

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 و تغییرات 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 آلدئید، 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 آلدئید نداشت اما افزایش زمان تیمار تا ۴۰ دقیقه سبب کاهش معنی دار درصد زنده مانی و افزایش مقدار مالون دی آلدئید 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 سلول های گیاهی باشد.

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

مقدمه:

فراصوت با شدت پایین در سیستم های زیستی و فرآیندهای زیست فناوریانه 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 آنزیم ها 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

امروزه مطالعه در مورد تأثیر عوامل فیزیکی بر سیستم های 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 بالقوه امواج

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

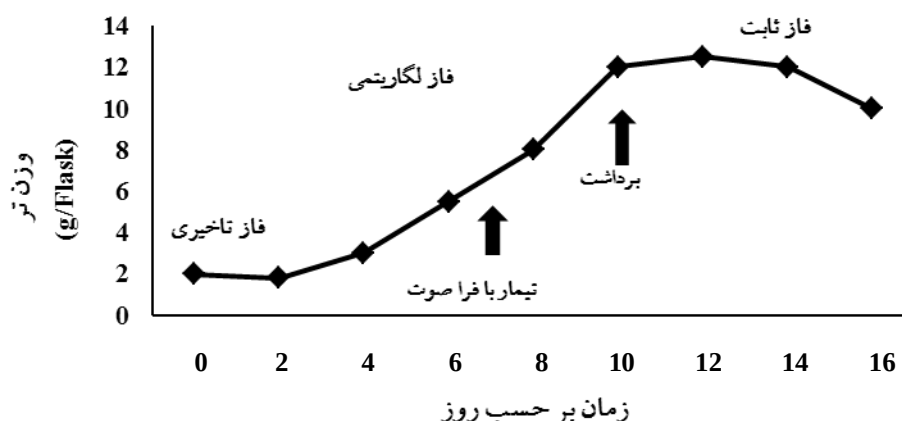
همچنین افزایش رشد سلول ها شود (Liu et al., 2003a). یکی از گسترده ترین تأثیرات غیر مخرب فراصوت بر سلول های زنده افزایش نفوذپذیری غشاها است که جذب ترکیبات خارجی و دفع فرآورده های درون سلولی توسط سلول را افزایش می دهد. افزایش نفوذپذیری غشا جهت انتقال ترکیبات خارجی به درون سلول های زنده تحت تأثیر امواج فراصوت را Sonoporation می نامند. انرژی امواج فراصوت می تواند 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 بررسی های انجام شده بر روی سلول های جانوری صورت گرفته و مطالعه تأثیرات فیزیولوژیک امواج فراصوت بر سلول های 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). گزارش های زیادی مبنی بر تأثیر امواج فراصوت با انرژی کم بر افزایش تولید متابولیت های 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 تأثیر امواج بر فیزیولوژی سلول های گیاهی بررسی نگردیده است و تنها به مطالعه کمی تأثیر این امواج بر میزان تولید متابولیت های ثانویه پرداخته شده است. همچنین این گزارشها عنوان کرده اند که عمده تأثیر این امواج بر آزاد سازی متابولیت های ثانویه از طریق افزایش نفوذپذیری غشا صورت می گیرد (Pong et al., 2006). هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر زمان های مختلف قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت بر تمامیت غشای سلول های جداکشت جعفری می باشد.

مواد و روش ها:

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 بذره های جعفری در محیط پایه LS

