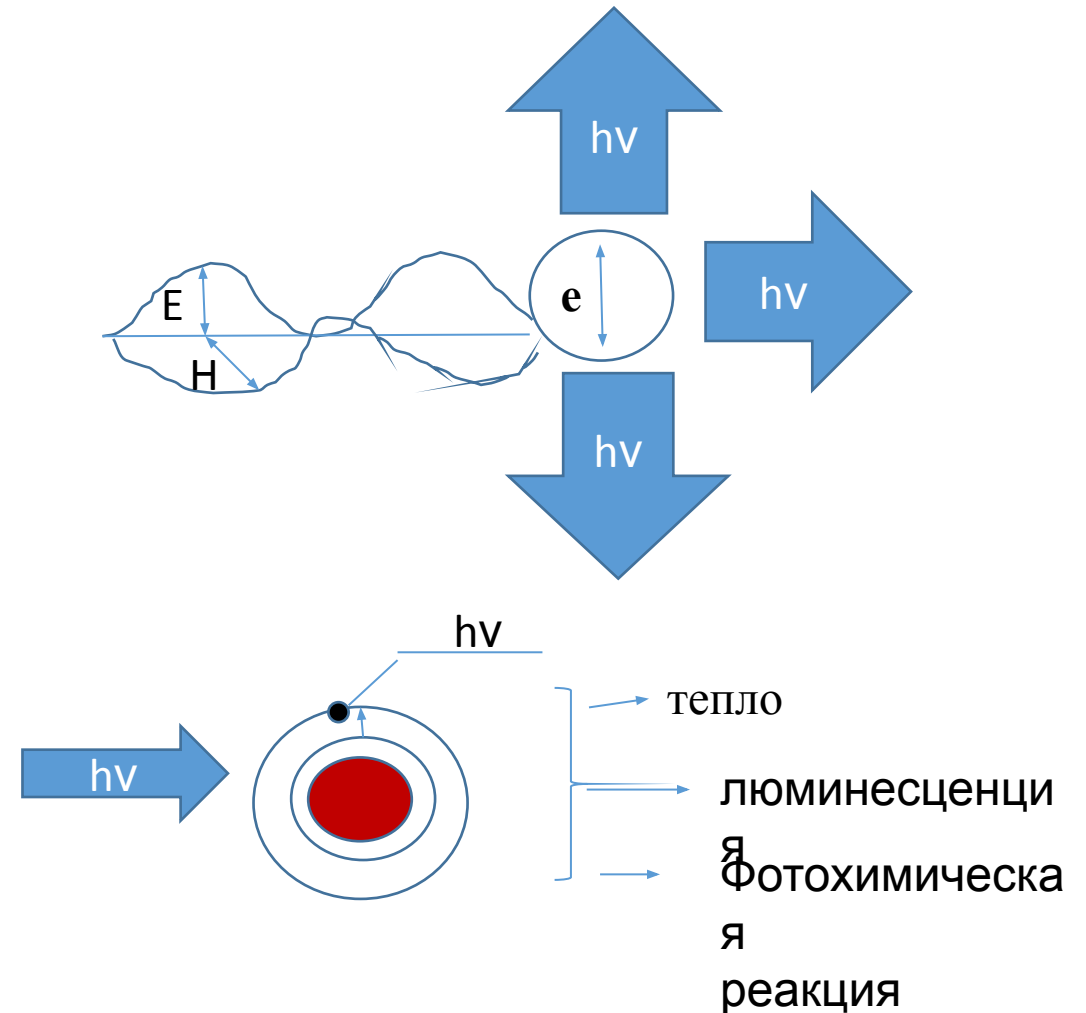


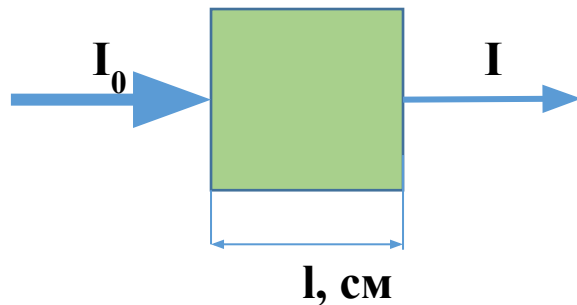
**Взаимодействие  
электромагнитных излучений с  
живыми системами.  
Фотохимические процессы,  
люминесценция.**

# 1. Взаимодействие электромагнитных излучений с живыми системами.

При прохождении световой волны часть энергии волны затрачивается на возбуждение колебаний электронов. Частично эта энергия переходит в энергию движения атомов (тепло), часть энергии может тратиться на перевод молекулы в возбужденное состояние, в котором она способна вступать в химическую (фотохимическую) реакцию, частично возвращается в виде излучения, порождаемого электронами (флуоресценция).



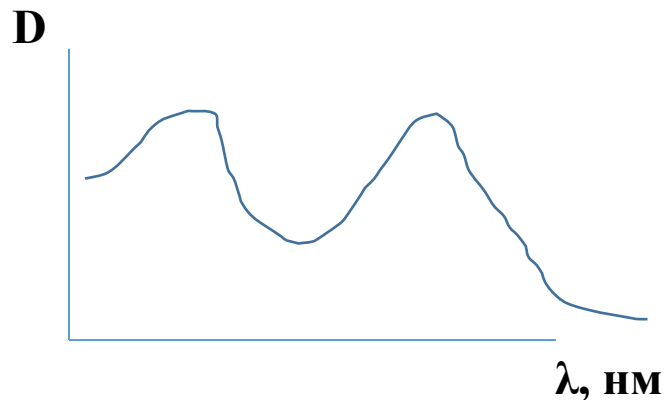
# Поглощение света биосистемами



$$D = \lg(I_0/I) = \epsilon c l$$

$c$ -концентрация вещества в растворе (М/л),  
 $\epsilon$ - молярный коэффициент поглощения (М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>).

