

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

فائزه قناتی* و سارا سبحان نژاد

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران، ص پ ۱۵۴-۱۱۱۵

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

چکیده:

توانایی درک و پاسخ به محرك های فیزیکی در بین تمامی موجودات از اهمیت زیادی برخوردار است. امواج فراصوت به عنوان یک محرك 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^2 و فرکانس ثابت ۲۹ 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 آلدید، درصد نشت الکتروولیت 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 بر روی زنده مانی سلول ها و میزان مالون دی آلدید نداشت اما افزایش زمان تیمار تا ۴۰ دقیقه سبب کاهش معنی دار درصد زنده مانی و افزایش مقدار مالون دی آلدید 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 سطح پایین انرژی این امواج می تواند محرك 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 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 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

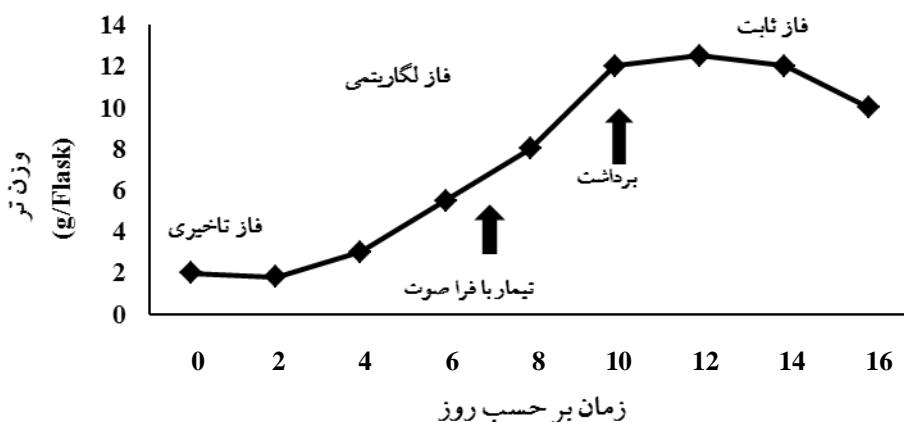
امروزه مطالعه در مورد تأثیر عوامل فیزیکی بر سیستم های زنده گسترش یافته است. یکی از این عوامل امواج فراصوت (Ultrasound) می باشد. توانایی درک و پاسخ به محرك های فیزیکی در بین تمامی موجودات از اهمیت زیادی برخوردار است. مطالعات اولیه در مورد اثرات و خطرات احتمالی استفاده از امواج فراصوت بر روی درمان انسان و جانوران متمرکز بود. در حالی که امروزه اثرات مفید و کاربردهای بالقوه امواج

جامد با ترکیب $L^{-1} mg 1/5$ کیتین، $L^{-1} mg 1/5$ تیامین، $L^{-1} mg 0/75$ پیریدوکسین، $L^{-1} mg 0/75$ نیکوتینیک اسید (pH=۵.۸)، گیاهچه به دست آمد. سپس با استفاده 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 کالوس ها (حدود ۲ گرم) در محیط مایع (با همان اجزا ولی فاقد آگار) کشت های تعیقی بنیان گذاری شد. سلول ها در محیط کشت تعیقی 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، سلول ها در روز هفتم واکشت، (در فاز لگاریتمی رشد) تحت تیمار با امواج فرماصوت 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 فرماصوت با شدت $mW/cm^3 455$ و فرکانس ثابت kHz ۲۹ برای مدت زمان ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه انجام گرفت. فرکانس ۲۵-۲۹ کیلوهرتز فرکانسی است که در آن امواج فرماصوت سبب تخریب بافت های نرم نمی شوند و به همین سبب در سیستم های پیزوالکتریک با کاربرد پژوهش کی (جراحی، دندانپزشکی و...) مورد استفاده قرار می گیرد (Hoigne *et al.*, 2006 ; Labanca *et al.*, 2008). توان دستگاه و زمان های قرار گرفتن 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 بوخرن واجد کاغذ صافی و نایلون مش ($42 \mu M$) و با استفاده از فشار منفی (پمپ خلاء) صاف شده و سپس وزن شدند. همچنین برای تعیین درصد زنده مانی، سلول ها بالا فاصله پس از برداشت با