جامد با ترکیب $1/5 \text{ mg L}^{-1}$ کیتین، $1/5 \text{ mg L}^{-1}$ تیامین، $0/75 \text{ mg L}^{-1}$ پیریدوکسین، $0/75 \text{ mg L}^{-1}$ نیکوتینیک اسید ($\text{pH}=5.8$)، 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 واكشت سلول ها در محیط فوق، با وارد کردن قطعاتی از کالوس ها (حدود ۲ گرم) در محیط مایع (با همان اجزا ولی فاقد آگار) کشت های تعلیقی بنیان گذاری شد. سلول ها 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 واكشت و رسیدن به پایداری ژنتیکی، منحنی رشد آنها رسم گردید (شکل ۱). براساس این منحنی، سلول ها در روز هفتم واكشت، (در فاز لگاریتمی رشد) تحت تیمار با امواج فراصوت قرار گرفتند. به منظور تیمار سلول ها از پروب اولتراسونیک مرکب از ۴ کریستال پیزوالکتریک در انتهای یک لوله شیشه ای ته بسته به قطر ۲ cm به شکل استوانه استفاده شد. تیمار سلول ها با امواج فراصوت با شدت 455 mW/cm^3 و فرکانس ثابت 29 kHz برای مدت زمان ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه انجام گرفت. فرکانس ۲۵-۲۹ کیلوهرتز فرکانسی است که در آن امواج فراصوت سبب تخریب بافت های نرم نمی شوند و به همین سبب در سیستم های پیزوالکتریک با کاربرد پزشکی (جراحی، دندانپزشکی و...) مورد استفاده قرار می گیرد (Hoigne et al., 2006; Labanca et al., 2008). توان دستگاه و زمان های قرارگرفتن سلول ها در معرض امواج بر اساس مطالعات قبلی انجام گرفته بر روی سایر سلول های گیاهی انتخاب شد (Safari et al., 2013). سلول ها پس از سه روز از محیط جدا شده و بررسی های مورد نظر بر روی آنها انجام شد.

اندازه گیری رشد و تعیین درصد زنده مانی سلول ها: از وزن تر به عنوان معیاری برای تعیین رشد سلول ها استفاده شد. بدین منظور سلول ها بر روی قیف بوخنر واجد کاغذ صافی و نایلون مش ($42 \mu\text{M}$) و با استفاده از فشار منفی (پمپ خلاء) صاف شده و سپس وزن شدند. همچنین برای تعیین درصد زنده مانی، سلول ها بلافاصله پس از برداشت با



شکل ۱- منحنی رشد سلول‌های جعفری در محیط کشت تعلیقی

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 غشای 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 حاوی ۰/۱۷۵ M مانیتول ، ۰/۵ mM K_2SO_4 ، ۰/۵ mM $CaCl_2$ بود و pH آن توسط بافر تریس بر روی ۶ تنظیم گردید. سلول‌ها از محیط کشت جدا شده و توسط بافر مذکور شسته شدند. مقادیر ۱/۴ 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 ۴۰ 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).

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, BH₂, 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 آلدید (MDA) به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، و نیز با تعیین میزان نشت الکترولیت‌ها از غشای سلول‌ها اندازه گیری شد. به منظور اندازه گیری میزان MDA، ۲۰۰ mg از سلول‌های منجمد شده با ۳ mL تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ ساییده شد. نمونه‌ها پس از همگن سازی، سانتریفیوژ شدند. به ۱ mL از نمونه‌های صاف شده، ۱ mL تیوباربیتریک 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 ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر به منظور حذف تداخل جذب پروتئین‌ها و سوکروز و ضریب ثابت ($\epsilon = 1.57 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 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.

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 $P \leq 0.05$ انجام شد.

نتایج:

تأثیر امواج فراصوت بر میزان رشد و درصد زنده مانی سلول‌ها: 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 معنی‌داری 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 می‌مانند 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 سلول‌هایی 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 (شکل ۳). اما تیمار سلول‌های جعفری به مدت ۴۰ دقیقه با امواج فراصوت باعث کاهش معنی‌دار رشد و زنده مانی آنها در مقایسه با گروه شاهد گردید (شکل ۳).

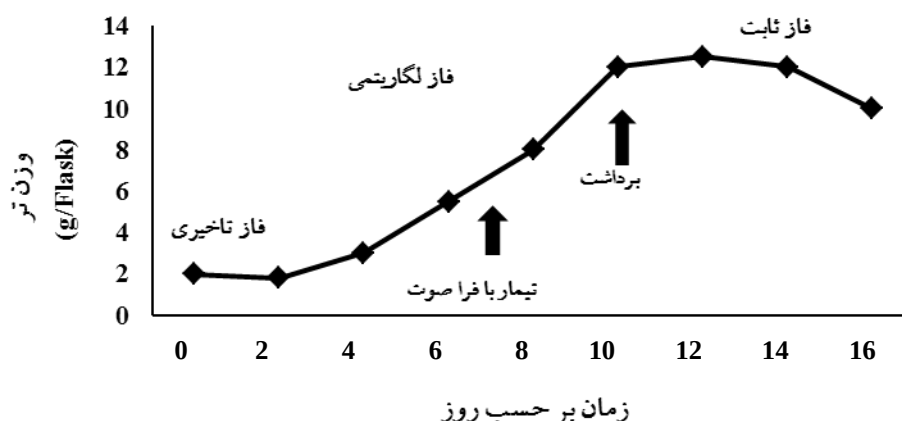
تأثیر امواج فراصوت بر تمامیت غشای سلول‌ها:

همانطور که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود استفاده از امواج فراصوت تا زمان ۲۰ دقیقه تأثیرات تخریبی بر غشا سلول‌های جداکشت جعفری نداشت و تفاوت معنی‌داری در میزان MDA و نشت الکترولیت‌ها از سلول‌ها در مقایسه با نمونه‌های شاهد مشاهده نشد. در حالیکه در سلول‌هایی که ۴۰ دقیقه در معرض این امواج قرار داشتند میزان MDA و نشت

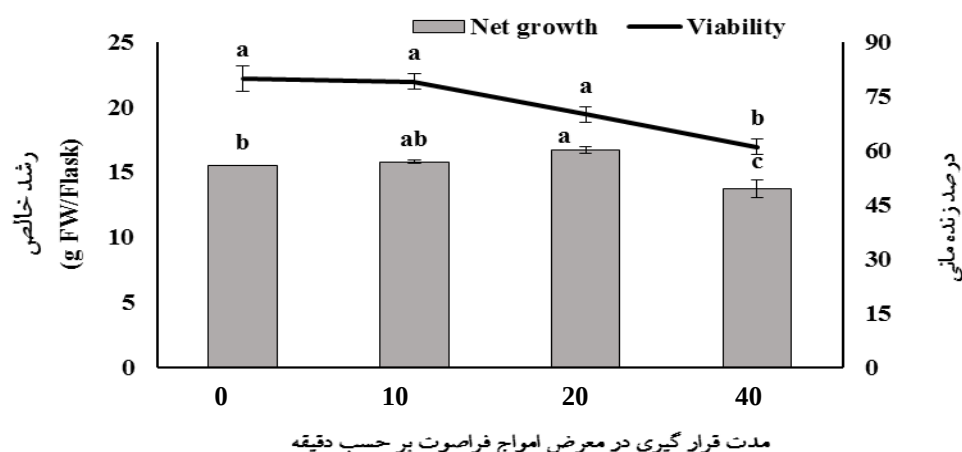
الکترولیت‌ها افزایش یافت (شکل ۴). همچنین میزان نشت K^+ و Ca^{2+} از غشای سلول‌های تحت تیمار با امواج فراصوت در زمان‌های ۱۰ و ۲۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری با کنترل نداشت در حالیکه میزان نشت K^+ به مایع برون سلولی در سلول‌هایی که به مدت ۴۰ دقیقه در معرض تیمار با امواج فراصوت قرار گرفته بودند به طرز معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت (شکل ۵). میزان Ca^{2+} نشت یافته به محیط در این گروه از سلول‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۶).

بحث:

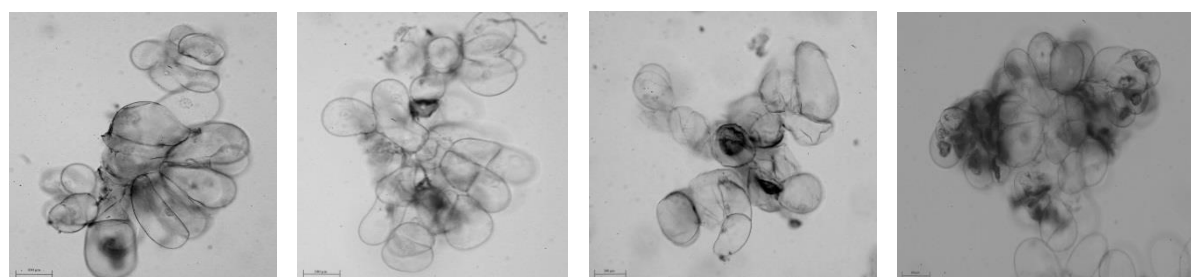
مطالعات نشان داده است که امواج فراصوت بسته به سطح تابش (زمان و شدت تابش) می‌توانند طیف گسترده‌ای از تأثیرات مختلف زیستی را ایجاد کنند. سطوح کم انرژی، تأثیرات مفید و قابل بازگشتی را در سطح سلول ایجاد می‌کنند در حالی که شدت‌های بالای تابش سبب مرگ آنی سلول‌ها می‌شود (Haar, 2007). در تحقیق حاضر نشان داده 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 زمان‌های 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 داده‌اند که امواج فراصوت با انرژی کمتر سبب افزایش هیدرولیز ATP به وسیله ATPase واکوئولی می‌شود در حالی که افزایش زمان تأثیر (افزایش میزان انرژی فراصوت) سبب کاهش فعالیت این پمپ می‌گردد و از آن طریق سبب برهم خوردن جریان ورود و خروج یون‌ها به سلول و نشت الکترولیت‌ها از خلال آن می‌گردد (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 مهم‌ترین بخش‌هایی است که تحت تأثیر تنش‌های مختلف قرار می‌گیرد (Loseva et al., 2004). افزایش نفوذپذیری سلول



شکل ۱- منحنی رشد سلول‌های جعفری در محیط کشت تعلیقی



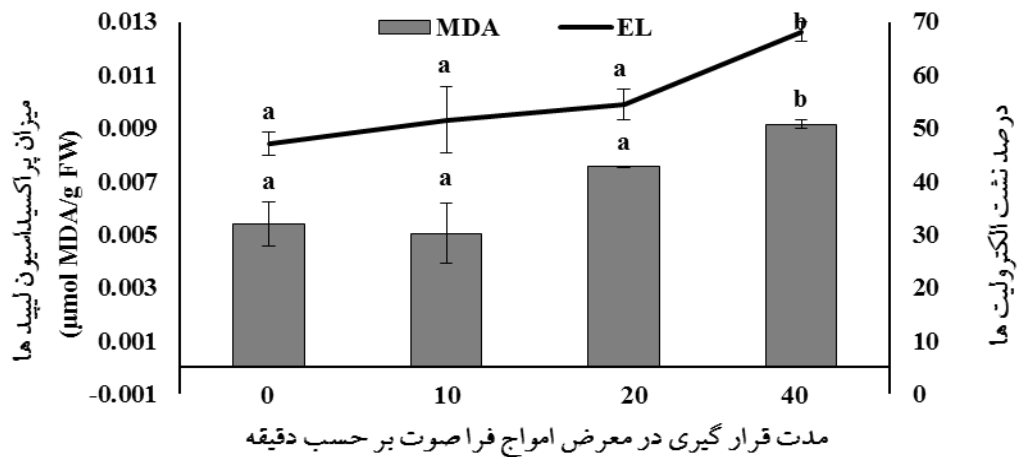
شکل ۲- میزان رشد و زنده بودن سلول‌های جداکشت جعفری (*Petroselinum crispum* L.) پس از قرار گرفتن در معرض امواج فراصوت در زمان‌های مختلف. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



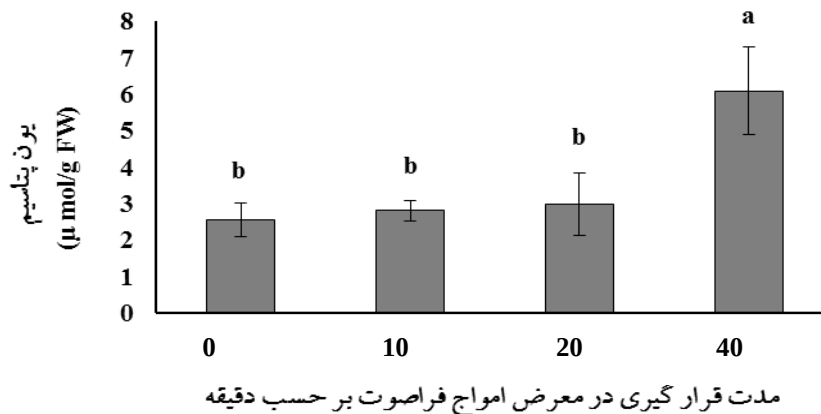
مدت زمان قرارگیری در معرض امواج فراصوت ۰ دقیقه مدت زمان قرارگیری در معرض امواج فراصوت ۱۰ دقیقه مدت زمان قرارگیری در معرض امواج فراصوت ۲۰ دقیقه مدت زمان قرارگیری در معرض امواج فراصوت ۴۰ دقیقه

شکل ۳- تأثیر تیمار با امواج فراصوت در زمان‌های مختلف بر زنده مانی و ریخت‌شناسی سلول‌های جداکشت جعفری. رنگ آمیزی سلول‌ها با اوانس بلو انجام شد. مقیاس معادل ۱۰۰ μ m است.