$$s = 3,8 \cdot 10^{-21} \text{ \AA} (\text{cm}^2)$$

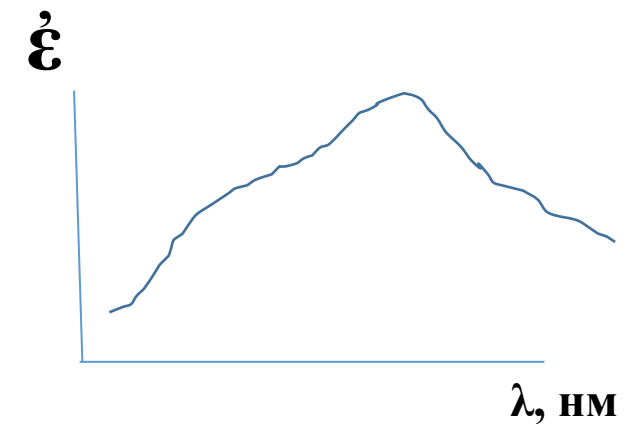
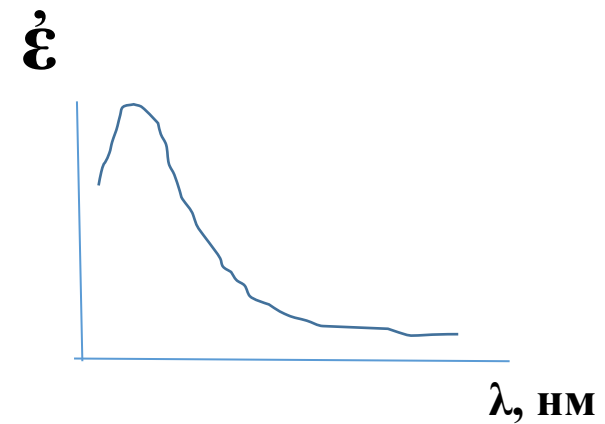


При прохождении монохроматического света через раствор поглощающего свет вещества степень поглощения света прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества и толщине раствора (длине оптического пути). Эти закономерности выражаются законом Ламберта-Бугера-Бера:

$D = \lg(I_0/I) = \epsilon c l$ , где  $D$ -т.н. оптическая плотность,  $I_0$  и  $I$  – интенсивности падающего и прошедшего через объект света,  $l$ -толщина раствора (см.),  $c$ -концентрация вещества в растворе (М/л),  $\epsilon$ - молярный коэффициент поглощения (М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>).

Если заменить десятичный логарифм на натуральный, а молярную концентрацию – на число молекул в см<sup>3</sup>, то вместо  $\epsilon$  используют поперечное сечение поглощения  $s = 3,8 \cdot 10^{-21} \text{ \AA} (\text{cm}^2)$ . Смысл ( $s$ ) – воображаемое эффективное сечение молекулы, при попадании в которое происходит поглощение фотона данной длины волны.

График зависимости  $D$ ,  $\epsilon$  или  $s$  от длины волны называется спектром поглощения. Чем длиннее система сопряженных двойных связей и чем более делокализованы по молекуле  $p$ -электроны, тем максимум поглощения находится в более длинноволновой области.



**Чем длиннее система сопряженных двойных связей и чем более делокализованы по молекуле p-электроны, тем максимум поглощения находится в более длинноволновой области.**

# **Спектры фотобиологического действия**

**Спектром фотобиологического действия называют зависимость фотобиологического эффекта от длины волны действующего света. Количественной характеристикой эффективности действующего света может служить величина, называемая поперечным сечением фотохимической реакции ( $\sigma$ ) – не путать с поперечным сечением поглощения.**

Пусть в кювете находится разбавленный раствор какого-то вещества в концентрации  $n$  молекул в  $\text{см}^3$ ,  $l$ -толщина кюветы, см,  $I_0$  и  $I$  – интенсивности падающего и прошедшего через объект света. Каждую секунду раствор поглощает  $(I_0 - I)$  квантов на квадратный сантиметр и при этом в растворе разрушается –  $(dn/dt) \bullet l$  молекул.

$$- (dn/dt) \bullet l = \varphi(I_0 - I)$$

$\varphi$  -квантовый выход процесса: число поглощенных фотонов/общее число фотонов.

$$\text{Также } I/I_0 = e^{-snl}$$

$$I_0 - I = I_0 \bullet (1 - e^{-snl})$$

$$- (dn/dt) \bullet l = \varphi I_0 \bullet (1 - e^{-snl})$$

при  $snl \leq 0,1$  выражение  $(1 - e^{-snl})$  приблизительно равно  $snl$ .

Следовательно,  $- (dn/dt) \bullet l = \varphi I_0 snl$

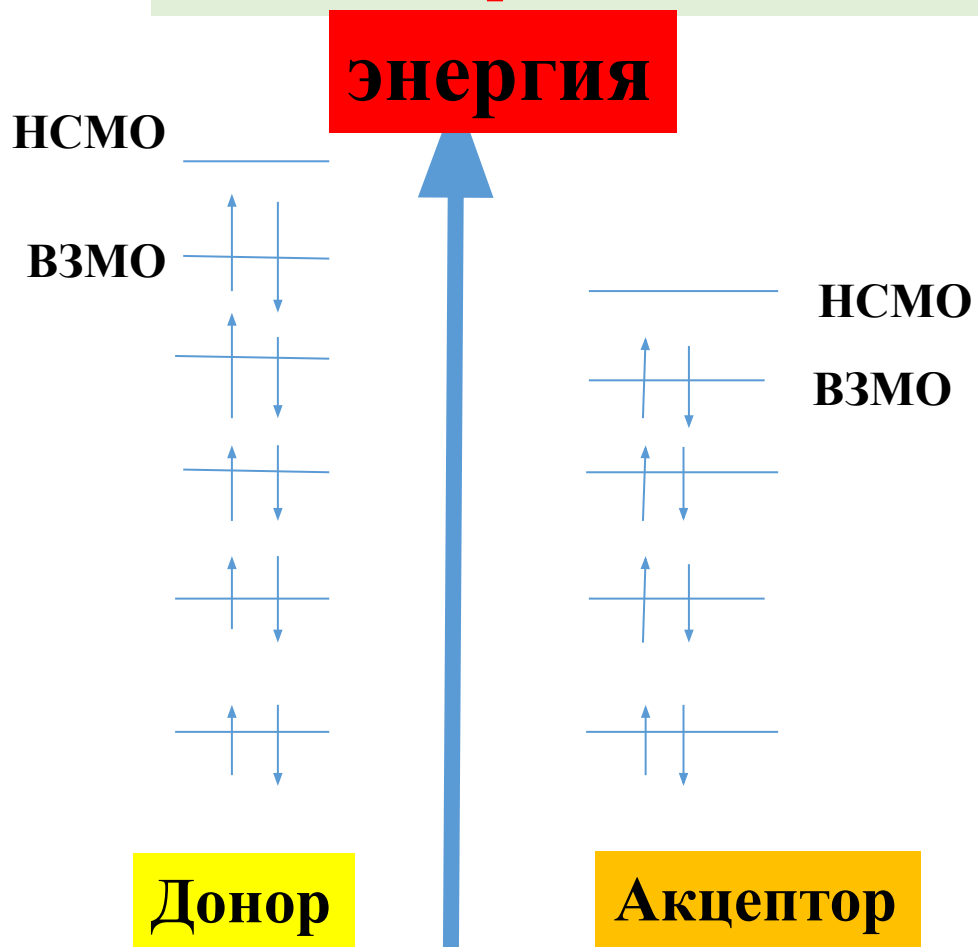
Тогда,  $- (dn/dt) = \varphi I_0 sn$

$$- (dn/n) = \varphi I_0 s dt$$

При интегрировании получаем:

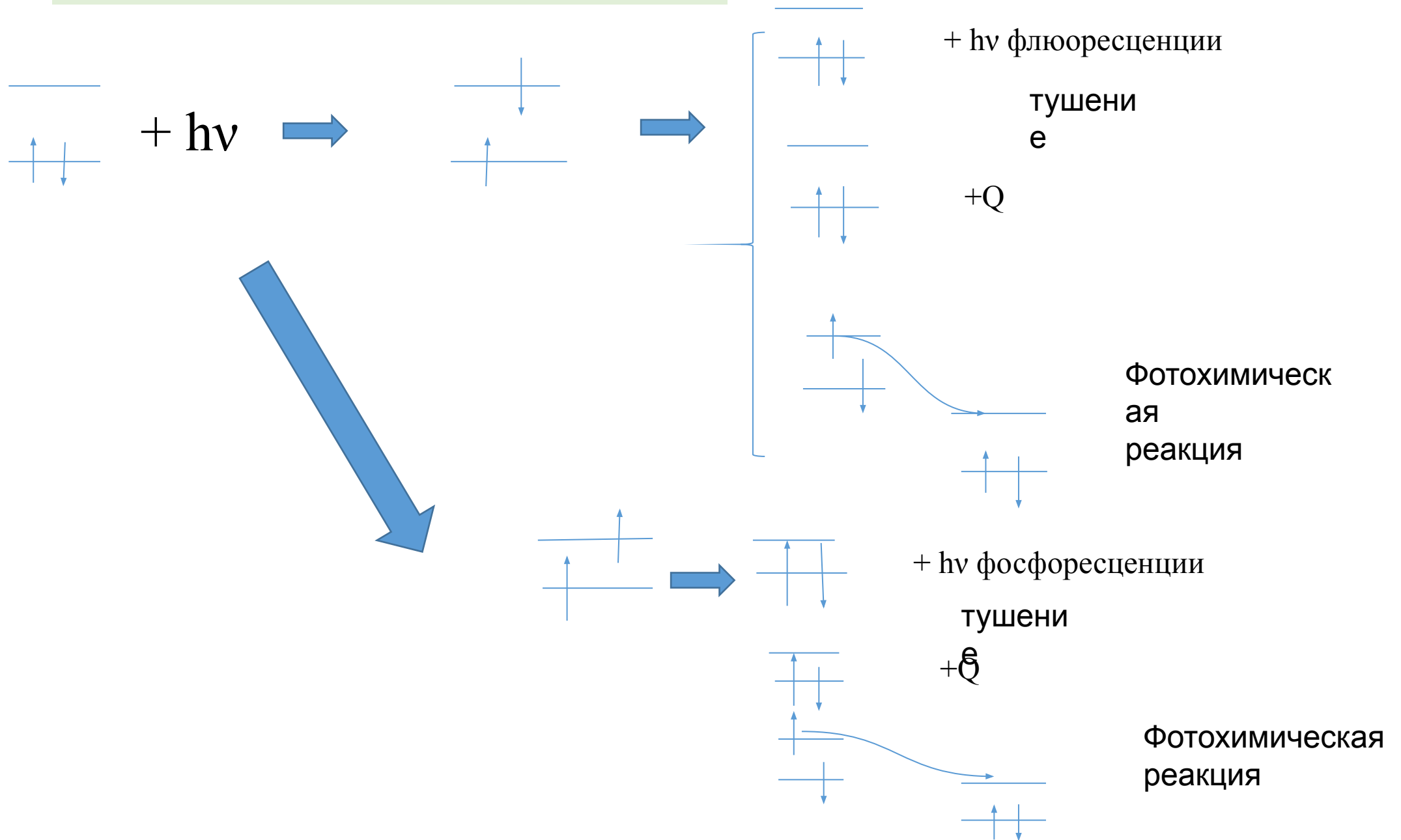
$\ln(n_0/n_t) = \varphi I_0 st = D \sigma$ , где  $D = I_0 t$  – доза облучения, а  $\sigma = \varphi s$  – поперечное сечение фотохимической реакции.

# Электронные переходы в молекулах при поглощении квантов ЭМИ



Согласно теории молекулярных орбиталей (МО), в молекуле существует система молекулярных энергетических уровней, и на каждом из них по два электрона с противоположными спинами. Для химических и оптических свойств молекулы важны самые верхние уровни (именно их электроны принимают участие в химических процессах). Важны таким образом верхняя заполненная молекулярная орбиталь (ВЗМО) и нижняя свободная молекулярная орбиталь (НСМО). Чем выше энергия ВЗМО, тем ниже энергия ионизации, то есть энергия, которую надо затратить, чтобы вырвать электрон из молекулы. Энергия НМСО определяет акцепторные свойства молекулы: чем ниже НМСО, тем более эффективно молекула присоединит электрон. Окислительно-восстановительная реакция будет происходить в том случае, если энергия ВЗМО донора выше энергии НМСО акцептора.

# Люминесценция





# Хемилюминесценция



Или сверхслабое свечение, сопровождающее химические реакции. Его впервые зарегистрировал Гурвич в 1934 году как УФ излучение, испускаемое животными и растительными клетками. В дальнейшем было показано, что источником этого свечения является рекомбинация перекисных свободных радикалов.

**Интенсивность люминесценции ( $I_l$ ), как и интенсивность всякого света (плотностью потока световой энергии) называют отношение энергии, переносимой светом через площадь, перпендикулярную световому лучу, к продолжительности времени переноса и к размеру площади. Измеряется либо в Вт/кв.м, либо в эйнштейнах/кв.м с, где эйнштейн ( $\mathcal{E}$ ) – число фотонов, равное числу Авогадро. Она будет возрастать с увеличением интенсивности падающего света, способности вещества поглощать падающий свет, квантового выхода люминесценции ( $\varphi$ ).**

**Длина волны кванта люминесценции всегда больше, чем кванта возбуждающего света, поскольку часть энергии возбуждения переходит в тепло (Стоксов сдвиг).**

# **Использование люминесценции.**

*Для определения конкретных веществ.*

**Если квантовый выход люминесценции больше 1%, то такие соединения легко обнаруживаются люминесцентным методом.**

**Высоким квантовым выходом обладает триптофан (максимум 350 нм), флавины, НАД•Н и НАДФ•Н, витамины А, В6, Е, некоторые лекарственные вещества – хинин, некоторые канцерогены: бензпирен, дибензантрацен.**

