تأثیر امواج فراصوت با انرژی پایین بر تمامیت غشای سلول‌های جداکشت جعفری (*Petroselinum crispum* L.)

فائزه قناتی* و سارا سبحان نژاد

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران، ص پ ۱۵۴-۱۴۱۱۵

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۴/۱۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۶/۰۳)

چکیده:

توانایی درک و پاسخ به محرک های فیزیکی در بین تمامی موجودات از اهمیت زیادی برخوردار است. امواج فراصوت به عنوان یک محرک فیزیکی می توانند در شدت های بالا تأثیرات مخربی بر روی سیستم های زنده داشته وتغییرات پایداری در آنها ایجاد کنند. اما در مورد امواج فراصوت با شدت پایین گزارشهایی از تأثیرات ویژه این امواج و کاربردهای آنها در زیست فناوری وجود دارد. یکی از گسترده ترین تأثیرات غیر مخرب امواج فراصوت بر سلول های زنده افزایش نفوذپذیری غشاها است که جذب ترکیبات خارجی و دفع فرآورده های درون سلولی توسط سلول را افزایش می دهد. در تحقیق حاضر سلول های جداکشت جعفری با امواج فراصوت با شدت $455\ mW/cm^3$ و فرکانس ثابت 29 kHz برای مدت زمان ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه تیمار شدند. زنده مانی سلول ها به کمک محلول آبی اوانس بلو سنجیده شد و میزان آسیب به غشاها با سنجش مقدار مالون دی آلدهید، درصد نشت الکترولیت ها و میزان نشت پتاسیم و کلسیم به مایع برون سلولی مورد بررسی قرار گرفت. تیمار سلول ها با امواج فراصوت به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه تأثیری برروی زنده مانی سلول ها و میزان مالون دی آلدهید نداشت اما افزایش زمان تیمار تا ۴۰ دقیقه سبب کاهش معنی دار درصد زنده مانی و افزایش مقدار مالون دی آلدهید و نشت پتاسیم به مایع برون سلولی نسبت به سلول های کنترل شد. نتایج نشان داد که دریافت بیشتر انرژی از امواج فراصوت تمامیت غشاهای سلول های جعفری را کاهش می دهد اما سطوح پایین انرژی این امواج می تواند محرک رشد سلول‌های گیاهی باشد.

کلمات کلیدی: امواج فراصوت، تمامیت غشا، سلول های جعفری.

مقدمه:

امروزه مطالعه در مورد تأثیر عوامل فیزیکی بر سیستم‌های زنده گسترش یافته است. یکی از این عوامل امواج فراصوت (Ultrasound) می باشد. توانایی درک و پاسخ به محرک های فیزیکی در بین تمامی موجودات از اهمیت زیادی برخوردار است. مطالعات اولیه در مورد اثرات و خطرات احتمالی استفاده از امواج فراصوت بر روی درمان انسان و جانوران متمرکز بود. درحالی که امروزه اثرات مفید و کاربردهای باالقوه امواج فراصوت با شدت پایین در سیستم‌های زیستی و فرآیندهای زیست فناورانه توجه زیادی را به خود جلب کرده است. امواج فراصوت با شدت های بالا تأثیرات مخربی بر سیستم های زنده دارند که از جمله آن ها می توان به تخریب غشاهای سلولی و غیر فعال کردن مولکول های زیستی مانند آنزیم‌ها و DNA اشاره کرد در حالیکه بنابر مطالعات انجام شده استفاده از امواج فراصوت با انرژی پایین می تواند سبب القای فعالیت های آنزیمی و تغییر ساختار اندامک های درون سلولی و

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: ghangia@modares.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.4.9]

همچنین افزایش رشد سلول ها شود (Liu *et al.*, 2003a). یکی از گسترده ترین تأثیرات غیر مخرب فراصوت بر سلول های زنده افزایش نفوذپذیری غشاها است که جذب ترکیبات خارجی و دفع فرآورده های درون سلولی توسط سلول را افزایش می دهد. افزایش نفوذپذیری غشا جهت انتقال ترکیبات خارجی به درون سلول های زنده تحت تأثیر امواج فراصوت را Sonoporation می‌نامند. انرژی امواج فراصوت می‌تواند با تأثیر مستقیم بر غشا ها و تغییر نفوذ پذیری آنها باعث نفوذ دارو (به ویژه داروهای ضد سرطان) به بافت شده و سبب تقویت تأثیرات این داروها گردد. بیشتر بررسی‌های انجام شده بر روی سلول‌های جانوری صورت گرفته و مطالعه تأثیرات فیزیولوژیک امواج فراصوت بر سلول‌های گیاهی کمتر مورد توجه بوده است (Liu *et al.*, 2003a). میزان تأثیر امواج فرا صوت بر سلول، به شدت امواج و مدت زمان قرارگرفتن سلول ها در معرض این امواج بستگی دارد (Rezaei *et al.*, 2011). گزارش‌های زیادی مبنی بر تأثیر امواج فراصوت با انرژی کم بر افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مختلف مانند بادام زمینی، سرخدار و فندق وجود دارد (Wu and Ge, 2004; Sales and Resurreccion, 2010; Safari *et al.*, 2013). با وجود این در هیچ یک از مطالعات فوق، چگونگی و مکانیسم تأثیرامواج بر فیزیولوژی سلول‌های گیاهی بررسی نگردیده است و تنها به مطالعه کمی تأثیر این امواج بر میزان تولید متابولیتهای ثانویه پرداخته شده است. همچنین این گزارشها عنوان کرده اند که عمده تأثیر این امواج بر آزاد سازی متابولیت‌های ثانویه از طریق افزایش نفوذپذیری غشا صورت می گیرد (Pong *et al.*, 2006). هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر زمان‌های مختلف قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت بر تمامیت غشای سلول‌های جداکشت جعفری می‌باشد.

