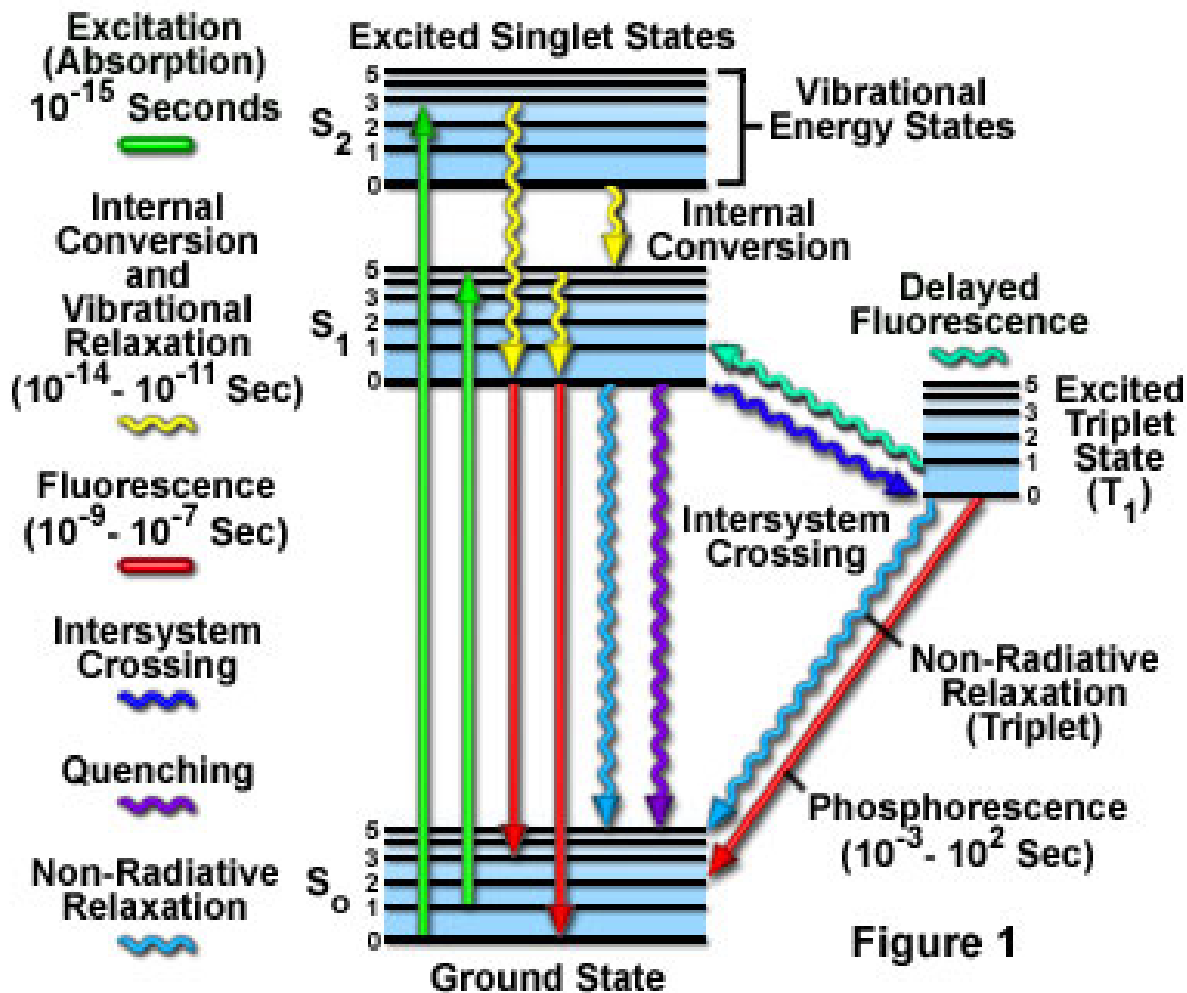
je-li malý - nefelometrie



Emise fotonů po předchozí excitaci = fluorescence.

Energie je konzervovaná. Pokud je světlo absorbováno, energie se může měnit na tepelnou, kinetickou nebo chemickou. Počáteční absorpce vždy vytváří excitované stavy nezávisle na druhu konverze energie.