همچنین افزایش رشد سلول ها شود (Liu *et al.*, 2003a). یکی از گسترده ترین تأثیرات غیر مخرب فرماصوت بر سلول های زنده افزایش نفوذپذیری غشاها است که جذب ترکیبات خارجی و دفع فرا آورده های درون سلولی توسط سلول را افزایش می دهد. افزایش نفوذپذیری غشا جهت انتقال ترکیبات خارجی به درون سلول های زنده تحت تأثیر امواج فرماصوت را Sonoporation می نامند. انرژی امواج فرماصوت می تواند با تأثیر مستقیم بر غشاها 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 فرماصوت بر سلول های گیاهی کمتر مورد توجه بوده است (Liu *et al.*, 2003a). میزان تأثیر امواج فرماصوت بر سلول، به شدت امواج و مدت زمان قرار گرفتن سلول ها در معرض این امواج بستگی دارد (Rezaei *et al.*, 2011). گزارش های زیادی مبنی بر تأثیر امواج فرماصوت 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) 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 عمدۀ 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 فرماصوت بر تمامیت غشای سلول های جدا کشید جعفری می باشد.

مواد و روش ها:

کشت سلولی و تیمار سلول ها با امواج فرماصوت: در این تحقیق ابتدا یک رده سلولی با رشد سریع از گیاه جعفری بنیان گذاری شد. به این منظور از بذر های جعفری در محیط پایه LS



شکل ۱- منحنی رشد سلول‌های جعفری در محیط کشت تعیقی

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 آب 20°C میزان هدایت الکتریکی محلول برای بار دوم اندازه گیری اتفاق میزد. هدایت الکتریکی محلول زیر شد (EC_2) و میزان نشت الکتروولیت‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Chen *et al.*, 2008).

$$\text{EL}(\%) = \frac{\text{EC}_1 - \text{EC}_2}{\text{EC}_1} \times 100$$

تأثیر تیمار با امواج فرا صوت بر تمامیت غشای سلول‌های جعفری همچنین با اندازه گیری میزان پتانسیم و کلسیم نشت یافته به مایع بروون سلولی مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور بافر 5 mM MES تهیه گردید که حاوی 0.175 M Manitol ، 0.5 mM CaCl_2 ، $0.5\text{ mM K}_2\text{SO}_4$ ، 0.5 mM KCl و $0.5\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ 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 $1/4$ و $2/1$ گرم از سلول‌ها (به ترتیب برای پتانسیم 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 فرا صوت قرار گرفتند. بلا فاصله پس از تیمار سلول‌ها توسط قیف و کاغذ صافی (بدون پمپ خلا) از بافر جدا شده و 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 (0.25 Drisch) 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 غشایها با اندازه گیری میزان مالون دی آلدھید (MDA) به عنوان فراورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، و نیز با تعیین میزان نشت الکتروولیت‌ها از غشای سلول‌ها اندازه گیری شد. به منظور اندازه گیری میزان 200 mg MDA از سلول‌های منجمد شده با 3 mL کلرو استیک اسید 10% ساییده شد. نمونه‌ها پس از همگن سازی، سانتریفیوژ شدند. به 1 mL از نمونه‌های صاف شده، 1 mL تیوباریتوفریک اسید 0.5% اضافه گردید و به مدت نیم ساعت در دمای 70°C قرار داده شد. پس از این مدت نمونه‌ها بلا فاصله بر روی یخ سرد شدند و میزان MDA با اندازه گیری جذب در طول موج های 440 ، 522 و 600 نانومتر به منظور حذف تداخل جذب پروتئین‌ها و سوکروز و ضربه ثابت (Hodges *et al.*, 1999) محاسبه گردید ($\epsilon = 157\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

برای اندازه گیری میزان نشت الکتروولیت‌ها، سلول‌ها بلا فاصله بعد از تیمار با امواج فرا صوت 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.

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 معنی داری 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 معنی داری 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 معنی داری 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 بازگشتنی 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 کوتاه‌نه تنها میزان رشد و زنده مانی سلول‌ها را کاهش نداد بلکه تا حدی سبب افزایش زیستده نیز شد. افزایش رشد و تکثیر سلولی در زمان‌های کوتاه تیمار با امواج فراصوت در کشت‌های تعلیقی هویج، برنج و آلوئه Wang *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998؛ این محققین همچنین نشان داده اند که امواج فراصوت با انرژی کمتر سبب افزایش هیدرولیز ATP به وسیله ATPase واکوئلی 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 تشکیلات مختلف قرار می‌گیرد (Loseva *et al.*, 2004). افزایش نفوذپذیری سلول