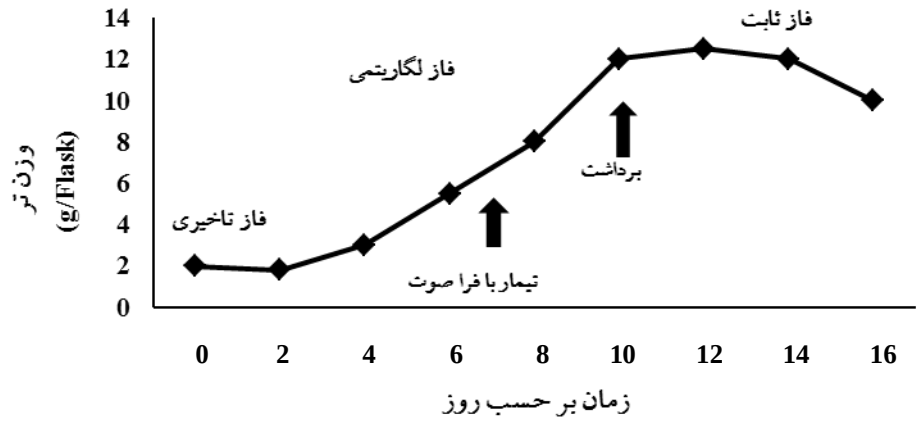
مواد و روش‌ها:

کشت سلولی و تیمار سلول ها با امواج فراصوت: در این تحقیق ابتدا یک رده سلولی با رشد سریع از گیاه جعفری بنیان گذاری شد. به این منظور از بذرهای جعفری در محیط پایه LS جامد با ترکیب $1/5\ mg\ L^{-1}$ کینتین، $1/5\ mg\ L^{-1}$ تیامین، $0/75\ mg\ L^{-1}$ پیریدوکسین، $0/75\ mg\ L^{-1}$ نیکوتینیک اسید (pH=۵.۸) ، گیاهچه به دست آمد. سپس با استفاد از کشت قطعاتی از گیاهچه ها در همین محیط، کالوس ایجاد شد (Rajabbeigi *et al.*, 2013). پس از چندین نسل واکشت سلول ها در محیط فوق، با وارد کردن قطعاتی از کالوس‌ها (حدود ۲ گرم) در محیط مایع (با همان اجزا ولی فاقد آگار) کشت‌های تعلیقی بنیان گذاری شد. سلول‌ها در محیط کشت تعلیقی در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شده و بعد از ۲۰ بار واکشت و رسیدن به پایداری ژنتیکی، منحنی رشد آنها رسم گردید (شکل ۱). براساس این منحنی، سلول‌ها در روز هفتم واکشت، (در فاز لگاریتمی رشد) تحت تیمار با امواج فراصوت قرار گرفتند. به منظور تیمار سلول‌ها از پروب اولتراسونیک مرکب از ٤ کریستال پیزوالکتریک در انتهای یک لوله شیشه ای ته بسته به قطر ۲ cm به شکل استوانه استفاده شد. تیمار سلول‌ها با امواج فراصوت با شدت $455\ mW/cm^3$ و فرکانس ثابت 29 kHz برای مدت زمان ۱۰، ۲۰ و ٤۰ دقیقه انجام گرفت. فرکانس ۲۵-۲۹ کیلوهرتز فرکانسی است که در آن امواج فراصوت سبب تخریب بافت‌های نرم نمی‌شوند و به همین سبب در سیستم‌های پیزوالکتریک با کاربرد پزشکی (جراحی، دندانپزشکی و...) مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hoigne *et al.*, 2006 ; Labanca *et al.*, 2008). توان دستگاه و زمان‌های قرارگرفتن سلول‌ها در معرض امواج بر اساس مطالعات قبلی انجام گرفته بر روی سایرسلول‌های گیاهی انتخاب شد (Safari *et al.*, 2013). سلول‌ها پس از سه روز از محیط جدا شده و بررسی‌های مورد نظر بر روی آنها انجام شد.