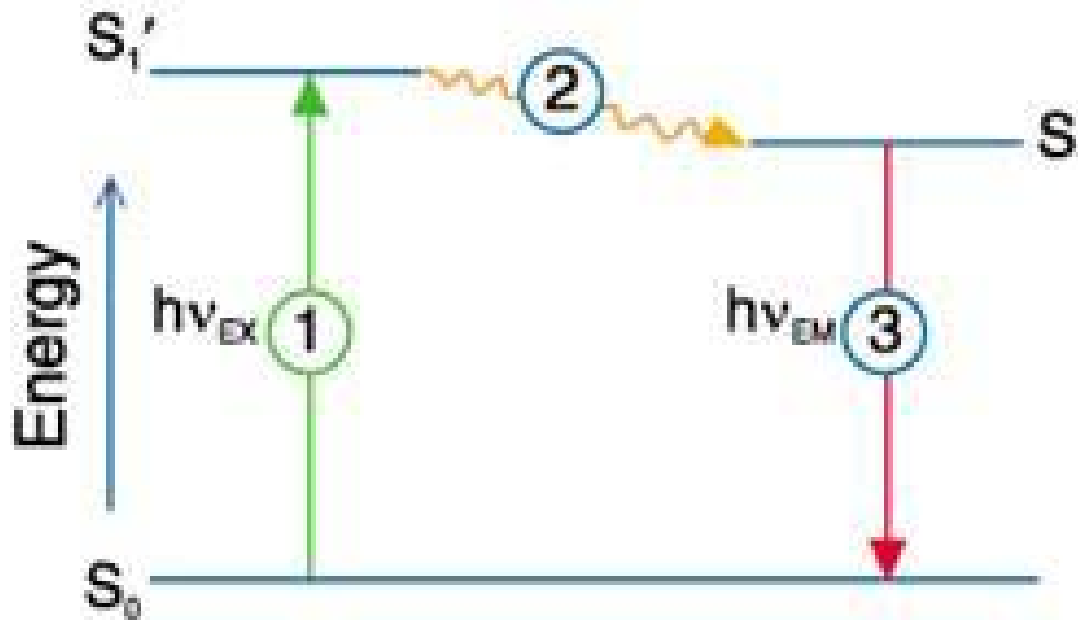
### Jablonski Energy Diagram



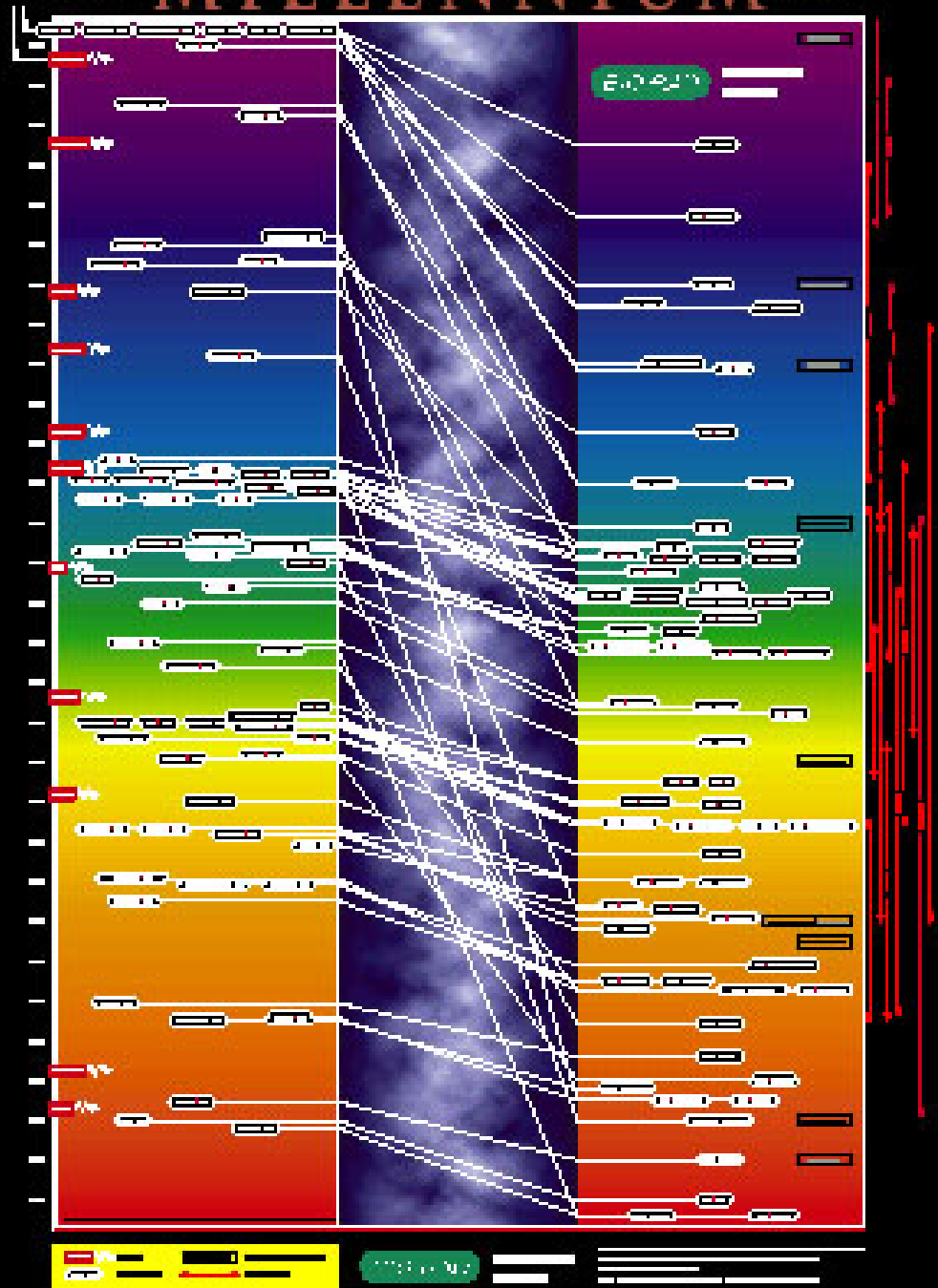
# Fluorescence.