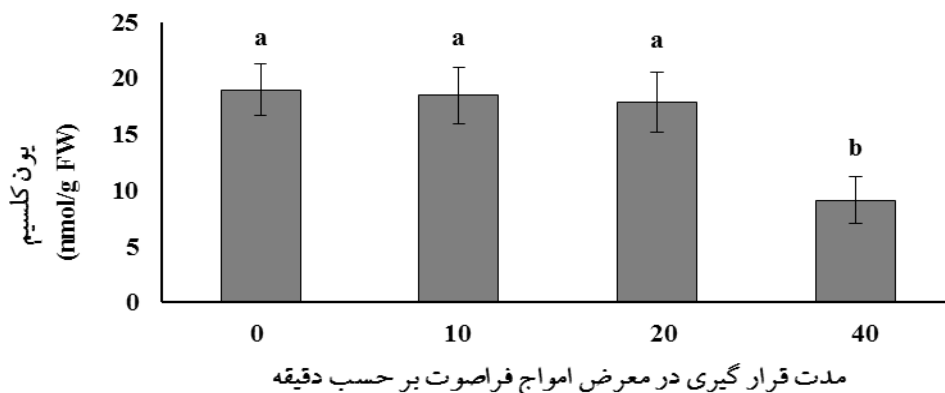
به دنبال پدیده Cavitation یکی از تأثیرات ایجاد شده تحت تأثیر امواج فراصوت می‌باشد (Sundaram et al., 2003). افزایش



شکل ۴- تاثیر امواج فراصوت در زمان‌های مختلف بر میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و میزان نشت الکترولیت‌ها در سلول‌های جداگشت جعفری (*Petroselinum crispum* L.). مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۵- تاثیر امواج فراصوت در زمان‌های مختلف بر میزان نشت K^+ از غشای سلول‌های جداگشت جعفری (*Petroselinum crispum* L.). مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۶- تاثیر زمان‌های مختلف تیمار با امواج فراصوت بر نشت Ca^{2+} از غشای سلول‌های جداگشت جعفری (*Petroselinum crispum* L.). مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار $\pm$ SD (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

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 محرک‌های مکانیکی واکنشهایی نظیر تغییر پتانسیل غشا، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و به صورت همزمان با آن افزایش کلسیم درون سلولی اتفاق می‌افتد. افزایش کلسیم همچنین ممکن است توسط کانال‌های کلسیمی وابسته به کشش انجام شود که تسهیل‌کننده انتقال کلسیم به داخل سلول هستند. کاهش میزان کلسیم موجود در مایع برون سلولی در سلول‌های تیمار شده با امواج فراصوت در تحقیق حاضر ممکن است به همین دلیل باشد. رمز گشایی پیام کلسیمی سبب اعمال تغییرات مختلف ساختاری و آنزیمی در سلول می‌گردد. 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 الیسیاتور 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.

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 می‌سازد. تیمار سلول‌ها به طور متناوب می‌تواند باعث افزایش نفوذپذیری آنها شده و بنابراین امکان استفاده حداکثری از ظرفیت بیوسنتزی سلول‌ها را فراهم می‌کند (Brodelius et al., 1989). اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها (EL) میزان نشت K^+ و Ca^{2+} و مقدار مالون دی آلدید (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 می‌کرد. تأثیر ولی در زمان‌های طولانی تر تابش افزایش میزان نشت الکترولیت‌ها 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

منابع:

- 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

- 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.

- 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). Piezoelectric 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) Ca²⁺ pulsation in BY-2 cells and evidence for control of mechanosensory Ca²⁺-selective channels by the

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/cm³, 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 Ca²⁺ 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