

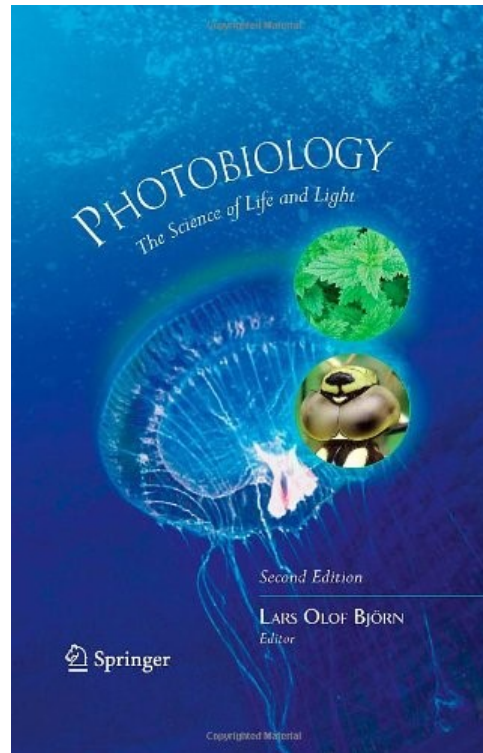
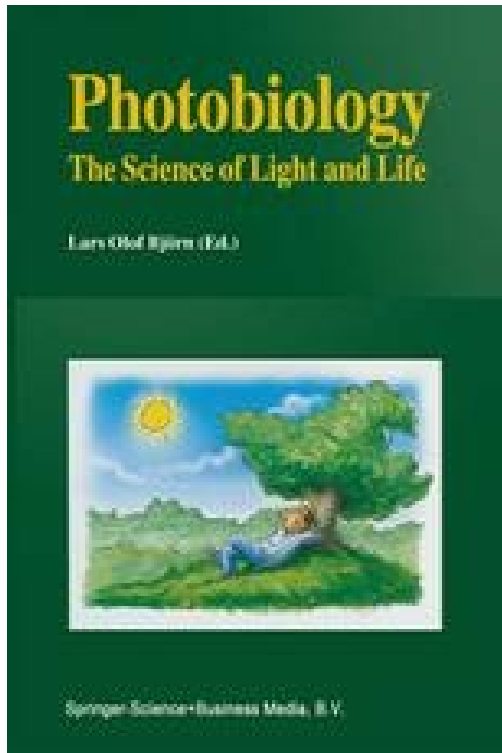
Fotobiologie

Milan Číž
Lukáš Kubala
Ondřej Vašíček

Fotobiologie

Sylabus (podzim 2019)

Datum	Přednáška	Přednášející
17. 9.	Úvod	Číž
24. 9.	Světlo a organismy	Číž
1. 10.	Bioluminiscence živočichů	Vašíček
8. 10.	Bakteriální bioluminiscence	Vašíček
15. 10.	Nevizuální fotorecepce	Číž
22. 10.	Vidění	Číž
29. 10.	Fotodermatologie 1	Kubala
5. 11.	Fotodermatologie 2	Kubala
12. 11.	Fotomedicína	Kubala
19. 11.	Luminometrické aplikace v biologii a medicíně	Číž
26. 11.	Fotodynamická terapie	Kubala





N
o
v
a

B
i
o
m
e
d
i
c
a
l



Léon N. Collignon
Claud B. Normand
Editors

Photobiology

Principles, Applications and Effects

NOVA

GENERAL PHOTOBIOLOGY

Donald Peter Hader & Manfred Tsvetkov

Pergamon Press

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
ÚSTŘEDNÍ KOMISE BIOLOGICKÉ OLYMPIÁDY

Biologická olympiáda 2016–2017,
51. ročník, přípravný text pro kategorie A, B

Budiž světlo!