اندازه گیری رشد و تعیین درصد زنده مانی سلول‌ها: از وزن تر به عنوان معیاری برای تعیین رشد سلول‌ها استفاده شد. بدین منظور سلول‌ها بر روی قیف بوخنر واجد کاغذ صافی و نایلون مش (٤۲ µM) و با استفاده از فشار منفی (پمپ خلاء) صاف شده و سپس وزن شدند. همچنین برای تعیین درصد زنده مانی، سلول‌ها بلافاصله پس از برداشت با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.4.9]



شکل۱- منحنی رشد سلول‌های جعفری در محیط کشت تعلیقی

محلول آبی اوانس بلو (۰/۲۵ درصد) رنگ آمیزی و پس از گذشت سه دقیقه با آب مقطر شسته و در زیر میکروسکوپ نوری (Olympus, BH_2, Japan) مشاهده شدند. با شمارش سلول‌های مرده و زنده و محاسبه کل آنها، درصد زنده بودن سلول‌ها تعیین گردید (Smith *et al.*, 1984).

آنالیز های بیوشیمیایی: میزان آسیب به غشاها با اندازه گیری میزان مالون دی آلدهید (MDA) به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، و نیز با تعیین میزان نشت الکترولیت ها از غشای سلول ها اندازه گیری شد. به منظور اندازه گیری میزان MDA، ۲۰۰ mg از سلول های منجمد شده با ۳ mL تری کلرو استیک اسید ۱۰% ساییده شد. نمونه ها پس از همگن سازی، سانتریفیوژ شدند. به۱ mL از نمونه های صاف شده، ۱ mL تیوباربیتوریک اسید ۰/۵% اضافه گردید و به مدت نیم ساعت در دمای ۷۰ °C قرار داده شد. پس از این مدت نمونه‌ها بلافاصله بر روی یخ سرد شدند و میزان MDA با اندازه گیری جذب در طول موج های ٤٤٠، ٥٣٢ و ٦٠٠ نانومتر به منظور حذف تداخل جذب پروتئین‌ها و سوکروز و ضریب ثابت (ε =۱۵۷ $mM^{-1}cm^{-1}$) محاسبه گردید (Hodges *et al.*, 1999).

برای اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها، سلول‌ها بلافاصله بعد از تیمار با امواج فراصوت صاف شده و به منظور شسته شدن اضافات محیط کشت دو بار با آب دیونیزه آبکشی شدند. به 200 mg از سلول‌ها 10 mL آب دیونیزه اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 25 °C بر روی شیکر قرار گرفت. هدایت الکتریکی محلول‌ها به وسیله دستگاه Conductivity meter PT-20 (Sartorius, Germany) در دمای 25 °C اندازه گیری شد (EC_1). سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب 100 °C قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها در دمای اتاق میزان هدایت الکتریکی محلول برای بار دوم اندازه‌گیری شد (EC_2) و میزان نشت الکترولیت‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Chen *et al.*, 2008).

$$EL(\%) = EC_1/EC_2 \times 100$$

تأثیر تیمار با امواج فراصوت بر تمامیت غشا ی سلول‌های جعفری همچنین با اندازه‌گیری میزان پتاسیم و کلسیم نشت یافته به مایع برون سلولی مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور بافر 5mM MES تهیه گردید که حاویM ۰/۱۷۵ مانیتول ، mM K_2SO_4 ۰/۵ ،mM $CaCl_2$ ۰/۵ بود و pH آن توسط بافر تریس بر روی ٦ تنظیم گردید.سلول‌ها از محیط کشت جدا شده و توسط بافر مذکور شسته شدند. مقادیر ۱/٤ و ۲/۱ گرم از سلولها (به ترتیب برای پتاسیم و کلسیم)، به مدت یک ساعت در بافر مذکور و بر روی شیکر انکوبه شدن و پس از آن،به مدت ۱۰، ۲۰ و ٤۰ دقیقه مورد تیمار با امواج فراصوت قرار گرفتند. بلافاصله پس از تیمار سلول‌ها توسط قیف و کاغذ صافی (بدون پمپ خلا) از بافر جدا شده و 1-1.5 mL از بافر برای سنجش K^+ و Ca^{2+} توسط دستگاه جذب اتمی (AA-670, Flame emission-absorption spectrophotometer, Shimadzu, Japan) مورد استفاده قرار گرفت (Wu and Lin, 2002).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.4.9]

آنالیز آماری: کلیه آزمایشات با سه تکرار از حداقل سه نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و آزمون دانکن جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P\leq0.05$ انجام شد.

نتایج:

تأثیر امواج فراصوت بر میزان رشد و درصد زنده مانی سلول ها: بررسی تغییرات رشد (وزن تر) سلول‌های جعفری پس از تیمار با امواج فراصوت در زمان‌های مختلف تغییر معنی‌داری را در میزان رشد سلول‌هایی که به مدت ۱۰ دقیقه در معرض امواج فراصوت قرار داشتند نسبت به گروه کنترل نشان نداد. اما میزان رشد سلول‌هایی که به مدت ۲۰ دقیقه با امواج فراصوت تیمار شده بودند در مقایسه با شاهد به طرز معنی داری افزایش یافت (شکل ۲).

