The Journal of Qazvin Univ. of Med. Sc.
No. 21 , spring 2002
Archive of SID
مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین
شماره ۲۱ - بهار ۱۳۸۱

مقایسه اثر افزایش دما قبل و بعد از تابش دوز کم نوترون در ایجاد آسیب‌های کروموزومی لنفوسیت‌های خون انسان

داریوش فاتحی *

Modification of low dose of neutron induced chromosomal damage by pre and post irradiation of hyperthermia in human blood lymphocytes

D. Fatehi

Abstract

Background : *It is believed that a few number of hypoxic cells in the center of tumors may survive after radiotherapy by X and γ - rays . Recently , application of neutron and compound radiation is the center of attention of radiotherapy modalities.*

Objective : *To investigate the effect of hyperthermia on low dose of neutron induced chromosomal damage in human peripheral blood lymphocytes.*

Methods : *Each blood sample was seperately exposed to hyperthermia , neutron radiation and radiation accompanying hyperthermia. Different type of damage was investiagated after cell culture and chromosome analysis at metaphase stage.*

Findings: *After harvesting and staining , chromosomal aberrations were scored for each specimen. Results indicated that hyperthermia at 41.5°c doesnot induce chromosomal damage but at 43°c , high frequency of damages were observed ($P<0.05$). Irradiation of cells with 6 cGy neutron produced high frequency of damages . The frequency of damages increased ($P<0.05$) and was more prevalent applying hyperthermia after neutron irradiation.*

Conclusion : *Hyperthermia may be effected in inhibition of repair of neutron radiation damages . Frequency of chromosoal aberrations increased parallel to the increased duration of hyperthermia . The results indicated that the application of post irradiated hyperthermia may be a suitable modality for cancer treatment.*

Keywords: *Neutron, Hyperthermia , Chromosomal Damage, Human Blood Lymphocytes*

چکیده

زمینه : بقاء سلول‌های هیپوکسیک مرکزی تومورها پس از اتمام پرتودرمانی با اشعه ایکس و گاما باعث عود مجدد تومور می‌شود، لذا امروزه به استفاده از نوترون و درمان‌های مرکب توجه زیادی شده است.

هدف: این مطالعه به منظور بررسی اثر افزایش دما قبل و بعد از تابش نوترون در ایجاد آسیب های کروموزومی لنفوسیت های خون انسان انجام شد.

مواد و روش‌ها : این مطالعه تجربی در سال ۱۳۷۵ در تهران انجام شد. نمونه‌های خون به طور جداگانه تحت تأثیر افزایش دما، تابش نوترون و همچنین تابش توأم با افزایش دما قرارگرفتند .پس از کشت و آنالیز کروموزوم‌های متافازی انواع آسیب ها بررسی شد.

یافته‌ها : دمای ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد در لنفوسیت ها آسیب کروموزومی ایجاد نکرد، اما در ۴۳ درجه سانتی‌گراد آسیب ها دیده شد($P<0/05$). این آسیب ها با تابش ۶ سانتی‌گری نوترون هم مشاهده شد. افزایش دما بعد از تابش نوترون نسبت به افزایش دما قبل از تابش نوترون، آسیب های بیشتری ایجاد کرد و این آسیب در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد مشهودتر بود ($P< 0/05$).

نتیجه‌گیری : افزایش دما می‌تواند در مهار روند ترمیم آسیب های ناشی از نوترون مؤثر باشد و به عنوان روش مناسبی برای درمان تومورها در نظر گرفته شود.