Zdeňka Bendová, Lucie Buchbauerová, Jan Černý, Albert Damaška,
Karel Kleisner, Tereza Nedvědová, Jaroslav Nunvář, Jana Pilátová,
Juraj Sekereš, Marie Smyčková, Stanislav Vosolsobě, Ondřej Zemek



Praha 2016

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
-

Důležitost světla (neionizujícího záření) je patrná z počtu Nobelových cen udělených za výzkum v oblasti fotobiologie

1903 Niels R. Finsen - Physiology/Medicine: Phototherapy of lupus vulgaris and other diseases.

1911 Allvar Gullstrand - Physiology/Medicine: Dioptrics (image formation) of the eye.

1915 Richard M. Willstatter - Chemistry: The chemistry of chlorophyll and other plant pigments.

1930 Hans Fischer - Chemistry: The chemistry of heme pigments including chlorophyll.

1937 Paul Karrer - Chemistry: Studies on carotenoids, flavins and vitamins A and B2.

1938 Richard Kuhn - Chemistry: The chemistry of carotenoids and vitamins.

1961 Melvin Calvin - Physiology/Medicine: Carbon dioxide assimilation in plants (dark reactions).

1967 Ragnar Granit, Haldan K. Hartline, George Wald - Physiology/Medicine: Neurophysiology and the biochemistry of vision.

1981 David H. Hubel, Torsten N. Wiesel - Physiology/Medicine: Information processing in the visual system.

1988 Johann Deisenhofer, Robert Huber, Hartmut Michel - Chemistry: Structure of the photosynthetic reaction center.

1992 Rudolph A. Marcus - Chemistry: Theory of electron transfer reactions in chemical systems.

1995 Paul J. Crutzen, Mario J. Molina, F. Sherwood Rowland - Chemistry: Decomposition of stratospheric ozone by UV radiation.

1999 Ahmed Zewail - Chemistry: - Femtosecond spectroscopy of transition states.

2002 John B. Fenn, Koichi Tanaka, Kurt Wuthrich - Chemistry: NMR and mass spectroscopy of biological molecules.

2008 Martin Chalfie, Osamu Shimomura, and Roger Y. Tsien - Chemistry: Discovery and development of the green fluorescent protein.

Podobory fotobiologie

Obor fotobiologie se rozděluje do cca 12 podoborů

11 podoborů se týká absorpce světla

1 podobor se naopak týká emise světla živými organismy
(bioluminiscence)

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.

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.

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 fotosensitizer.

Prakticky všechny organismy obsahují endogenní molekuly – potenciální fotosensitizer.



Porfyriny v biosyntéze hemu (metaloporfyrin vázající Fe^{2+} , Fe^{3+})

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

- Hemoglobiny
- Myoglobiny
- Cytochromy (Cytochrom c, Cytochrom P-450)
- Katalázy

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 záření 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 intenzívně 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. Nevizuální fotorecepce, Fotoperiodismus

Světlo je vnímáno receptorem, aniž by byl vytvářen obraz jako v případě vizuální fotorecepce.

Důsledkem jsou cyklické změny ve fyziologii a chování.

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

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. Bioluminescence

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

Nejznámější příklad - světluška.

Bioluminescence 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,, vznikajících při 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 – energie je dodávána elektromagnetickým zářením.

Fotoluminiscenci je nazývána jakákoliv luminiscence z elektromagnetického záření.

Fluorescence je luminiscence vyvolaná UV zářením.

2. Chemiluminiscence - energie je dodávána chemickou reakcí.

3. Bioluminiscence - energie je dodávána chemickou reakcí v živých organismech.

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

Další příklady:

5. Radioluminiscence

6. Triboluminiscence - spuštěna mechanicky (tlakem)

7. Fosforescence (opozděná luminiscence) - tzv. zakázaný přechod mezi stavy atomu - elektrony se zpožděně dostávají do základního stavu.

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 v kůži atd., může ovlivňovat chování.

Hlavní biologické účinky světla

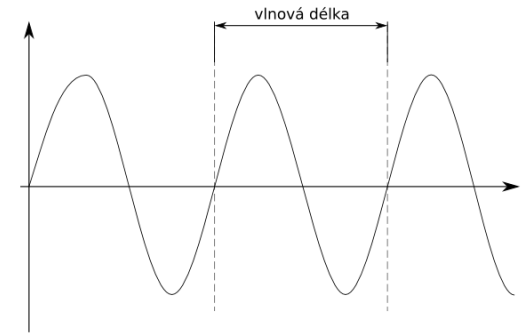
Světlo může mít škodlivé účinky na organismy – např. nadměrné slunění může vyvolat rakovinu kůže, předčasné stárnutí kůže, poškození očí apod.

UV světlo může indukovat mutace a změněné exprese genů.