رنگ آمیزی با اوانس بلو درصد سلول‌های زنده را نشان می‌دهد. در این رنگ آمیزی سلول‌های زنده که غشای سیتوپلاسمی و غشای واکوئولی آنها سالم است رنگ نشده می مانند در صورتی که سیتوپلاسم سلول‌های آسیب دیده و مرده کاملاً به رنگ آبی در می‌آید و تیره دیده می‌شود. در تحقیق حاضر این رنگ آمیزی نشان داد که درصد زنده مانی سلول هایی که تا ۲۰ دقیقه در معرض امواج فراصوت قرار داشتند در مقایسه با گروه شاهد تغییری نداشت. همچنین تغییری در شکل ظاهری سلول‌ها و تمامیت آنها در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد (شکل۳). اما تیمار سلول های جعفری به مدت ٤٠ دقیقه با امواج فراصوت باعث کاهش معنی دار رشد و زنده مانی آنها در مقایسه با گروه شاهد گردید (شکل۳).

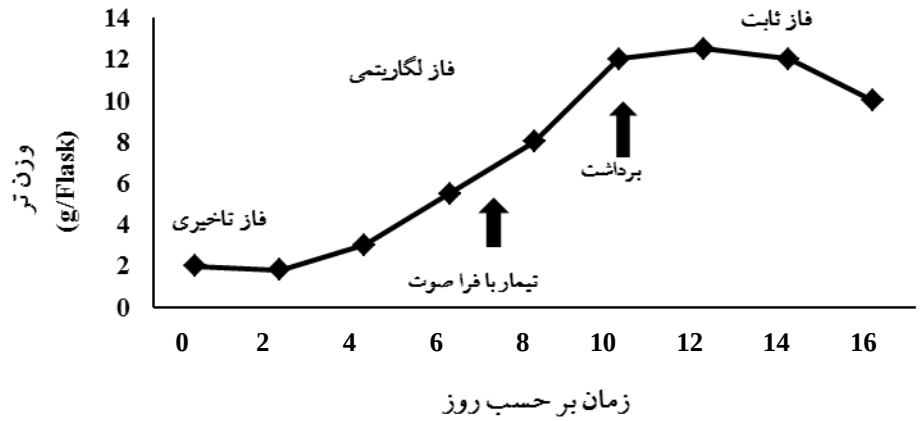
تأثیر امواج فراصوت بر تمامیت غشای سلول‌ها: همانطورکه در شکل ٤ ملاحظه می‌شود استفاده از امواج فراصوت تا زمان 20 دقیقه تأثیرات تخریبی بر غشا سلول‌های جداکشت جعفری نداشت و تفاوت معنی داری در میزان MDA و نشت الکترولیت‌ها از سلول‌ها در مقایسه با نمونه های شاهد مشاهده نشد. در حالیکه درسلول‌هایی که 40 دقیقه در معرض این امواج قرار داشتند میزان MDA و نشت الکترولیت ها افزایش یافت (شکل٤). همچنین میزان نشت K^+ و Ca^{2+} از غشای سلول های تحت تیمار با امواج فراصوت در زمان های 10 و 20 دقیقه تفاوت معنی داری با کنترل نداشت در حالیکه میزان نشت K^+ به مایع برون سلولی در سلول هایی که به مدت 40 دقیقه در معرض تیمار با امواج فراصوت قرار گرفته بودند به طرز معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت (شکل۵). میزان Ca^{2+} نشت یافته به محیط در این گروه از سلول ها نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد (شکل٦).

بحث:

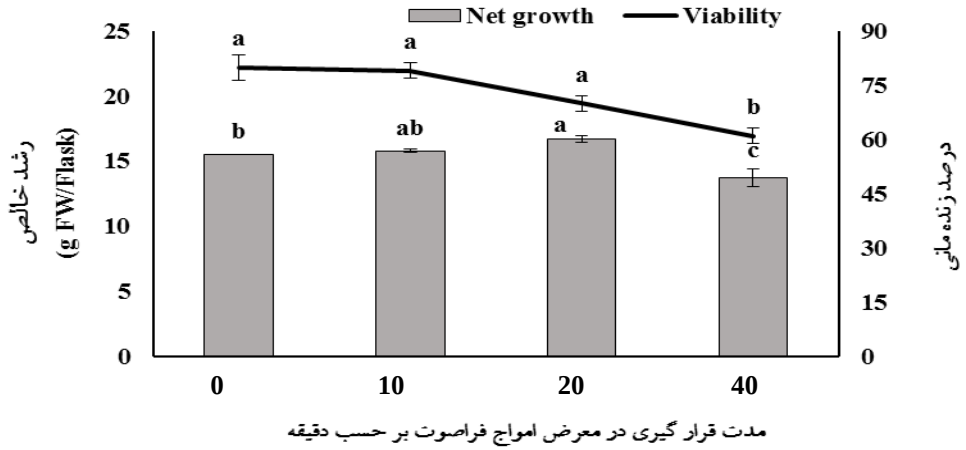
مطالعات نشان داده است که امواج فراصوت بسته به سطح تابش (زمان و شدت تابش) می توانند طیف گسترده ای از تأثیرات مختلف زیستی را ایجاد کنند. سطوح کم انرژی، تأثیرات مفید و قابل بازگشتی را در سطح سلول ایجاد می کنند در حالی که شدت‌های بالای تابش سبب مرگ آنی سلول‌ها می شود (Haar, 2007). در تحقیق حاضر نشان داده شد که استفاده از امواج فراصوت در زمان‌های کوتاه نه تنها میزان رشد و زنده مانی سلول‌ها را کاهش نداد بلکه تا حدی سبب افزایش زیتوده نیز شد. افزایش رشد و تکثیر سلولی در زمان های کوتاه تیمار با امواج فراصوت در کشت‌های تعلیقی هویج، برنج و آلوئه گزارش شده است (Wang *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2003a,b). این محققین همچنین نشان داده اند که امواج فراصوت با انرژی کمتر سبب افزایش هیدرولیز ATP به وسیله ATPase واکوئلی می شود در حالی که افزایش زمان تأثیر (افزایش میزان انرژی فراصوت) سبب کاهش فعالیت این پمپ می گردد و از آن طریق سبب برهم خوردن جریان ورود و خروج یون‌ها به سلول و نشت الکترولیت‌ها از خلال آن می گردد (Liu *et al.*, 2003a). در همین راستا، در تحقیق حاضر نیز با افزایش زمان تابش (افزایش میزان انرژی)، میزان رشد و درصد زنده مانی سلول‌ها کاهش یافت. غشای سلول یکی از اولین و مهم ترین بخش‌هایی است که تحت تأثیر تنش‌های مختلف قرار می‌گیرد (Loseva *et al.*, 2004). افزایش نفوذپذیری سلول

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

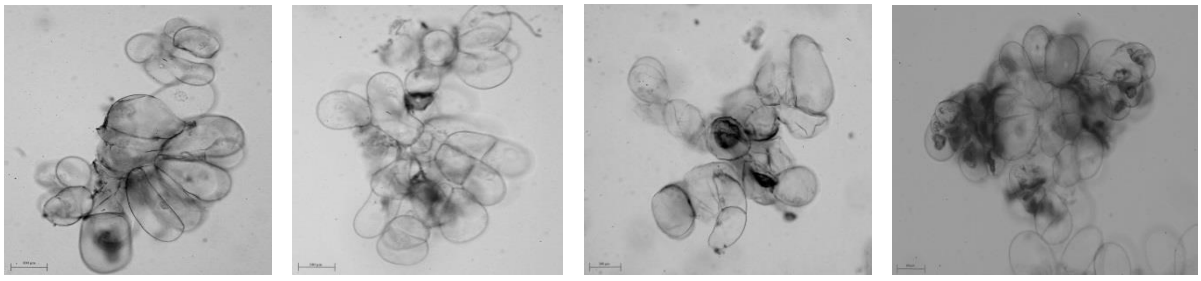
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.4.9]



شکل۱- منحنی رشد سلول‌های جعفری در محیط کشت تعلیقی



شکل ۲- میزان رشد و زنده بودن سلول‌های جداکشت جعفری (*Petroselinum crispum* L.) پس از قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت در زمان‌های مختلف. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار ± SD (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح P≤0.05 بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

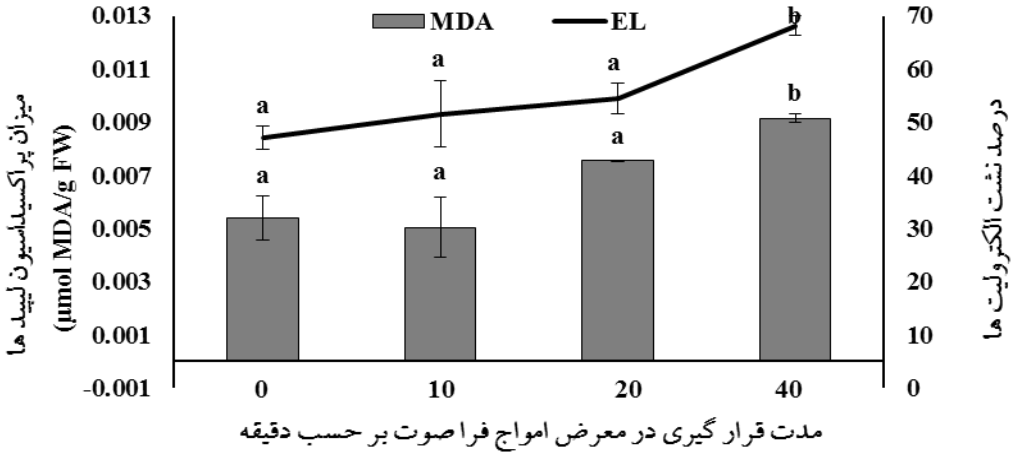


مدت زمان قرارگیری در معرض امواج فراصوت ۴۰ دقیقه | مدت زمان قرارگیری در معرض امواج فراصوت ۲۰ دقیقه | مدت زمان قرار گیری در معرض امواج فراصوت۱۰ دقیقه | مدت زمان قرارگیری در معرض امواج فراصوت صفردقیقه