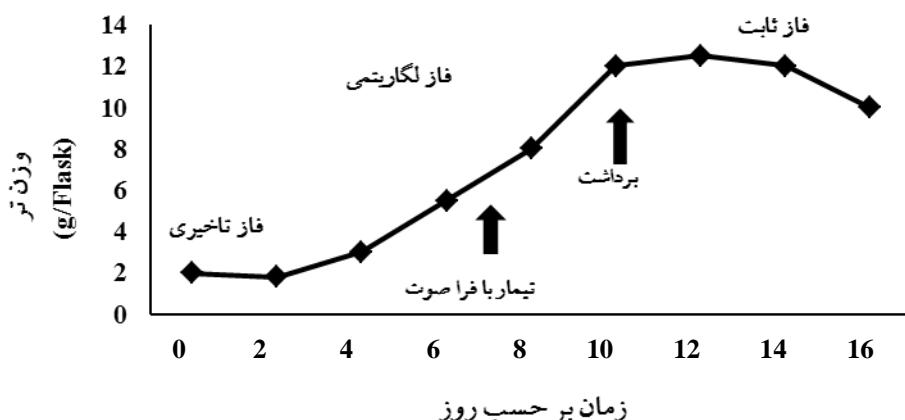
آنالیز آماری: کلیه آزمایشات با سه تکرار از حداقل سه نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و آزمون دانکن جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P \leq 0.05$ انجام شد.

نتایج:

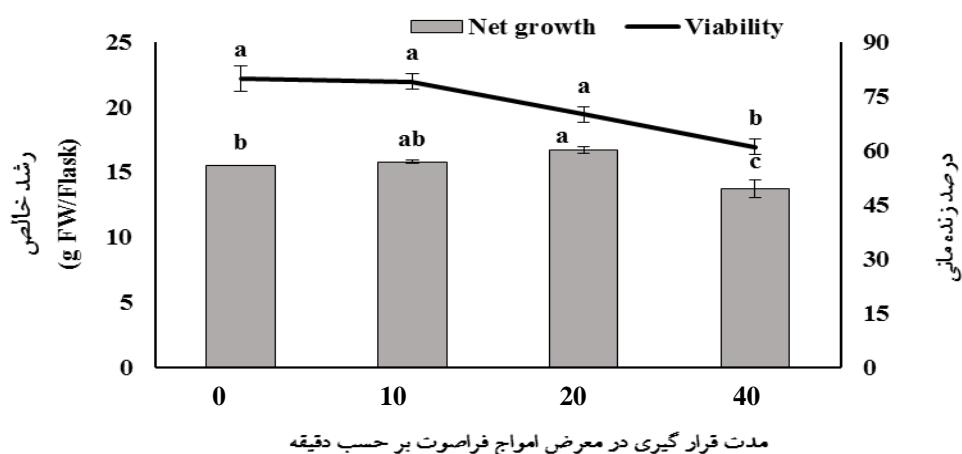
تأثیر امواج فراصوت بر میزان رشد و درصد زنده مانی سلول‌ها: بررسی تغییرات رشد (وزن تر) سلول‌های جعفری پس از تیمار با امواج فراصوت در زمان‌های مختلف تغییر معنی داری را در میزان رشد سلول‌هایی که به مدت ۱۰ دقیقه در معرض امواج فراصوت قرار داشتند نسبت به گروه کنترل نشان نداد. اما میزان رشد سلول‌هایی که به مدت 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 واکوئلی 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 معنی دار رشد و زنده مانی آنها در مقایسه با گروه شاهد گردید (شکل ۳).

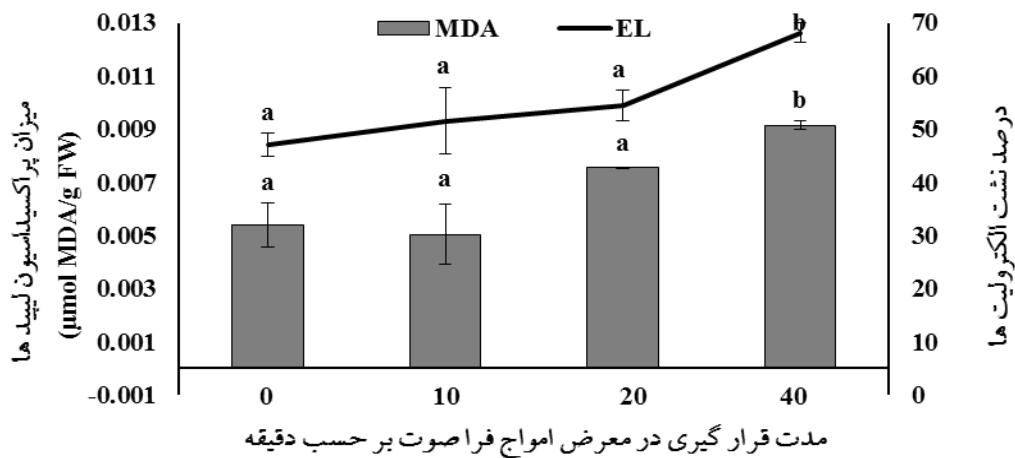
تأثیر امواج فراصوت بر تمامیت غشای سلول‌ها: همانطورکه در شکل ۴ ملاحظه می‌شود استفاده از امواج فراصوت تا زمان ۲۰ دقیقه تأثیرات تخریبی بر غشا سلول‌های جداکننده جعفری نداشت و تفاوت معنی داری در میزان MDA و نشت الکترولیت‌ها از سلول‌ها در مقایسه با نمونه‌های شاهد مشاهده نشد. در حالیکه در سلول‌هایی که ۴۰ دقیقه در معرض این امواج قرار داشتند میزان MDA و نشت