Emisní vlnová délka je větší než excitační, emisní energie menší.  
Některé látky mají přirozenou fluorescenci, pro sledování biologických dějů se používají látky s intenzívní fluorescencí – fluorofory.

Fluorescence může být vizualizována fluorescenčním mikroskopem nebo konfokálním mikroskopem.

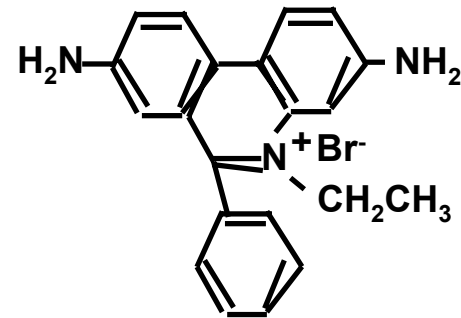
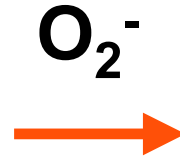
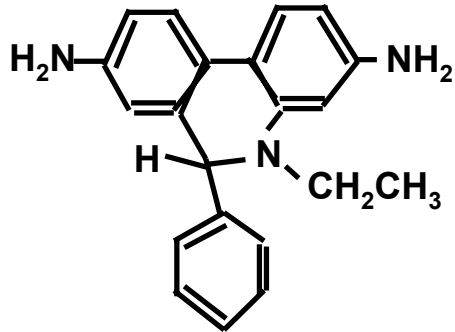