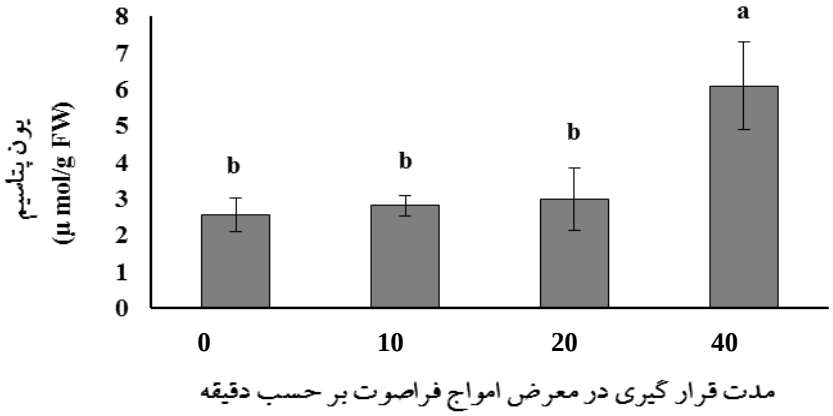
شکل۳- تاثیر تیمار با امواج فراصوت در زمان‌های مختلف بر زنده مانی و ریخت شناسی سلول‌های جداکشت جعفری. رنگ آمیزی سلول‌ها با اوانس بلو انجام شد. مقیاس معادل۱۰۰ µ m است.

به دنبال پدیده Cavitation یکی از تأثیرات ایجاد شده تحت تأثیر امواج فراصوت می‌باشد (Sundaram *et al.*, 2003). افزایش

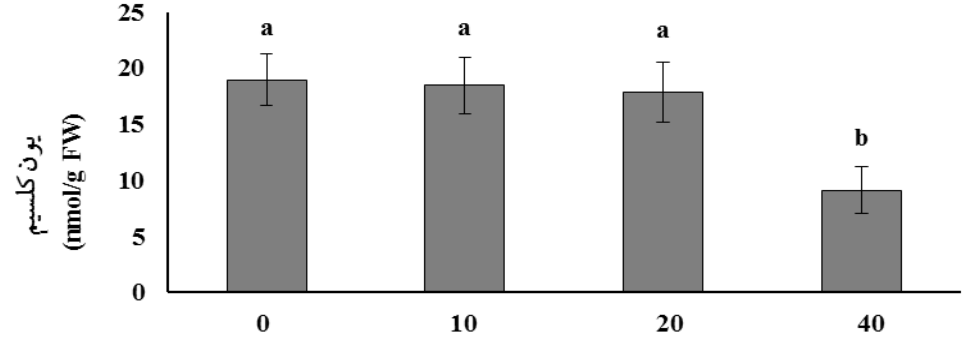
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.4.9]



شکل ٤- تاثیر امواج فراصوت در زمان‌های مختلف بر میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و میزان نشت الکترولیت ها در سلول‌های جداکشت جعفری (*Petroselinum crispum* L.). مقادیر نشان داده شده میانگین ٣ تکرار ± SD (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح P≤0.05 بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل٥- تاثیر امواج فراصوت در زمان‌های مختلف بر میزان نشت K^+ از غشای سلول‌های جداکشت جعفری (*Petroselinum crispum* L.). مقادیر نشان داده شده میانگین ٣ تکرار ± SD (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح P≤0.05 بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل٦- تاثیر زمان‌های مختلف تیمار با امواج فراصوت بر نشت Ca^{2+} از غشای سلول‌های جداکشت جعفری (*Petroselinum crispum* L.) مقادیر نشان داده شده میانگین ٣ تکرار ± SD (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح P≤0.05 بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.4.9]

نفوذپذیری سلول به تشکیل منافذ در یک یا چند سیستم غشایی سلول گیاهی بستگی دارد که عبور مولکول‌های مختلف را به درون و بیرون سلول امکان پذیر می سازد. تیمار سلول ها به طور متناوب می تواند باعث افزایش نفوذپذیری آنها شده و بنابراین امکان استفاده حداکثری از ظرفیت بیوسنتزی سلول ها را فراهم می‌کند (Brodelius *et al.*, 1989). اندازه گیری میزان نشت الکترولیت‌ها (EL) میزان نشت K^+ و Ca^{2+} و مقدار مالون دی آلدهید (MDA) به عنوان شاخص‌های پایداری غشا نشان داد که در سلول‌هایی که در زمان‌های کوتاه تحت تأثیر امواج فراصوت قرار داشته‌اند این پارامترها تغییر معنی‌داری در مقایسه با کنترل نداشت و این بدان معنی است که در این سلول‌ها تمامیت غشا سلول حفظ شده است. حفظ شکل ظاهری و مورفولوژی این سلول‌ها و مشاهده نشدن پلاسمولیز یا تورژسانس در آنها نیز این موضوع را تأیید می کرد. تأثیر ولی در زمان‌های طولانی تر تابش افزایش میزان نشت الکترولیت ها و MDA افزایش یون پتاسیم شد. مطالعات اخیر انجام شده بر روی سلولهای جانوری با کمک آشکارسازی کلسیم، القای یک جریان کلسیمی به سمت داخل سلول تحت تابش فراصوت را نشان داده است، اما مکانیسم دقیق آن هنوز مشخص نیست (Kumon *et al.*, 2007). کاهش یون کلسیم در مایع برون سلولی در تحقیق حاضر هم راستا با نتایج سایر محققین است و ممکن است به سبب افزایش جریان Ca^{2+} خارج سلولی به داخل سلول می‌باشد (Ebel and Mithofer, 1998; Wu & Lin, 2002).