کلید واژه‌ها: نوترون، افزایش دما، آسیب کروموزومی، لنفوسیت های خون انسان

* مربی و عضو هیأت علمی دانشکده پزشکی شهر کرد

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه:

یکی از مشکلاتی که در درمان تومورها با پرتوهای ایکس و گاما مشاهده می‌شود، وجود سلول های هیپوکسیک مرکزی تومورهاست که نسبت به این پرتوها مقاومند. از آن جا که این سلول‌ها در شرایط مناسب تکثیر می‌شوند اگر تعداد کمی از آنها در پایان پرتو درمانی زنده بمانند باعث رشد مجدد تومور می‌شوند. لذا کوشش های زیادی برای یافتن یک راه‌حل مناسب جهت غلبه بر این مشکل به عمل آمده است، از جمله استفاده از پرتوهای High LET مثل نوترون، افزایش فشار اکسیژن در حین پرتودرمانی، استفاده از داروهای حساس کننده سلول های هیپوکسیک و سرانجام افزایش دما (هیپرترمی).[۲] مطالعاتی که در این زمینه انجام شده بیشتر بررسی ترکیب‌های متفاوت اشعه و افزایش دما بوده است. در بعضی از مطالعات ابتدا افزایش دما و سپس تابش انجام شده و در بعضی دیگر ابتدا پرتودهی و سپس افزایش دما اعمال شده است که نتایج متفاوتی داشته‌اند. از جمله کای و نیلسن در دو مطالعه جداگانه نشان دادند که افزایش دما قبل از تابش باعث کاهش آسیب‌ها می‌شود[۱و۷] ولی نتیجه مطالعه میتلر نشان داد افزایش دما قبل از تابش نوترون باعث افزایش آسیب‌های کروموزومی می‌شود.[۵] از سوی دیگر نوالدین، ویسنبورن و همکاران در مطالعه‌های جداگانه نشان دادند افزایش دماقبل یا بعد از تابش در هر حال باعث افزایش آسیب‌های کروموزومی می‌شود.[۶و۱۲]

در این مطالعه سؤال‌های اساسی زیر مد نظر بود: افزایش دما قبل و بعد از تابش نوترون چه اثری بر فراوانی ناهنجاری های کروموزومی در لنفوسیت‌های خون انسان دارد؟ آیا افزایش دما باعث حساس‌تر شدن این سلول ها یا مقاوم‌تر شدن آنها می‌شود؟ آیا در هر دو صورت باعث افزایش حساسیت سلول ها خواهد شد؟ در راستای پاسخ به سؤال‌های فوق این تحقیق با هدف بررسی اثر نوترون بر لنفوسیت‌هایی که قبلاً تحت تأثیر افزایش دما قرار گرفته‌اند، همینطور اثر افزایش دما بر لنفوسیت‌هایی که قبلاً تحت تابش نوترون واقع شده‌اند انجام شد. از آن جا که لنفوسیت‌ها حساس‌ترین سلول‌های بدن نسبت به پرتوها هستند و سلول‌های سرطانی هم به علت فعالیت میتوزی شدید و شاخص میتوزی بالا نسبت به پرتوها حساسیت زیادی نشان می‌دهند،[۲] لذا انتظار می‌رود بتوان از نتایج این تحقیق برای مطالعات بعدی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۷۵ در تهران انجام شد. برای افزایش دما از انکوباتور ساخت شرکت شیمی فن استفاده شد و درجه حرارت ها هر پنج دقیقه به وسیله یک دماسنج کالیبره با دقت ۰/۱ ± درجه سانتی‌گراد کنترل شد.

منبع نوترون مورد استفاده، کالیفرنیوم - ۲۵۲ ($^{252}_{98}Cf$) ساخت شرکت Amersham انگلستان، موجود در سازمان انرژی اتمی ایران بود. نیمه عمر آن ۲/۶۵ سال، شعاع تابش ۳/۵ سانتی متر، تندی دوز ۱/۵۲ سانتی‌گری در ساعت و انرژی نوترون‌های آن بین ۱ تا ۶ میلیون الکترون - ولت (MeV) بود. این چشمه استوانه‌ای شکل به قطر ۸ و ارتفاع ۶ میلی متر است و نوترون‌های آن در فضا با شار یکنواخت منتشر می‌شوند. دوز مورد استفاده در این تحقیق ۶ سانتی‌گری انتخاب شد.