# Fluorophore excitation/emission maxima

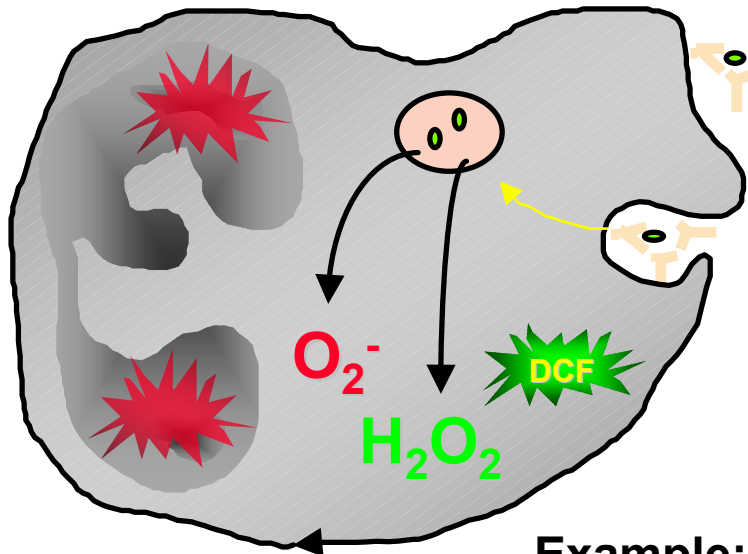


# Hydroethidine

HE

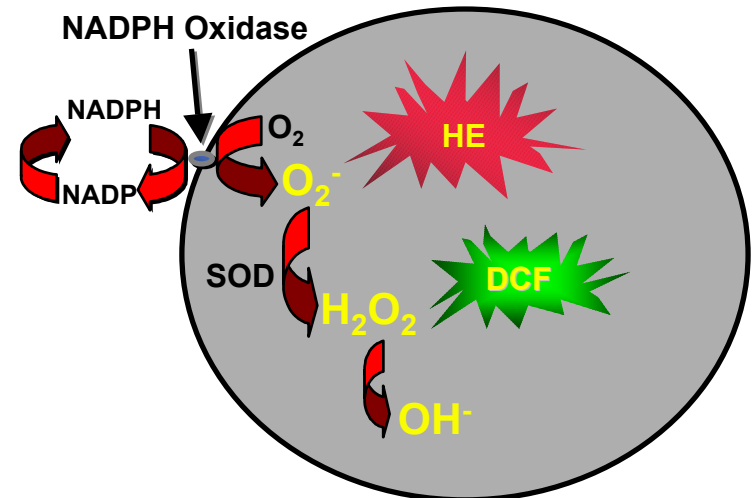


EB



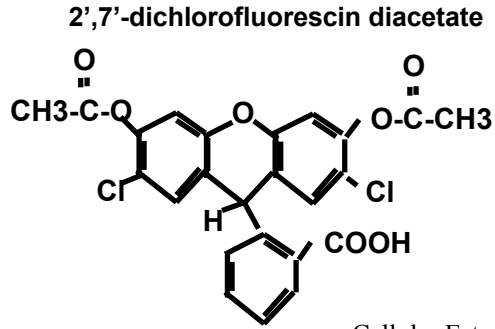
Example: Neutrophil Oxidative Burst

Phagocytic Vacuole

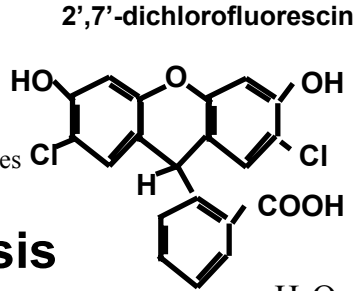




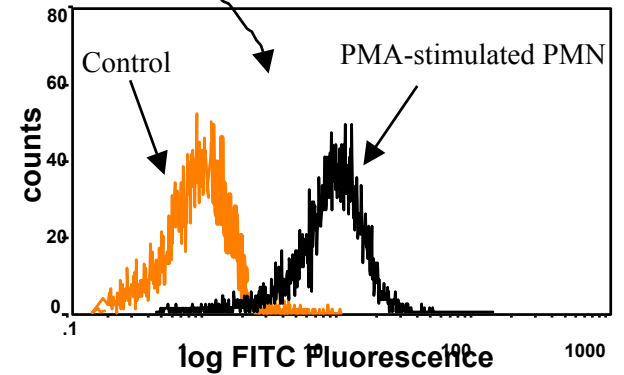
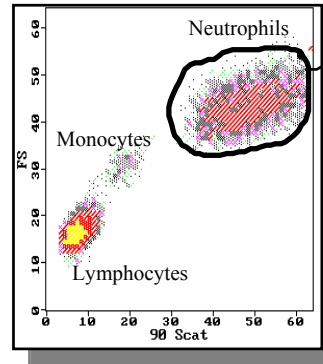
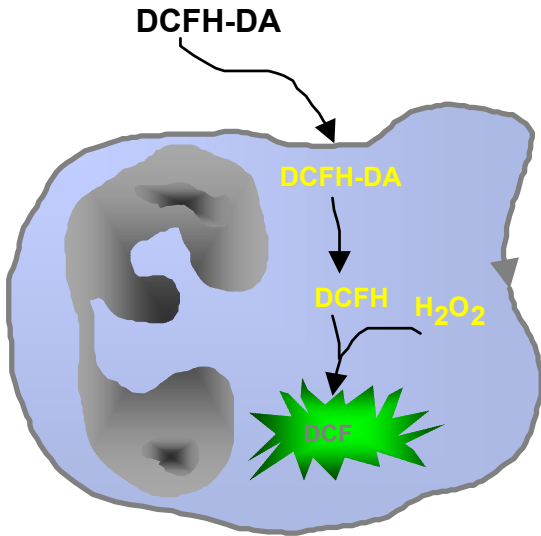
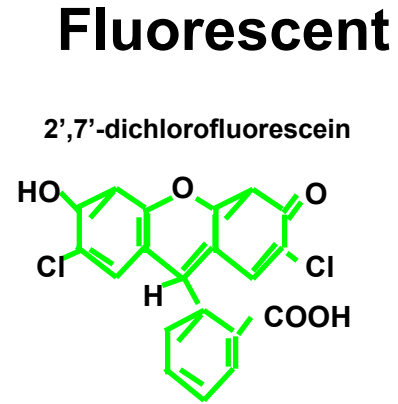
# DCFH-DA $\longrightarrow$ DCFH $\longrightarrow$ DCF