**При возбуждении ближним ультрафиолетом (365 нм) обнаруживаются грибковые инфекции волос по желто-зеленой флюоресценции. Дерматомикозы у животных. Некоторые соединения, исходно не обладающие флюоресценцией, после химической обработки дают соединения, обладающие высоким квантовым выходом. Таковы героин, морфин, витамины С, В, В12. Чувствительность таких методов – до  $10^{-8}$  грамма (или примерно до  $10^{-10}$  М).**

# **Использование люминесценции.**

*Для определения вязкости среды.*

**Степень поляризации флюоресценции (доля поляризованного света в общей суммарной интенсивности флюоресценции) – важный показатель для исследования вязкости среды, содержащей флюоресцирующую молекулу. Если возбуждающий свет поляризован, то и флюоресценция будет поляризована. Но если за время жизни молекулы в возбужденном состоянии ( $\tau$ ) молекула успеет повернуться, то степень поляризации будет ниже, чем в случае, когда она оставалась неподвижной.**

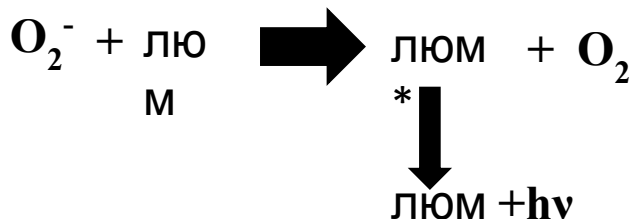
# Использование люминесценции.

*Для определения активности нейтрофилов и макрофагов.*

неактивированный

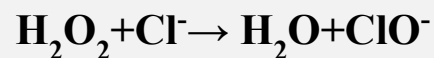
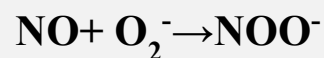
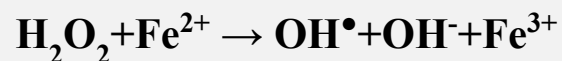
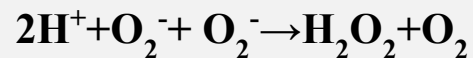
активированный

$O_2^-$



Различными исследователями обнаружено, что активированные нейтрофилы и макрофаги продуцируют супероксидный радикал  $O_2^-$  (обнаружено по восстановлению цитохрома C, а также по индуцированной люминолом хемилюминесценции). У неактивированных клеток продукция активных форм кислорода не зафиксирована.

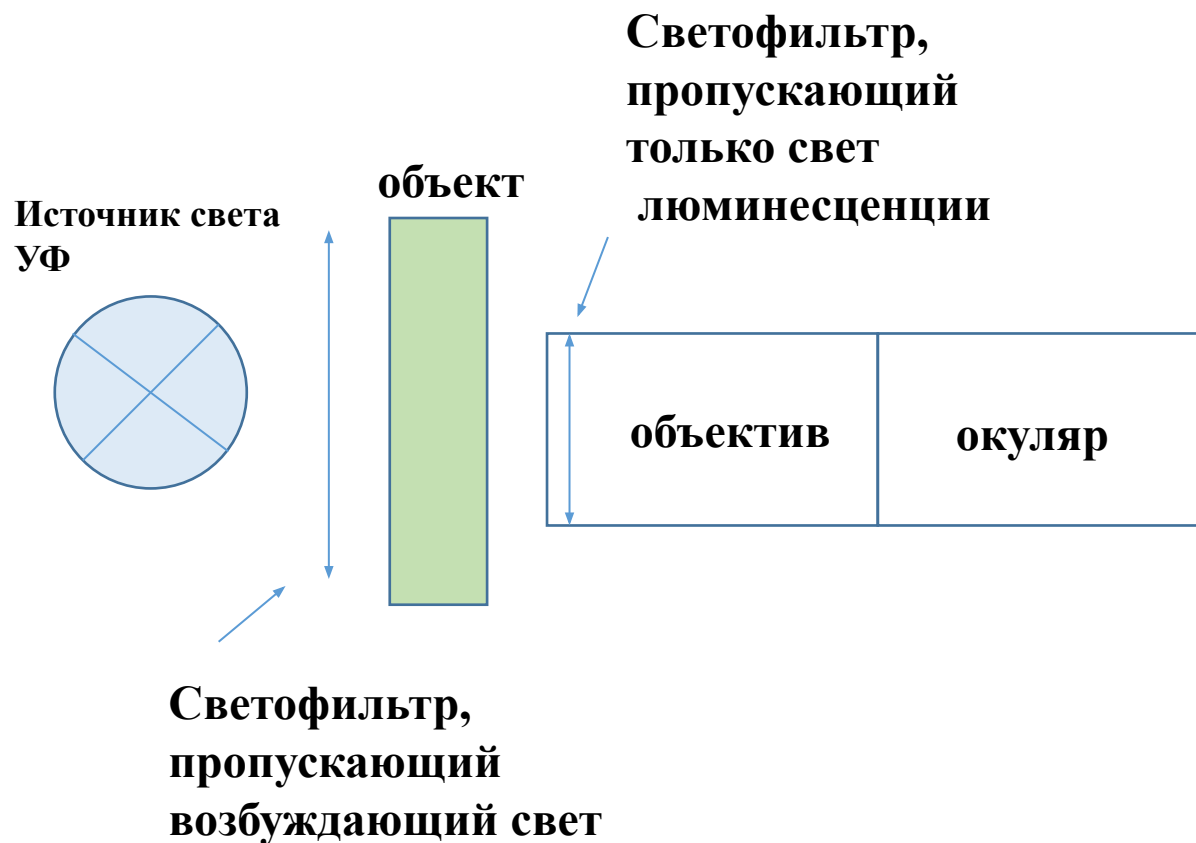
Супероксид претерпевает следующие превращения с образованием мощных окислителей:



Обнаружение супероксидов проводится при помощи люминол-зависимой хемилюминесценции.