www.SID.ir

www.SID.ir

نمونه‌های خون از افراد مذکر سالم ۲۵ تا ۳۰ ساله غیر سیگاری که قبلاً پرتوگیری نداشتند، تهیه شد. پس از تهیه ۲۱ میلی لیتر خون هپارینه (۵۰۰۰ واحد در میلی لیتر)، ۳ میلی لیتر آن درون یک شیشه استریل دردار ریخته شد (۷ شیشه). یکی از نمونه‌ها به عنوان شاهد اول بدون هیچ گونه تابش و افزایش دما درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. دو نمونه ابتدا (یکی به مدت ۳۰ و دیگری ۶۰ دقیقه) تحت دمای ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس تحت تابش ۶ سانتی‌گری نوترون قرار گرفتند. دو نمونه دیگر ابتدا تحت تابش ۶ سانتی‌گری نوترون قرار گرفتند و سپس یکی به مدت ۳۰ و دیگری به مدت ۶۰ دقیقه تحت تأثیر حرارت ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد واقع شدند. یک شیشه فقط تحت تابش ۶ سانتی‌گری نوترون قرار گرفت. یک شیشه نیز به عنوان شاهد دوم و به منظور بررسی عوامل محیطی بدون هیچ‌گونه تابش نوترون و افزایش دما به همراه این ۵ نمونه حمل شد. برای دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد نیز به مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه همین کارها انجام شد.

یک سری از نمونه‌ها پس از تابش نوترون با فاصله زمانی یک ساعت در زمان های صفر تا ۶۰ دقیقه تحت دمای ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا تأثیر طول مدت زمان افزایش دما پس از تابش نوترون بررسی شود. در همه موارد برای جلوگیری از ایجاد شوک حرارتی، بلافاصله پس از اتمام افزایش دما نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شدند.

برای تهیه کشت کروموزومی ۰/۵ میلی لیتر از هر نمونه درون ۴ میلی لیتر محیط کشت RPMI - 1640 (بهار افشان) ریخته و به آن ۱ میلی لیتر سرم جنینی گوساله (Gibco)، مخلوطی از ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین و ۰/۲ میلی لیتر عامل میتوژن PHA (بهار افشان) اضافه شد. سپس نمونه‌هابه مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پس از این مدت به هرکدام از محیط‌های کشت ۰/۱ میلی لیتر کولشی‌سین اضافه شد و مجدداً محیط‌هابه مدت ۳ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس به وسیله کلرور پتاسیم با غلظت ۰/۰۷۵ مولار به سلول‌ها شوک هیپوتونیک وارد شد و با استفاده از محلول فیکساتیو تازه شامل ۳ حجم الکل متانول و یک حجم اسید استیک خالص، سلول ها سه بار شستشو داده شدند. پس از انجام این مراحل، چند قطره از محلول باقی مانده بر روی لام‌های سرد پرتاب شد و لام هابه مدت ۲۰ دقیقه‌درون رنگ گیمسای ۵ درصد قرار گرفتند و سپس با آب مقطر شسته شده و در هوای آزمایشگاه خشک شدند.

ناهنجاری های کروموزومی با استفاده از میکروسکوپ نوری ZIESS (آلمان) در ۱۰۰ متافاز برای هر نمونه بررسی و شمارش شدند.

تعداد متافاز بررسی شده برای نمونه‌های شاهد اول، شاهد دوم و گروه تابش نوترون هرکدام ۴۰۰ مورد، در گروه افزایش دما تنها ۳۰۰ مورد و در بقیه گروه ها هرکدام ۲۰۰ مورد بود. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و نتایج از آزمون های آنالیز واریانس یک‌طرفه، همبستگی و t استفاده شد.