Sluneční záření je elektromagnetické vlnění.

Rozsah působení a vedlejších účinků je závislý:

- na vlnové délce
- na dávce ozáření

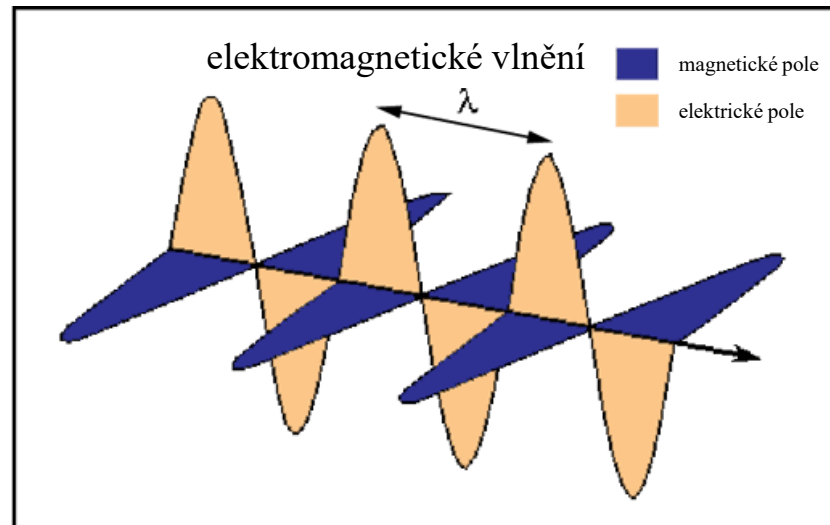


Čím je vlnová délka kratší, tím má záření větší energii.

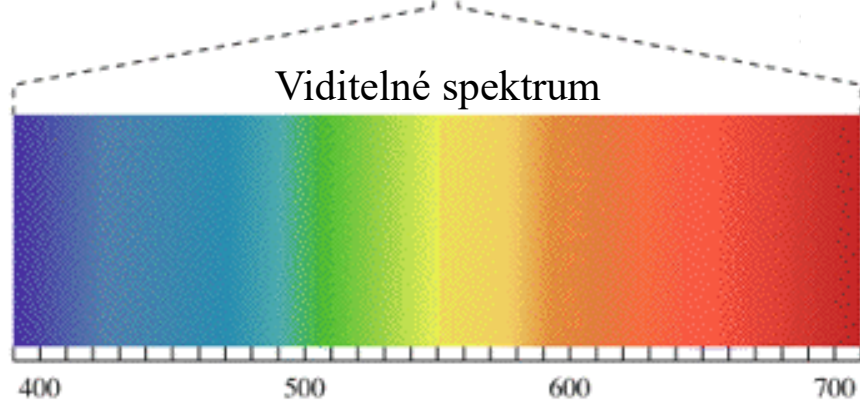
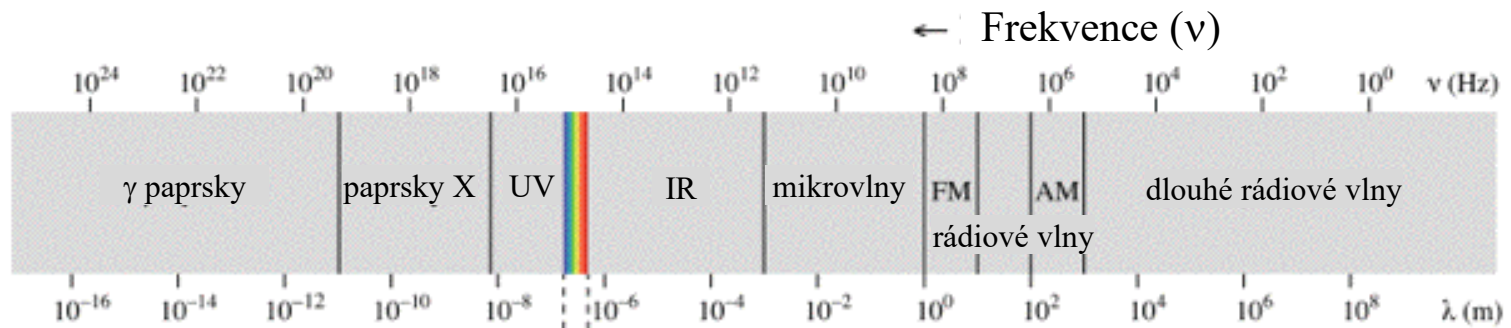
Záření, které dopadá na zemský povrch, je velmi odlišné od záření, které slunce vlastně vyzařuje.