# Использование люминесценции.

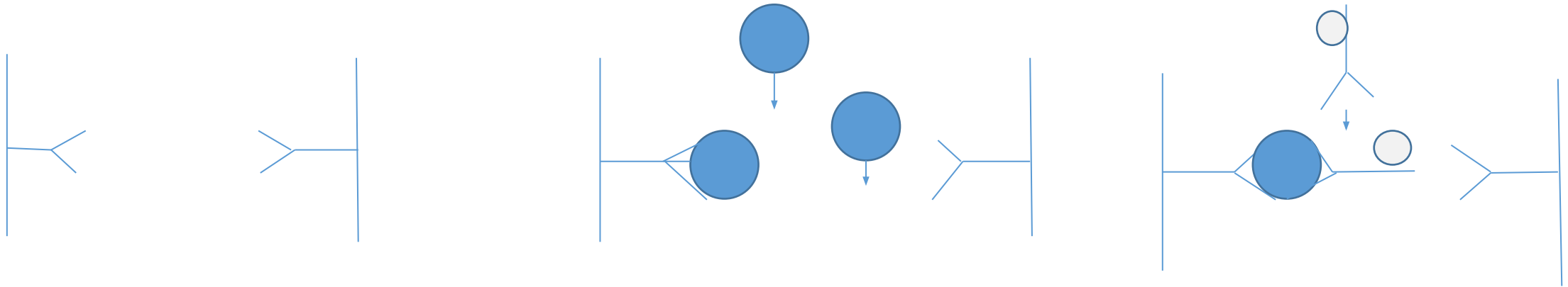
## *Люминесцентная микроскопия.*



При люминесцентной микроскопии можно изучать первичную (ткани и органы человека и животных имеют нерезкую белесую, голубую или синюю люминесценцию) и вторичную люминесценцию клеток и тканей. Изучение вторичной люминесценции живых и фиксированных клеток и тканей (после их «окраски» флюорохромами) получило широкое распространение. При изучении живых клеток флюоресцирующие вещества применяют в очень малых количествах, не вызывающих токсического действия. В цитологических исследованиях Л. м. применяют при диагностике злокачественных новообразований в соскобах, пунктатах, мокроте, промывных водах. Этот метод позволяет быстро получить ярко окрашенный препарат, в котором атипичные клетки выделяются ярким свечением, оттенками цвета и структурой. Л. м. применяется и в гистохимии. Использование акридинового оранжевого позволяет выявить нуклеиновые кислоты, при этом ДНК дает зеленую, а РНК — красную флюоресценцию. Тот же флюорохром в нефиксированных срезах помогает выявить мукополисахариды, а при модификации этого метода — муцины. Фосфин 3R, родамин В, бензпирен и др. выявляют в срезах липиды.

# Использование люминесценции.

*Иммуноферментный анализ.*



 -  
антиген

 -  
антител

 -  
антитело, меченое флюоресцентной меткой

# Фотобиологические процессы.

Обобщенная схема фотобиологического процесса;

Обязательными стадиями этого процесса будут следующие:

1. Поглощение кванта света;
2. Внутримолекулярные процессы размена энергии;
3. Межмолекулярный перенос энергии возбужденного состояния (миграция энергии);
4. Первичный фотохимический акт;
5. Темновые превращения первичных фотохимических продуктов, завершающиеся образованием стабильных продуктов;
6. Биохимические реакции с участием фотопродуктов;
7. Общефизиологический ответ на действие света

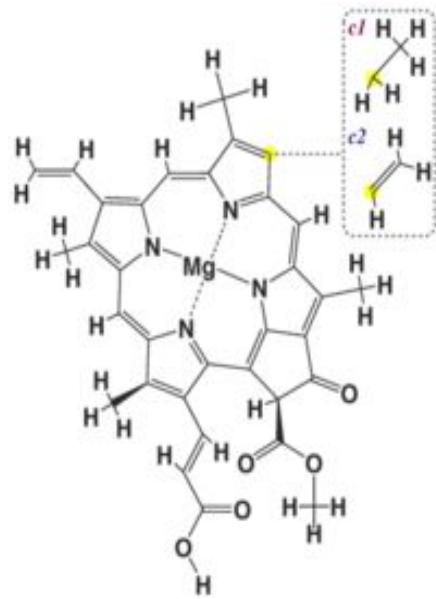
К фотобиологическим процессам относятся процессы, начинающиеся поглощением света одним из биологически важных соединений и заканчивающиеся определенной физиологической реакцией организма.



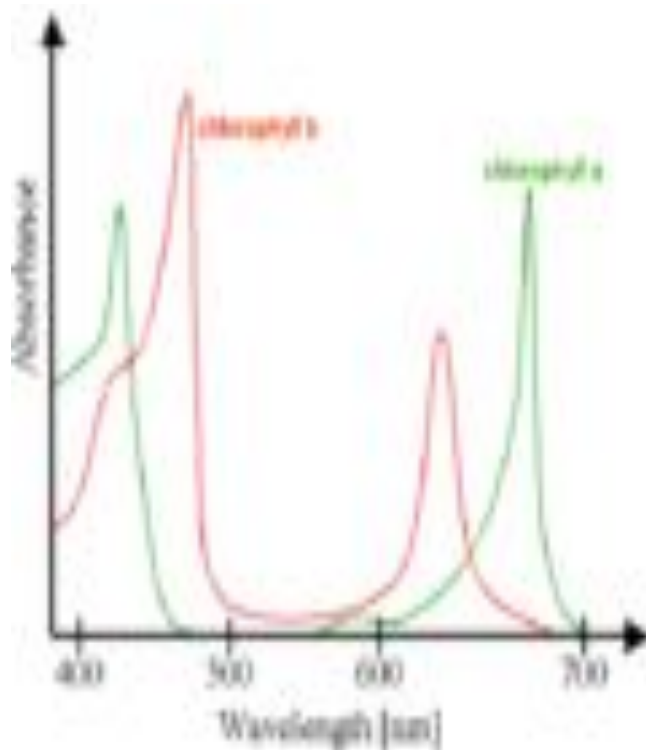
Рассмотрим фотобиологический процесс на примере **Фотосинтеза** —

процесса образования органического вещества из углекислого газа и воды на свету при участии фотосинтетических пигментов (хлорофилл у растений, бактериохлорофилл и бактериородопсин у бактерий).