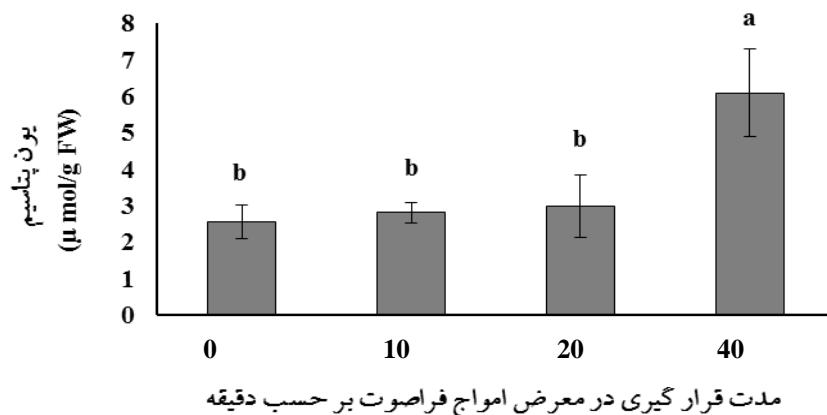
شکل ۱- منحنی رشد سلول‌های جعفری در محیط کشت تعليقی

شکل ۲- میزان رشد و زنده بودن سلول‌های جداکشت جعفری (*Petroselinum crispum* L.) پس از قرار گرفتن در معرض امواج فرماصوت در زمان‌های مختلف. مقادیر نشان داده شده میانگین \pm SD تکرار \pm ۳ تکرار (انحراف معیار) می‌باشد. حروف متغیر نشان دهنده معنی دار بودن تفاوت‌ها در سطح آزمون $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.شکل ۳- تاثیر تیمار با امواج فرماصوت در زمان‌های مختلف بر زنده مانی و ریخت شناسی سلول‌های جداکشت جعفری. رنگ آمیزی سلول‌ها با اوانس بلو انجام شد. مقیاس معادل $100 \mu\text{m}$ است.امواج فرماصوت می‌باشد (Sundaram *et al.*, 2003). افزایش

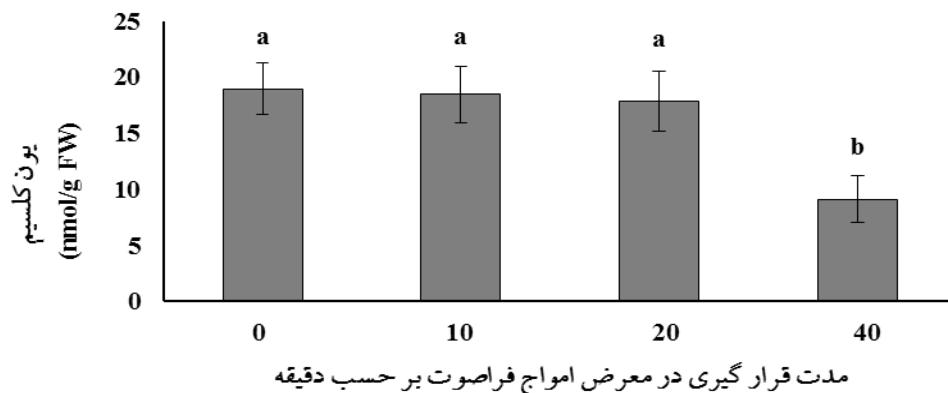
به دنبال پدیده Cavitation یکی از تأثیرات ایجاد شده تحت تأثیر