Cellular Esterases  
**Hydrolysis**

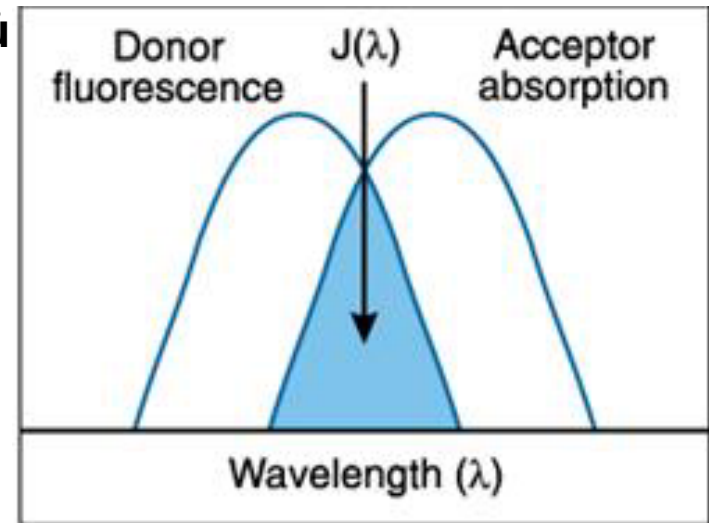


$H_2O_2$   
**Oxidation**



# Speciální fluorescenční techniky

## Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) – používaná pro studium interakce proteinů



## Fluorescence photobleaching: FRAP and FLIP

Používané pro studium dynamické distribuce proteinů. V obou případech je fluorescence určité oblasti eliminována zářením vysoké intenzity.

### Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

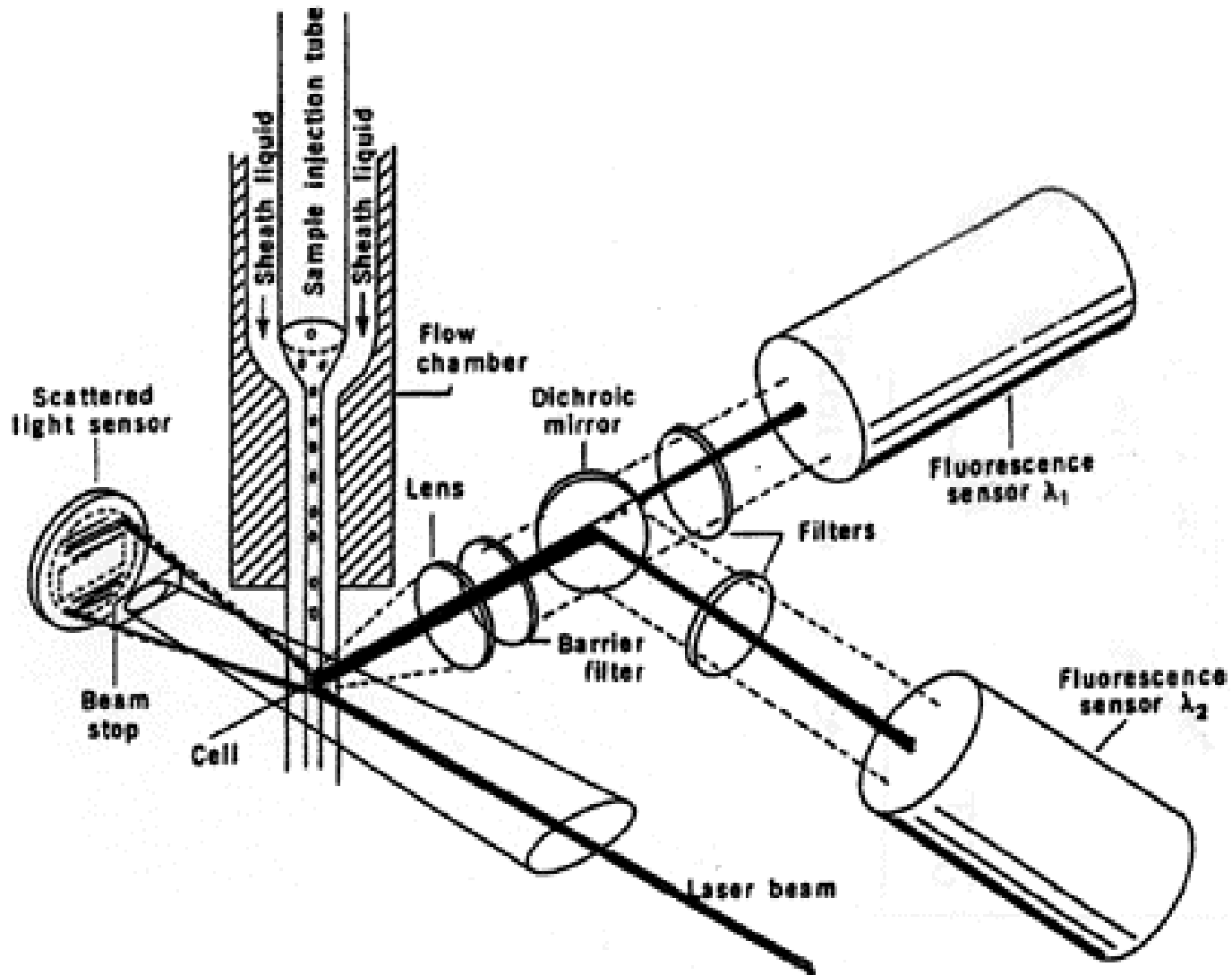
- je sledován návrat fluorescence do vyhaslé oblasti

**Fluorescence loss in photobleaching (FLIP)** – určitá oblast je opakovaně vyhasínána. Je sledováno naopak vyhasínání fluorescence v jiných oblastech