# 1. Поглощение кванта света



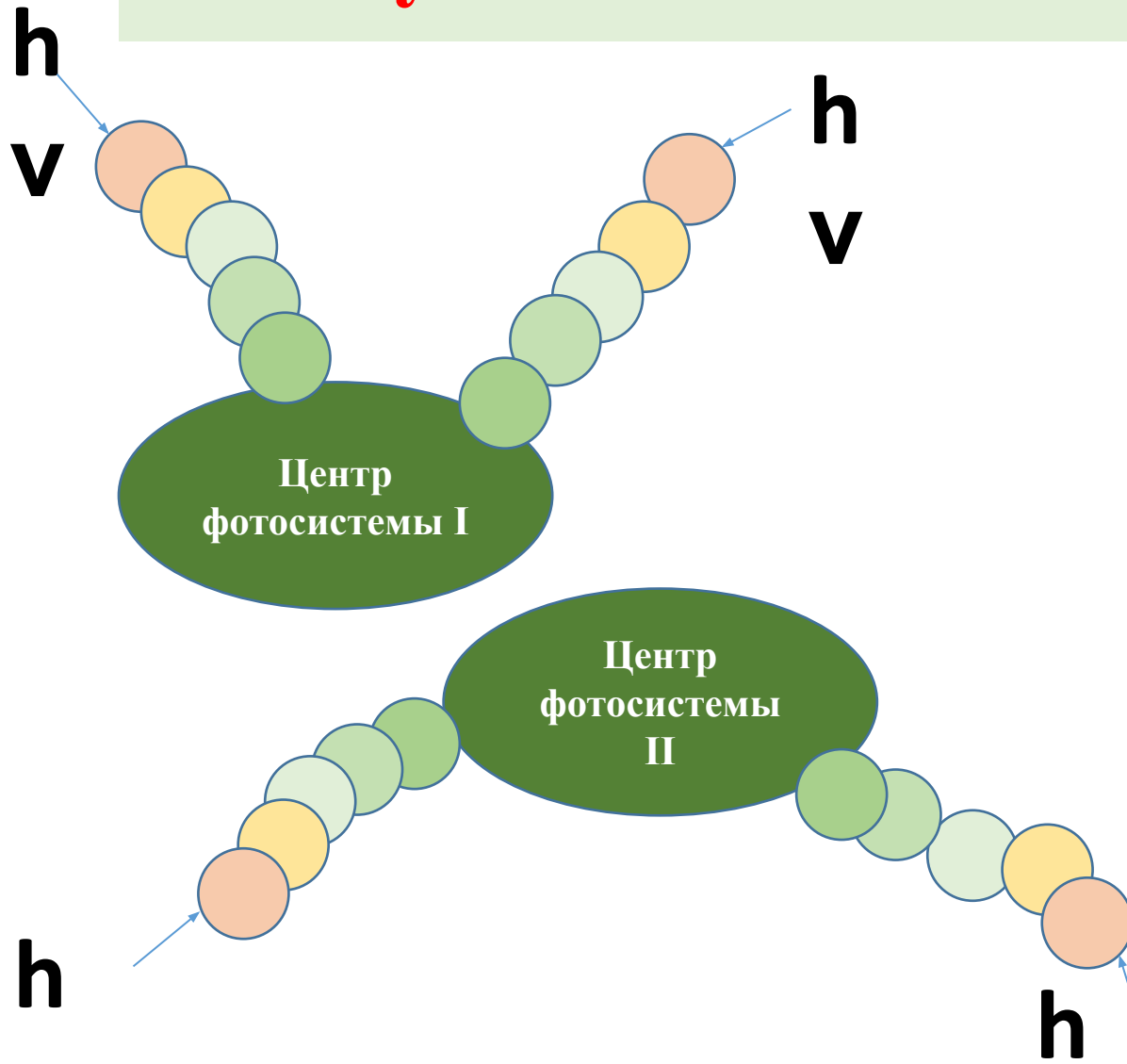
Структура хлорофилла c1 и c2



Поглощение квантов ЭМИ светового диапазона происходит в мембранах тилакоидов. Светособиравший комплекс включает хлорофилл, каротиноиды.

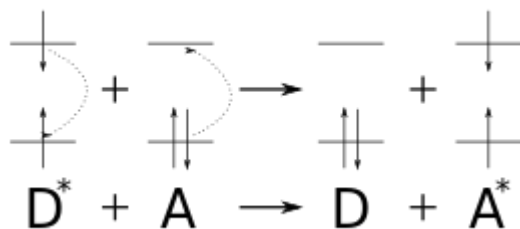
Хлорофилл имеет два уровня возбуждения (с этим связано наличие двух максимумов на спектре его поглощения): первый связан с переходом на более высокий энергетический уровень электрона системы сопряжённых двойных связей, второй — с возбуждением неспаренных электронов азота и кислорода порфиринового ядра. При неизменном спине электрона формируются синглетные первое и второе возбуждённое состояние, при изменённом — триплетное первое и второе.

# Межмолекулярный перенос энергии возбужденного состояния (миграция энергии)



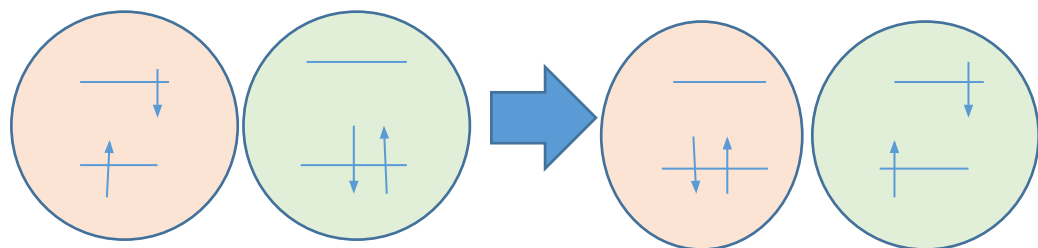
Хлорофилл выполняет две функции: поглощения и передачу энергии. Более 90 % всего хлорофилла хлоропластов входит в состав светособирающих комплексов (ССК), выполняющих роль антенны, передающей энергию к реакционному центру фотосистем I или II. Помимо хлорофилла в ССК имеются каротиноиды, а у некоторых водорослей и цианобактерий — фикобилины, роль которых заключается в поглощении света тех длин волн, которые хлорофилл поглощает сравнительно слабо.