▣ یافته‌ها :

بررسی کروموزوم های متافازی نشان داد میانگین

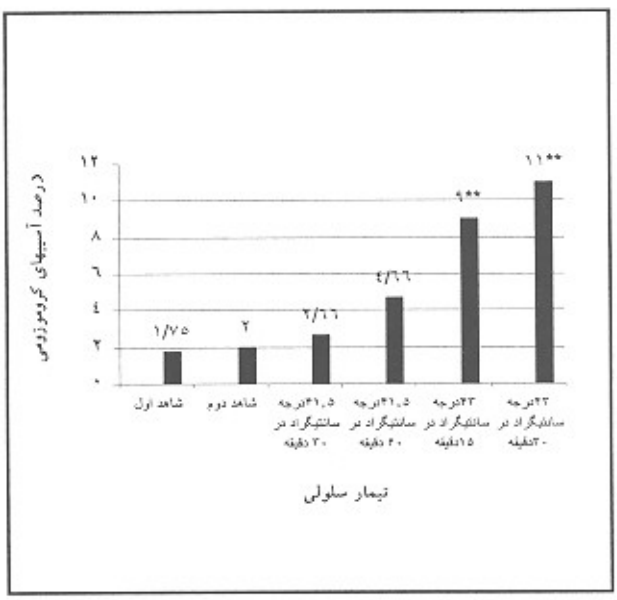
Archive of SID

کل آسیب‌های کروموزومی در هر دو گروه شاهد اول و دوم اختلاف معنی داری نداشتند.

میانگین شکاف‌های کروموزومی در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۵ دقیقه از سایر گروه‌ها بیشتر بود و در بقیه گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مجموع میانگین کل آسیب‌های کروموزومی در شاهد اول و در گروه تیمار شده با افزایش دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، بیشترین مقدار بود و با گروه‌های شاهد اختلاف معنی دار نشان داد. ($P<0/05$) (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱ :

فراوانی آسیب‌های کروموزومی در لنفوسیت‌های خون پس از اعمال افزایش دما

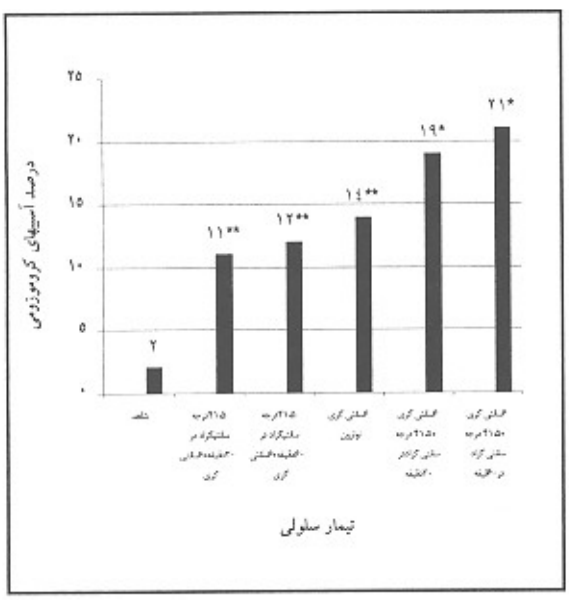


آسیب‌های کروموزومی در گروه شاهد اول کمترین و در گروه تابش، بیشترین فراوانی را داشت. اختلاف بین دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0/01$).

بررسی اثر توأم افزایش دمای ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد و تابش نوترون نشان داد میانگین آسیب‌های از نوع حذف و تبادل کروموزومی در گروه شاهد اول از سایر گروه‌ها کمتر و در گروهی که ابتدا نوترون دریافت کرده و سپس ۶۰ دقیقه افزایش دما داشتند، از سایر گروه‌ها بیشتر بود ($P<0/01$). مقایسه گروه‌ها نشان داد مجموع کل آسیب‌ها در گروه‌هایی که پس از تابش، افزایش دما داشتند، بیشتر بود. بررسی‌های آماری بین این گروه‌ها اختلاف معنی‌دار نشان داد و بیشترین آسیب‌ها در گروهی بود که بعد از تابش به مدت ۶۰ دقیقه افزایش دما داشتند ($P<0/05$). ضریب همبستگی بین فراوانی مجموع کل آسیب‌ها و زمان افزایش دما بعد از تابش ۰/۵۲ بود(نمودار شماره ۲).