# **Využití fluoroforů v DNA microarrays**

Další vysoce specializované techniky využívající laserových  
technologií

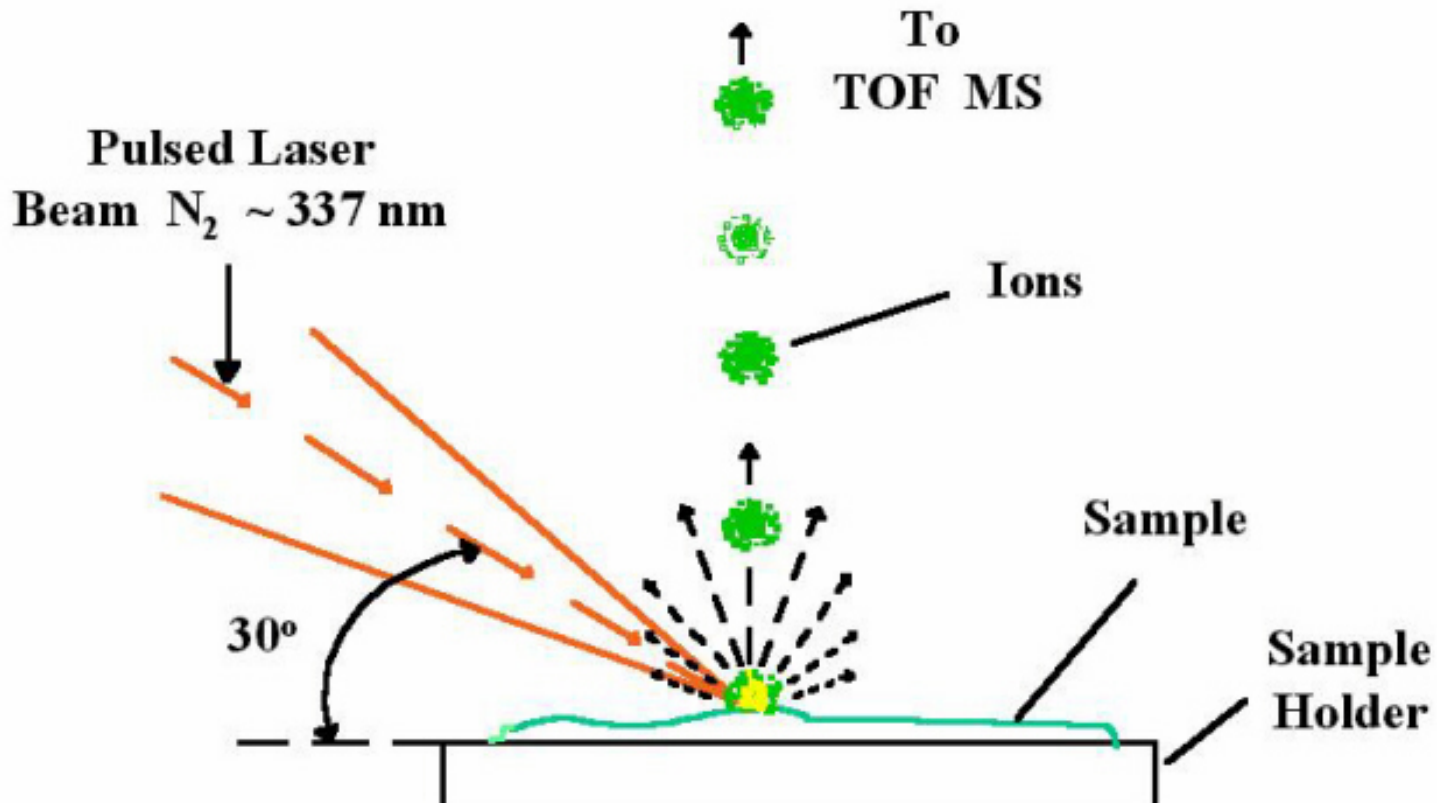
# Průtoková cytometrie (flow cytometry)



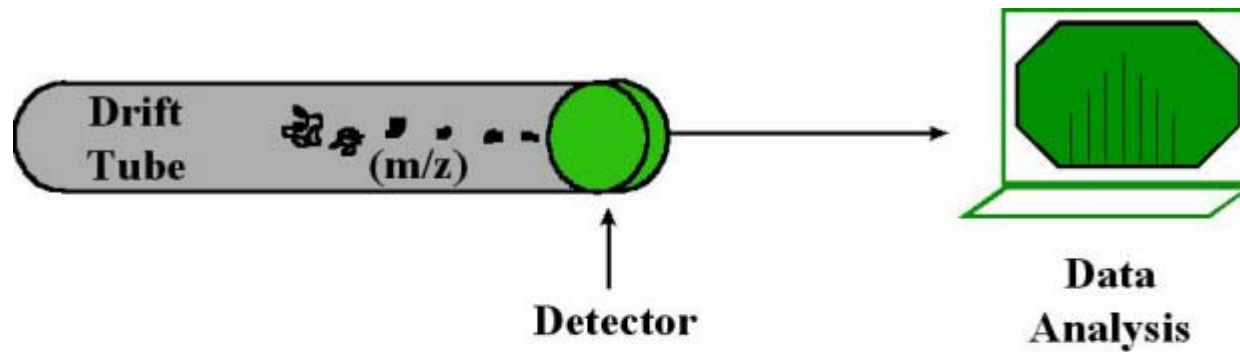
# MALDI-TOF MS

## Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight hmotnostní spektrometrie

MALDI-MS technika dovoluje hmotnostní determinaci velkých biomolekul a syntetických polymerů (větších než 200 kDa) laserovou ionizací a odparem bez současné degradace. 200,000 Daltons (Da)



Ionty překonávají stejnou vzdálenost ve vakuové trubici, doba letu závisí na jejich velikosti ( $m$ ) a náboji ( $z$ ).



TOF Spectrum  $\rightarrow$  Mass Spectrum

$$t \sim (m/z)^{1/2}$$

$t$  = Time of Flight