# Механизм передачи энергии



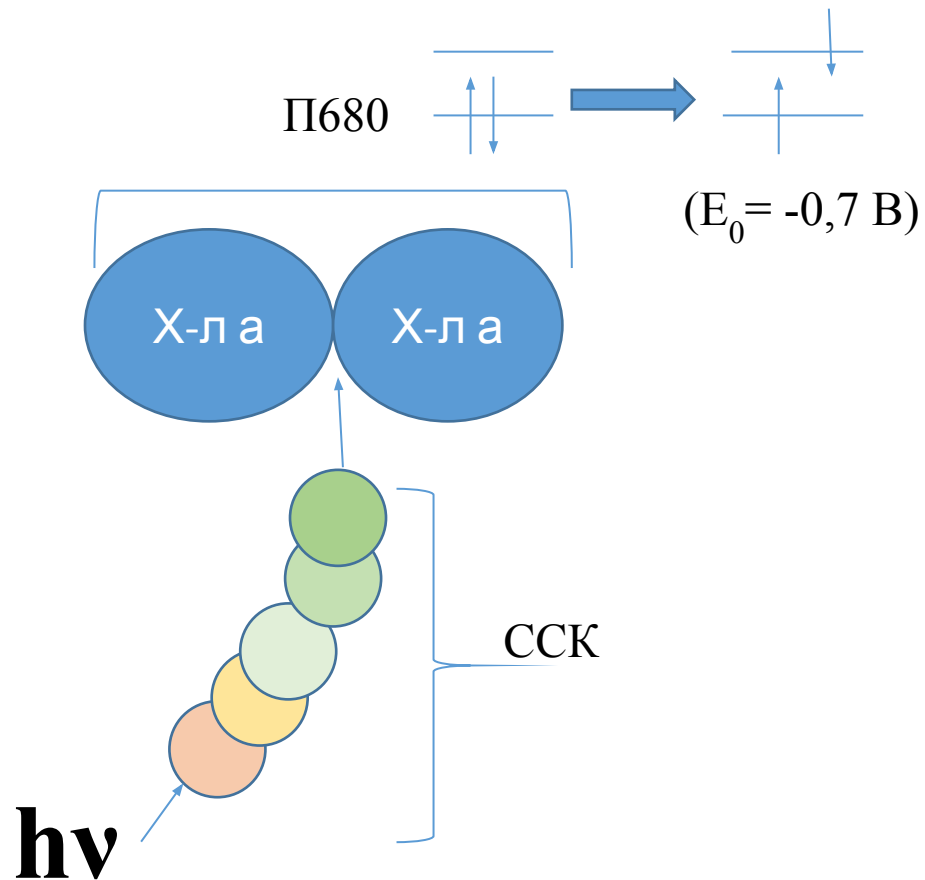
**Механизм индуктивного резонанса (Фёрстеровский перенос энергии или FRET от англ. Förster resonance energy transfer)** был предложен в 1948 году Т. Фёрстером. Данный механизм передачи энергии не предполагает переноса электрона или излучения фотонов и последующего поглощения, т.е. является безызлучательным<sup>1</sup>. Поскольку в возбужденном состоянии электрон представляет собой осциллирующий диполь, создающий переменное электрическое поле, то при выполнении условий резонанса и индукции, он может вызывать аналогичные колебания электрона в соседней молекуле. Условие резонанса заключается в равенстве энергий между основным и возбуждённым состоянием соседних молекул, т.е. необходимо перекрытие спектров поглощения и флуоресценции этих молекул. Также для успешной индукции необходимо близкое расположение взаимодействующих молекул (не более 10 нм). Известно, что межмолекулярное расстояние в ССК составляет от 2 до 3 нм; а существование серии различных нативных форм пигментов обеспечивает хорошее перекрытие их спектров. Всё это создает хорошие условия для передачи энергии по механизму индуктивного резонанса. Скорость передачи энергии при Фёрстеровском переносе находится в диапазоне  $10^{-9}$ - $10^{-12}$  с<sup>[6]</sup>, что связано с передачей энергии последовательно от пигмента-донора к пигменту-акцептору<sup>[7]</sup>

# Механизм передачи энергии



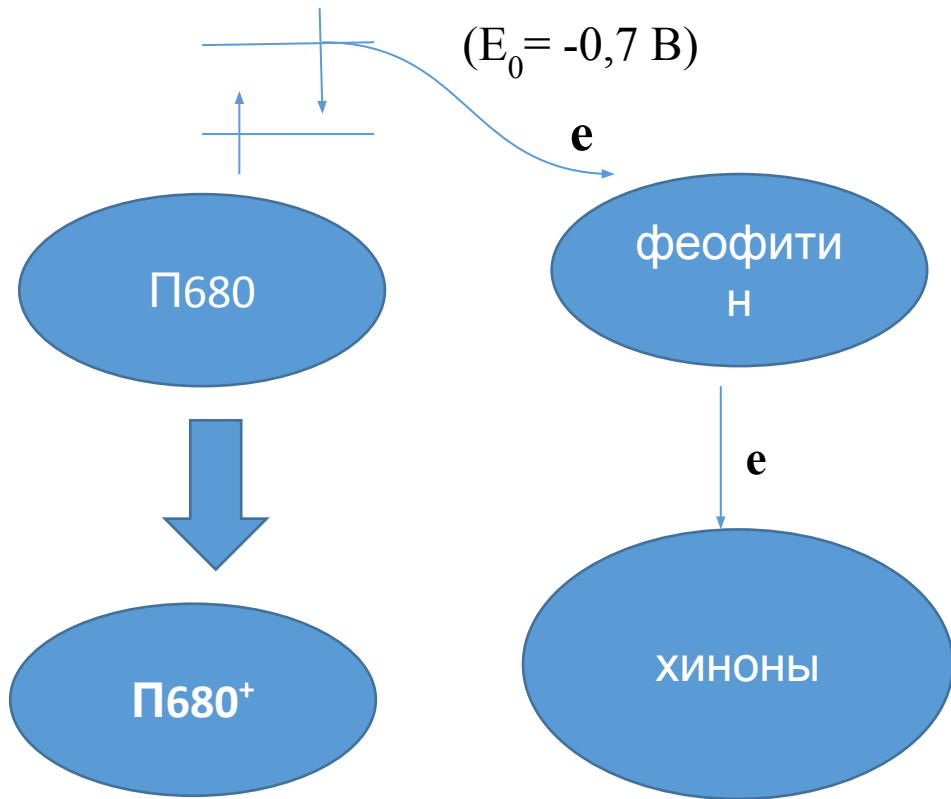
Передача энергии идёт резонансным путём ([механизм Фёрстера](#)) и занимает для одной пары молекул  $10^{-10}$ - $10^{-12}$  сек., расстояние на которое осуществляется перенос составляет около 1 [нм](#). Передача сопровождается некоторыми потерями энергии (10 % от хлорофилла а к хлорофиллу b, 60 % от каротиноидов к хлорофиллу), из-за чего возможна только от пигмента с максимумом поглощения при меньшей длине волны к пигменту с большей. Именно в таком порядке взаимно локализуются пигменты ССК, причём наиболее длинноволновые хлорофиллы находятся в реакционных центрах. Обратный переход энергии невозможен.

# Первичный фотохимический акт. Центр фотосистемы II



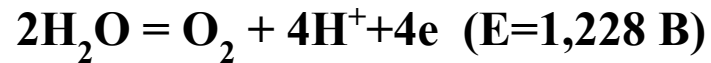
Фотосистема — совокупность ССК, фотохимического реакционного центра и переносчиков электрона. Светособирующий комплекс II содержит 200 молекул хлорофилла а, 100 молекул хлорофилла b, 50 молекул каротиноидов и 2 молекулы феофитина. Реакционный центр фотосистемы II представляет собой пигмент-белковый комплекс, расположенный в тилакоидных мембранах и окружённый ССК. В нём находится димер хлорофилла а с максимумом поглощения при 680 нм (П680). На него в конечном счёте передаётся энергия кванта света из ССК, в результате чего один из электронов переходит на более высокое энергетическое состояние, связь его с ядром ослабляется и возбуждённая молекула П680 становится сильным восстановителем ( $E_0 = -0,7 \text{ В}$ ).

# Первичный фотохимический акт. Центр фотосистемы II



П680 восстанавливает феофитин, в дальнейшем электрон переносится на хиноны, входящие в состав ФС II и далее на пластохиноны. Одна молекула пластохинона переносит 2 электрона и 2 протона, которые берутся из стромы.