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).

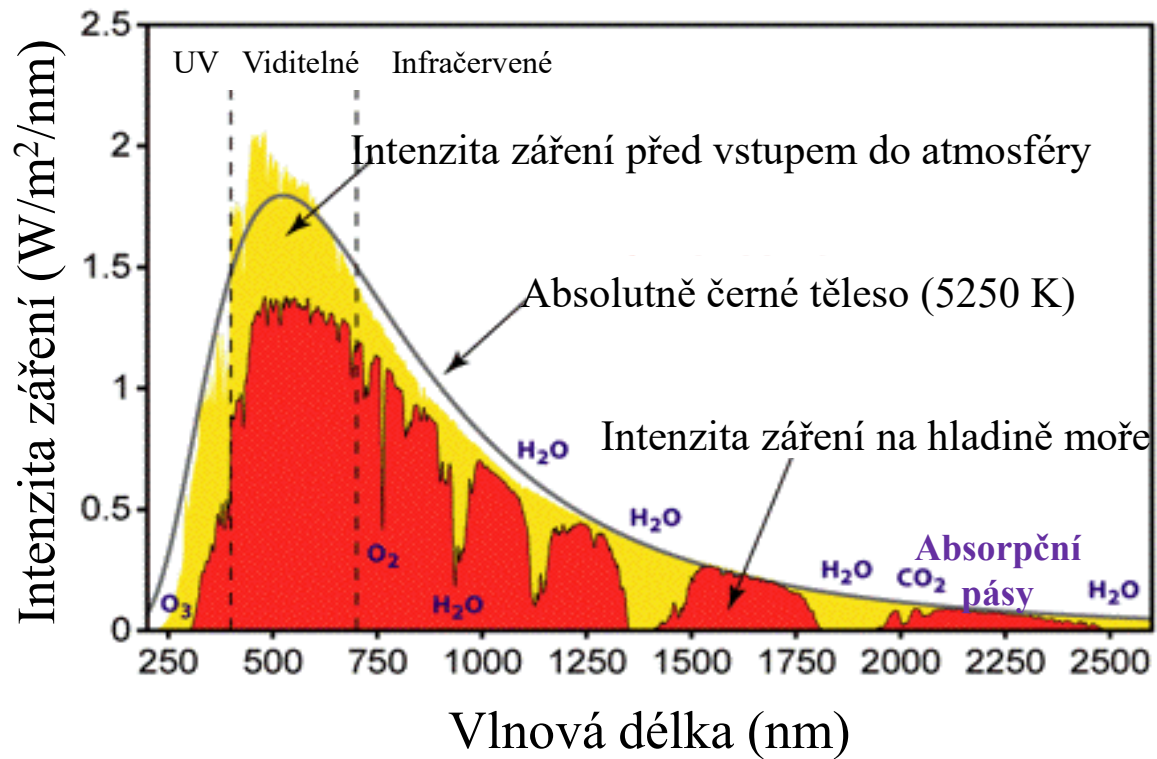
James Clerk Maxwell (1864) ukázal, že elektrické a magnetické vlny jsou vyzařovány současně a mají stejnou rychlost. Světlo tvoří pouze malou část elektromagnetického spektra.