شکل ۴- تاثیر امواج فرماصوت در زمان‌های مختلف بر میزان پراکسیداسیون لیپید‌ها و میزان نشت الکتروولیت‌ها در سلول‌های جداکشت جعفری (*Petroselinum crispum L.*). مقادیر نشان داده شده میانگین $3 \pm \text{SD}$ (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 فرماصوت در زمان‌های مختلف بر میزان نشت K^+ از غشای سلول‌های جداکشت جعفری (*Petroselinum crispum L.*). مقادیر نشان داده شده میانگین $3 \pm \text{SD}$ (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 فرماصوت بر نشت Ca^{2+} از غشای سلول‌های جداکشت جعفری (*Petroselinum crispum L.*). مقادیر نشان داده شده میانگین $3 \pm \text{SD}$ (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 کانال های یونی بروز کند که نتیجه آن، شکل گیری جریان کلسیم از محلی با شبکه الکتروشیمیایی بالا مانند خارج سلول و یا ذخیره گاه های درون سلولی به محلی با شبکه کمتر می باشد. اثر متقابل بین میزان ورود کلسیم به سلول از طریق کانال ها و خروج آن توسط ناقللین و پمپ ها، باعث حفظ شبکه کلسیم و در نتیجه ایجاد Ca^{2+} spike پس از درک محرك در سلول می شود (Sanders *et al.*, 2002). همچنین در برخی مطالعات نقش کانال های وابسته به کشش (Stretch-) مکانیکی (activated channels) در درک تنفس های مکانیکی نشان داده شده است (Pickard & Fujiki, 2005). به دنبال درک محرك های مکانیکی واکنش هایی نظری تغییر پتانسیل غشاء، تولید گونه های فعال اکسیژن و به صورت همزمان با آن افزایش کلسیم درون سلولی اتفاق می افتد. 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 سلول های تیمار شده با امواج فرما صوت در تحقیق حاضر ممکن است به همین دلیل باشد. رمز گشایی پیام کلسیمی سبب اعمال تغییرات مختلف ساختاری و آنزیمی در سلول می گردد. بیش بیانی ژن های مرتبط با پروتئین های متصل شونده به کلسیم نظری کالמודولین نیز، از دیگر تأثیرات درک محرك های مکانیکی است (Mauch *et al.*, 1997; Telewski, 2006).

نتیجه گیری:

نتایج ارائه شده در تحقیق حاضر نشان می دهد که امواج فرما صوت می توانند به عنوان یک الیستیور فیزیکی تأثیرات مختلفی را بر سیستم های زیستی اعمال کنند و این تأثیرات احتمالاً با واسطه تغییر در ساختار غشا و کانال های موجود در آن صورت می گیرد.

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 Mithofer, A. (1998) Early events in the

نفوذ پذیری سلول به تشکیل منافذ در یک یا چند سیستم غشایی سلول گیاهی بستگی دارد که عبور مولکول های مختلف را به درون و بیرون سلول امکان پذیر می سازد. تیمار سلول ها به طور متناوب می تواند باعث افزایش نفوذ پذیری آنها شده و بنابراین امکان استفاده حداکثری از ظرفیت بیوستزی سلول ها را فراهم می کند (Brodelius *et al.*, 1989) (MDA) به عنوان شاخص های پایداری غشا نشان داد که در سلول هایی که در زمان های کوتاه تحت تأثیر امواج فرما صوت قرار داشته اند این پارامترها تغییر معنی داری در مقایسه با کنترل نداشت و این بدان معنی است که در این سلول ها تمامیت غشا سلول حفظ شده است. حفظ شکل ظاهری و مورفولوژی این سلول ها و مشاهده نشدن پلاسمولیز یا تورژسانس در آنها نیز این موضوع را تأیید می کرد. تأثیر ولی در زمان های طولانی تر تابش افزایش میزان نشست الکتروولیت ها و MDA افزایش یون پتابسیم شد. مطالعات اخیر انجام شده بر روی سلول های جانوری با کمک آشکارسازی کلسیم، القای یک جریان کلسیمی به سمت داخل سلول تحت تابش فرما صوت 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 می باشد (Ebel and Mithofer, 1998; Wu & Lin, 2002).

درک تنفس مکانیکی در گیاهان در سطح غشای پلاسمایی و از طریق ارتباطات موجود بین اسکلت سلولی، غشا پلاسمایی و دیواره سلولی انجام می گیرد. تغییر در میزان کلسیم آزاد سیتوزولی به عنوان نتیجه های از درک انواع تنفس های فیزیکی در نظر گرفته می شود. مسیر پیام رسانی کلسیم می

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.

- 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., Kmec, 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

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