# Первичный фотохимический акт. Центр фотосистемы II

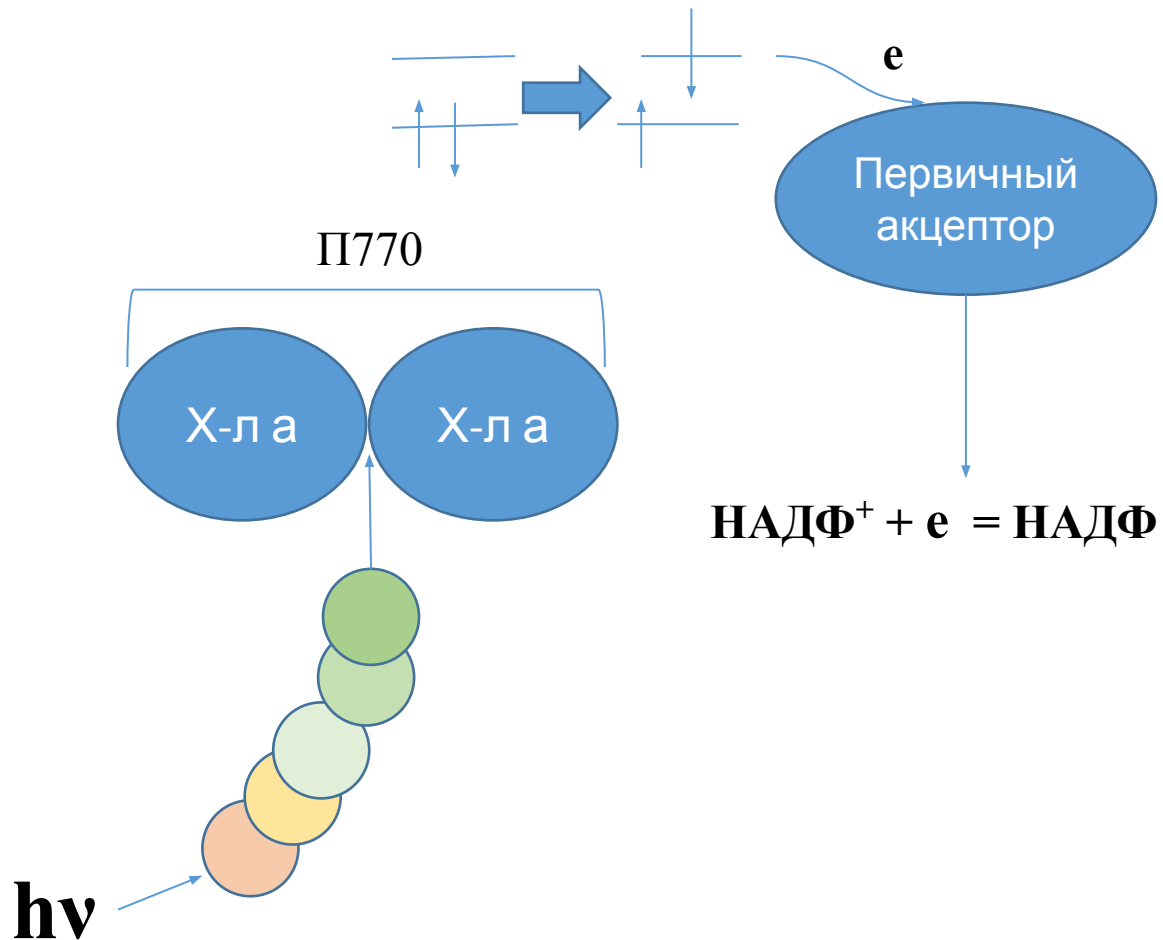


Заполнение электронной вакансии в молекуле P680 происходит за счёт воды. В состав ФС II входит **водоокисляющий комплекс**, содержащий в активном центре ионы марганца в количестве 4 штук. Для образования одной молекулы кислорода требуется две молекулы воды, дающие 4 электрона. Поэтому процесс проводится в 4 такта и для его полного осуществления требуется 4 кванта света. Комплекс находится со стороны внутритилакоидного пространства и полученные 4 протона выбрасываются в него.

Таким образом, суммарный результат работы ФС II — это окисление 2 молекул воды с помощью 4 квантов света с образованием 4 протонов во внутритилакоидном пространстве и 2 восстановленных пластохинонов в мембране.

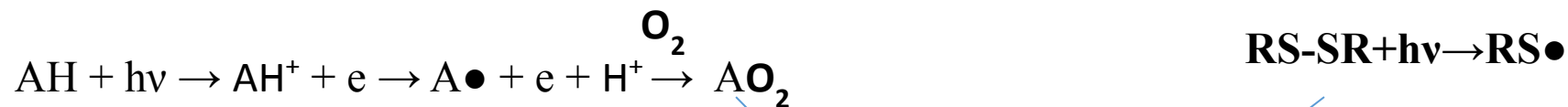


# Первичный фотохимический акт. Центр фотосистемы I



Светособирающий комплекс I содержит примерно 200 молекул хлорофилла. В реакционном центре первой фотосистемы находится димер хлорофилла а с максимумом поглощения при 700 нм (P700). После возбуждения квантом света он восстанавливает первичный акцептор — хлорофилл а, тот — вторичный ([витамин K<sub>1</sub>](#) или [филлохинон](#)), после чего электрон передаётся на [ферредоксин](#), который и восстанавливает НАДФ с помощью фермента [ферредоксин-НАДФ-редуктазы](#).

# Действие УФ-излучения на белковые системы.



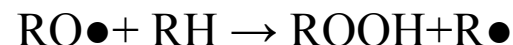
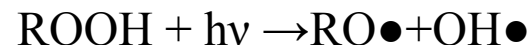
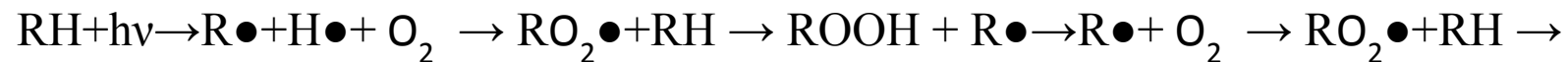
Димеры А-А

Рекомбинация и ХЛ

Нарушение конформации, повреждение активного центра

Энергия УФ кванта не достаточна для фотолиза воды, но достаточна, для выбивания электронов из ароматических аминокислот и гомолитического расщепления цистина

# Действие УФ-излучения на липиды



Наиболее подвержены деструкции под действием УФ ненасыщенные жирные кислоты. В результате атаки УФ-кванта по двойной связи образуется первичный радикал R•. После его взаимодействия с кислородом – пероксидный радикал RO<sub>2</sub>•. При его взаимодействии с молекулой другой жирной кислоты – гидроперекись (ROOH). Последняя, поглощая УФ квант, продуцирует радикальные продукты, способные продолжать цепь. Конечные продукты – продукты рекомбинации свободных радикалов.