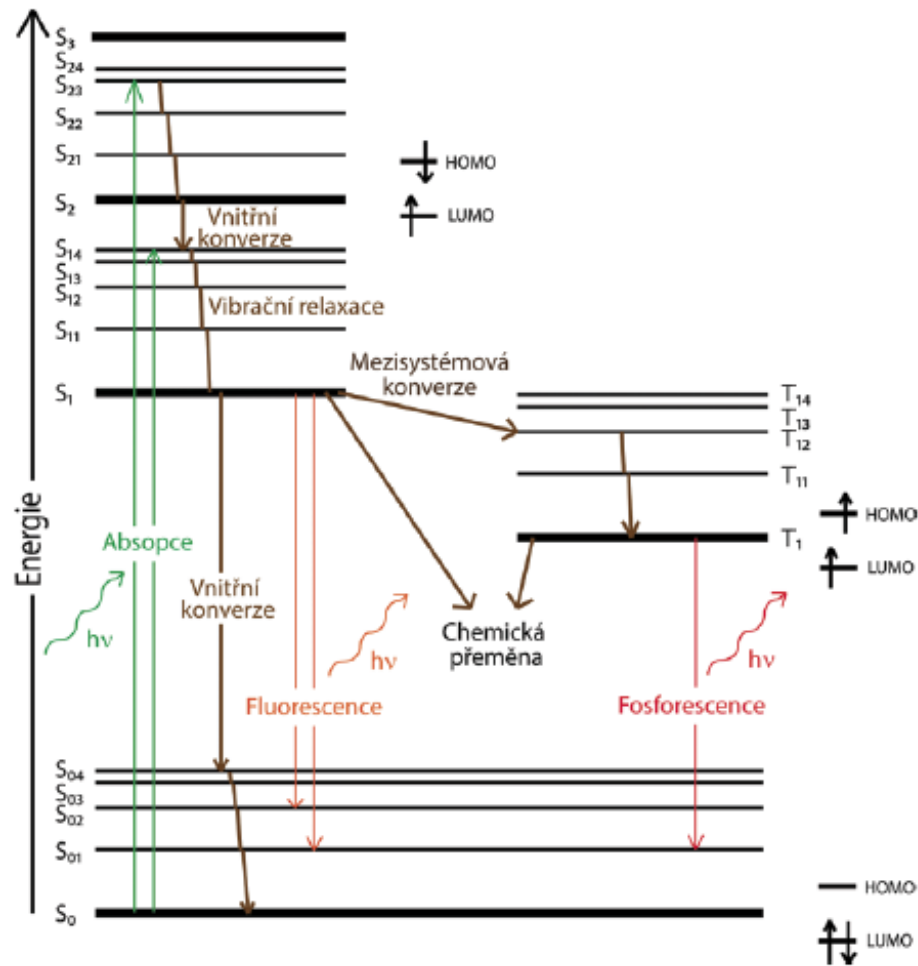
Einstein objevil, že světlo (a jiné druhy elektromagnetické radiace) se šíří jako malá světelná kvanta, nebo také **fotony**. Energie fotonu je proporcionalní jeho frekvenci.



Vlnová délka (λ , nm)



Spektrum solárního záření před (žlutě) a po (červeně) průchodu atmosférou (na hladině moře). Tato distribuce poměrně dobře odpovídá modelu vyzařování absolutně černého tělesa (popsaného Wienovým posunovacím zákonem) při teplotě asi 5250 K, což je teplota, která přibližně panuje na povrchu Slunce.



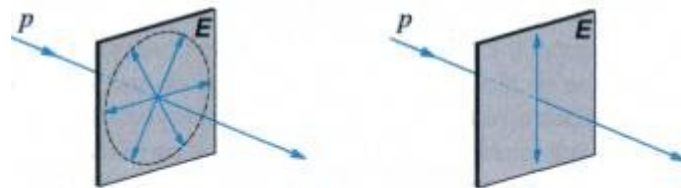
Jablonského diagram – schématické znázornění energetických hladin molekuly během fotochemických dějů.

Polarizované světlo

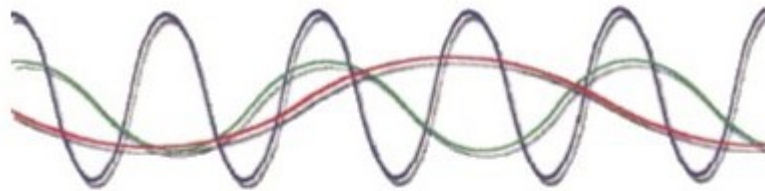
Omezíme-li směr kmitání vektoru E nebo jeho velikost, získáme polarizované světlo. Přitom rozdíl mezi polarizovaným a nepolarizovaným světlem nepoznáme okem. Lidské oko nedokáže polarizované světlo od nepolarizovaného světla odlišit.