درک تنش مکانیکی در گیاهان در سطح غشای پلاسمایی و از طریق ارتباطات موجود بین اسکلت سلولی، غشای پلاسمایی و دیواره سلولی انجام می‌گیرد. تغییر در میزان کلسیم آزاد سیتوزولی به عنوان نتیجه‌ای از درک انواع تنش‌های فیزیکی در نظر گرفته می‌شود. مسیر پیام رسانی کلسیم می تواند از طریق باز شدن کانال‌های یونی بروز کند که نتیجه آن، شکل‌گیری جریان کلسیم از محلی با شیب الکتروشیمیایی بالا مانند خارج سلول و یا ذخیره‌گاه‌های درون سلولی به محلی با شیب کمتر می‌باشد. اثر متقابل بین میزان ورود کلسیم به سلول از طریق کانال‌ها و خروج آن توسط ناقلین و پمپ‌ها، باعث حفظ شیب کلسیم و در نتیجه ایجاد Ca^{2+} spike پس از درک محرک در سلول می‌شود (Sanders *et al.*, 2002). همچنین در برخی مطالعات نقش کانال‌های وابسته به کشش (Stretch-activated channels) در درک تنش‌های مکانیکی نشان داده شده است (Pickard & Fujiki, 2005). به دنبال درک محرک های مکانیکی واکنشهایی نظیر تغییر پتانسیل غشا، تولید گونه های فعال اکسیژن و به صورت همزمان با آن افزایش کلسیم درون سلولی اتفاق می‌افتد. افزایش کلسیم همچنین ممکن است توسط کانال های کلسیمی وابسته به کشش انجام شود که تسهیل کننده انتقال کلسیم به داخل سلول هستند. کاهش میزان کلسیم موجود در مایع برون سلولی در سلول‌های تیمارشده با امواج فراصوت در تحقیق حاضرممکن است به همین دلیل باشد. رمز گشایی پیام کلسیمی سبب اعمال تغییرات مختلف ساختاری و آنزیمی در سلول می گردد. بیش بیانی ژن‌های مرتبط با پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم نظیر کالمودولین نیز، از دیگر تأثیرات درک محرک‌های مکانیکی است (Mauch *et al.*, 1997; Telewski, 2006).

نتیجه‌گیری:

نتایج ارائه شده در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که امواج فراصوت می‌توانند به عنوان یک الیسیتور فیزیکی تأثیرات مختلفی را بر سیستم‌های زیستی اعمال کنند و این تأثیرات احتمالاً با واسطه تغییر در ساختار غشا و کانال‌های موجود در آن صورت می‌گیرد.

منابع:

Brodelius, P., Collinge, M. A., Funk, C., Gugler, K. and Marques, I. (1989) Studies on alkaloid formation in plant cell cultures after treatment with a yeast elicitor. In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Culture (ed. Kurz, W.G.W.) Pp. 190-199. Springer-Verlag, Berlin.

Chen B., Huang, J., Wang, J., Huang, L. (2008) Ultrasound effects on the antioxidative defense systems of Porphyridium cruentum. Colloids and surfaces B: Biointerfaces 61:88-92.

Ebel, J. and Mithorer, A. (1998) Early events in the

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.4.9]

plasmalemmal reticulum. Functional Plant Biology 32: 863-879.

Pong, M., Umchid, S., Guarino, A. J., Lewin, P. A., Litniewski, J., Nowicki, A. and Wrenn, S. P. (2006) *In vitro* ultrasound-mediated leakage from phospholipid vesicles. Ultrasonics 45: 133-145.

Rajabbeigi, E., Ghanati, F., Abdolmaleki, P. and Payez, A. (2013) Antioxidant capacity of parsley cells (*Petroselinum crispum* L.) and static magnetic field in relation to iron-induced ferritin levels. Electromagnetic Biology and Medicine 32: 430-441.

Rezaei, A., Ghanati, F., Behmanesh, M. and Mokhtari, dizaji, M. (2011) Ultrasound-potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of taxol in hazel (*Corylus avellana* L.) cell culture. Ultrasound in Medicine and Biology 37:1938–1947.