Příklad:

Lineárně polarizované světlo - vektor E kmitá stále v jedné přímce



Koherentní světlo je světlo složené ze světél, která mají v určitém místě a určitém okamžiku stejnou vlnovou délku a stejnou fází. Běžné zdroje vyzařují světlo nekoherentní, laser je zdrojem světla koherentního.



sluneční světlo (mnoho různých barev)



LED (monochromatické, nekoherentní)



laser (monochromatické, koherentní)

Vlnová délka

Pro elektromagnetické vlnění se délka vlny jednoduše spočítá vzorcem:

$$\lambda = c / f$$

kde:

λ ... vlnová délka

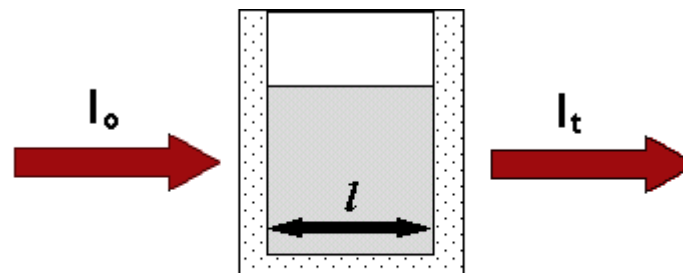
c ... rychlost světla (300 000 km/s)

f ... frekvence

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

Nejpoužívanější jsou:

- ✓ absorpce
- ✓ fluorescence



Beer-Lambertův zákon:

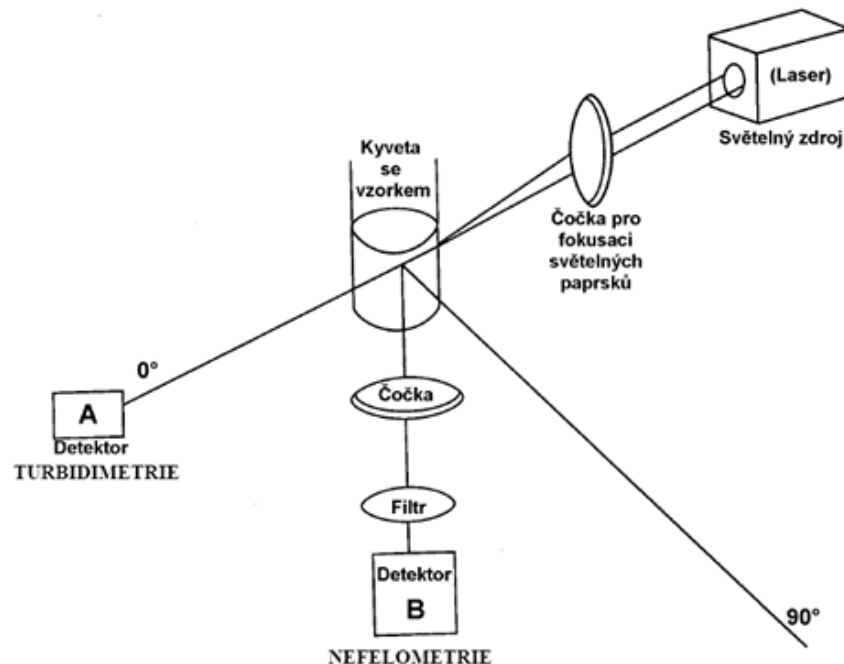
Lambertův zákon – podíl světla absorbovaného materiálem je nezávislý na intenzitě radiace.

Beerův zákon – absorpce je proporcionální koncentraci vzorku.

$$A = \log I_0/I_t$$

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°).



Turbidimetrie

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

Volba metody:

Závisí na stupni rozptylu světla.