Safari, M., Ghanati, F., Behmanesh, M., Hajnorouzi, A., Nahidian, B. and Ghahremani, M. (2013) Enhancement of antioxidant enzymes activity and expression of CAT and PAL genes in hazel (*Corylus avellana* L.) cells in response to low-intensity ultrasound. Acta Physiologia Plantarum 35:2847–2855.

Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. and Harper, J. F. (2002) Calcium at the crossroads of signaling. The Plant Cell 14: 401-417.

Smith, M., Palta, J. P., McCown, B. H. (1984) The measurement of isotonicity and maintenance of osmotic balance in plant protoplast manipulations. Plant Science Letters 33: 249-258.

Sundaram, J., Berlyn, R. M., and Mitragotri, S. (2003) An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. Biophysical Journal 84: 3087-3101.

Telewski, F. W. (2006) A unified hypothesis of mechanoperception in plants. American Journal of Botany 93: 1466-1476.

Wang, B. C., Yoshikoshi, A. and Sakanishi, A. (1998) Carrot cell growth response in a stimulated ultrasonic environment. Colloids and Surface B: Biointerfaces 12: 89-95.

Wu, J., Lin, L. (2002) Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production. Applied Microbiology and Biotechnology 59: 51-57.

elicitation of plant defense. Planta 206: 335-348.

Haar, G. (2007) Therapeutic applications of ultrasound. Progress in Biophysics and Molecular Biology 93: 111-129.

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F. and Prange, R. K., (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering. Planta 207: 604-611.

Hoigne, D. J., Stubinger, S., Von Kaenel, O., Shamdasani, S., Hasenboehler, P. (2006). Piezoelectic osteotomy in hand surgery: first experiences with a new technique. BMC Musculoskeletal Disorders 7:36. doi:10.1186/1471-2474-7-36.

Labanca, M., Azzola, F., Vinci, R. and Rodella, L. F. (2008) "Piezoelectric surgery: twenty years of use". British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 46: 265-269.

Liu, Y., Takatsuki, H., Yoshikoshi, A., Wang, B., Sakanishi, A. (2003a) Effects of ultrasound on the growth and vacuolar H^+-ATPase activity of aloe *arborescens* callus cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 32: 105-116.

Liu, Y., Yoshikoshi, A., Wang, B., Sakanishi, A. (2003b) Influence of ultrasonic stimulation on the growth and proliferation of *Oryza sativa* Nipponbare callus cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 27: 287-293.

Kumon, R. E., Aehle, M., Sabens, D., Parikh, P., Kourennyi, D. and Deng, C. X. (2007) Ultrasound-Induced Calcium oscillations and waves in chinese hamster ovary cells in the presence of microbubbles. Biophysical Journal: Biophysical Letters 93: L29-L31.

Loseva, N., Gordon, L., Alyabyev, A., Andreyeva, I., Kolesnikov, O., Chernov, V., Ponomareva, A. and Kemp, R. B. (2004) Effect of induced changes in membrane permeability on the defense response of *Chlorella vulgaris* to infection by Achole plasma laidlawii. Thermochimica Acta 422:95-100.

Mauch, F., Kmecl, A., Schaffrath, U., Volrath, S., Gorlach J., Ward, E., Ryals, J. and Dudler, R. (1997) Mechanosensitive expression of a lipoxygenase gene in wheat. Plant Physiology 114: 1561-1566.

Pickard, B. G., and Fujiki, M. (2005) Ca^{2+} pulsation in BY-2 cells and evidence for control of mechanosensory Ca^{2+}-selective channels by the

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.4.9]

Effect of low-intensity ultrasound on membrane integrity of suspension-cultured parsley cells (*Petroselinum crispum* L.)

Faezeh Ghanati* and Sara Sobhannejad

Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University
(Received: 4 July 2014, Accepted: 25 August 2015)

Abstract:

The ability to sense and respond to physical stimuli is an important key of the life. It was recognized that ultrasound as a physical stimulus could produce drastic changes in biological systems. High-intensity ultrasound is well known to be destructive to biological materials, but low-intensity ultrasound, on the other hand, has shown a range of biological effects with potential significance in biotechnology. One of the most studied effects of ultrasound on living cells is the increase in their membrane permeability, enhancing the uptake of foreign substances and the release of intracellular products into the media. In the present research suspension-cultured parsley cells were treated with ultrasound at 29 kHz with the power of 455 mW/cm^3, for 10, 20, and 40 min. The viability of cells was examined using Evan's blue dye. Alteration of membrane permeability was evaluated by measuring the lipid peroxidation rate and leakage of electrolytes such as Ca^{2+} and K^+ from membranes to the extracellular medium. According to the results exposure to ultrasound for 10 and 20 min neither changed the viability of the cells nor lipid peroxidation of the membranes. Exposure of parsley cells to ultrasound for 40 min however, decreased the viability and increased the release of K^+ to the extracellular medium. The results suggest that low dosage of ultrasound energy dose not adversely affect the membrane integrity of parsley cells and also stimulates their growth.

Keywords: Membrane integrity, Parsley cells, Ultrasound.

*corresponding author, Email: ghangia@modares.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.4.9]