je-li velký - turbidimetrie

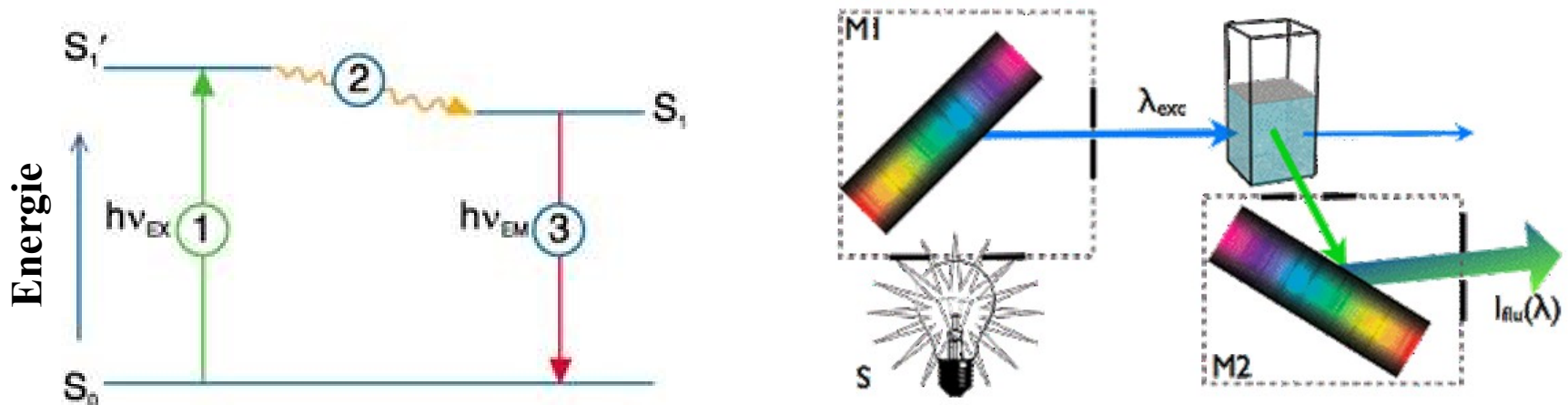
je-li malý - nefelometrie

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**.

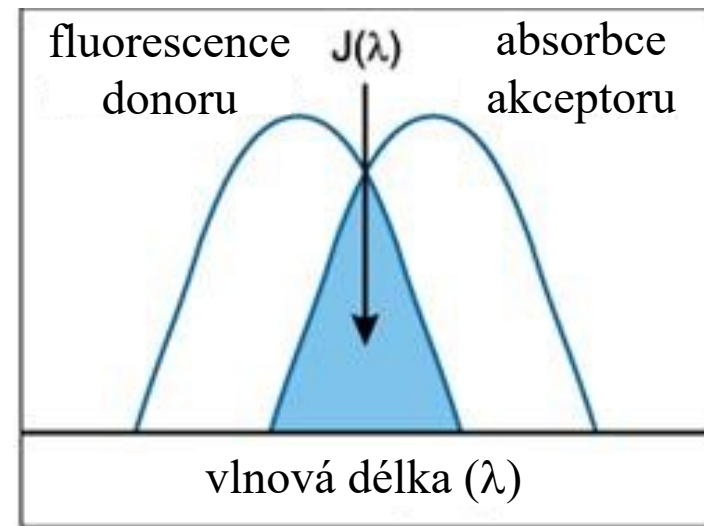
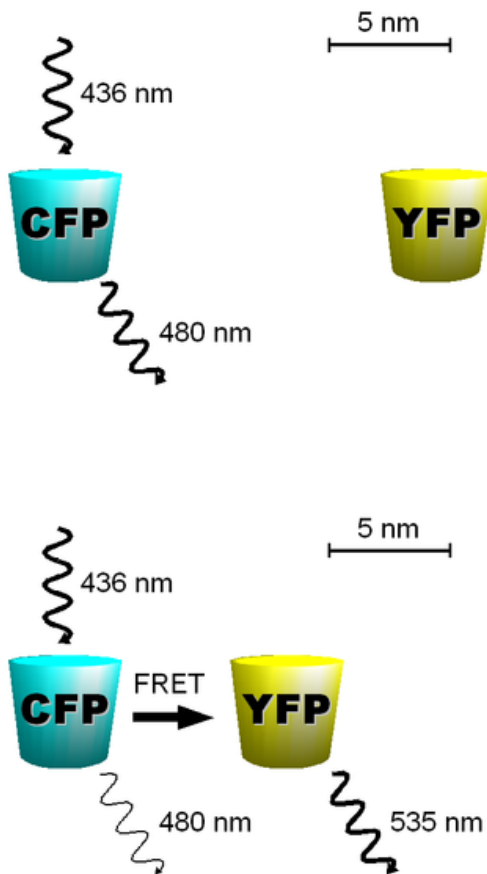
Fluorescence může být vizualizována fluorescenčním mikroskopem nebo konfokálním mikroskopem.



Speciální fluorescenční techniky

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

používaná pro studium interakce proteinů



Speciální fluorescenční techniky

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