نمودار ۲ :

فراوانی آسیب‌های کروموزومی در لنفوسیت‌های خون پس از اعمال توأم افزایش دمای ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد و تابش ۶ سانتی‌گری نوترون



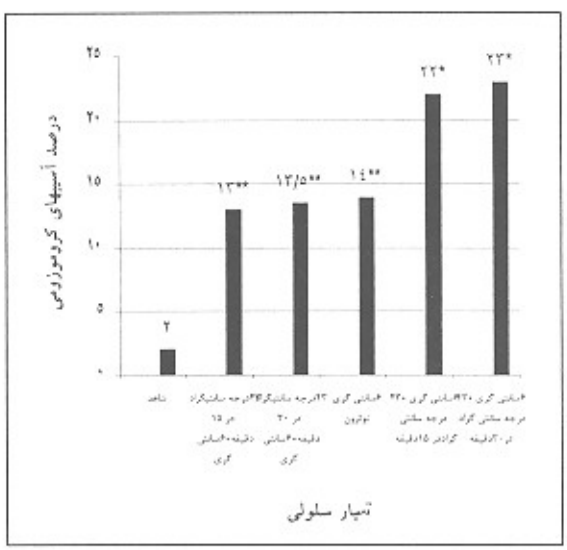
www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌های بررسی اثر توأم افزایش دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و تابش نوترون نشان داد میانگین شکاف‌های کروماتیدی در گروهی که ابتدا تحت تابش بودند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد واقع شدند از سایر گروه‌ها بیشتر بود و آزمون‌های آماری بین این گروه با گروه‌های شاهد و افزایش دمای تنها، اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). همچنین مقایسه گروه‌های افزایش دما قبل از تابش و افزایش دما بعد از تابش نشان داد که فراوانی آسیب‌های کروموزومی در گروه‌هایی که پس از تابش، افزایش دما داشتند بیشتر بود و بررسی‌های آماری بین این گروه‌ها اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P<0/05$). این اختلاف در گروهی که پس از تابش ۳۰ دقیقه در ۴۳ درجه سانتی‌گراد افزایش دما شده بودند چشمگیرتر بود. (نمودار شماره ۳).

نمودار ۳:

فراوانی آسیب‌های کروموزومی در لنفوسیت‌های خون پس از اعمال توأم افزایش دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و تابش ۶ سانتی‌گری نوترون



با بیشتر کردن زمان افزایش دما پس از تابش نوترون، میانگین شکاف‌های کروموزومی تغییر چندانی نکرد، اما میانگین آسیب‌های از نوع حذف و تبادل کروموزومی افزایش یافت. ضریب همبستگی فراوانی این نوع آسیب‌ها و زمان افزایش دما ۰/۵۳۲ بود. میانگین حذف و تبادلات کروماتیدی نیز با بیشتر کردن زمان افزایش دما ضریب همبستگی ضعیفی را نشان داد. در مجموع میانگین کل آسیب‌های کروموزومی با بیشتر کردن زمان افزایش دما با ضریب همبستگی ۰/۵۶۲ افزایش یافت که نشان دهنده همبستگی بین میزان آسیب‌ها و زمان افزایش دما بود.

▣ بحث و نتیجه‌گیری:

در این مطالعه تابش نوترون سبب ایجاد آسیب‌های کروموزومی در لنفوسیت‌های خون محیطی انسان شد و با توجه به پایین بودن دوز مورد استفاده، باز هم فراوانی آسیب‌ها با گروه‌های شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد. این یافته با نتایج تحقیقات ماریزوت و همکاران مطابقت دارد. آنها با تابش نوترون بر روی DNA پلاسمید PBR322 نشان دادند که یک رابطه خطی بین دوز نوترون و تعداد آسیب ها مشاهده می‌شود.[۳] در واقع نوترون با توجه به این که جزء پرتوهای High LET است و همچنین اثر بیولوژیکی نسبی بالایی دارد، لذا اثر آن در ایجاد آسیب های کروموزومی نسبت به اشعه‌های ایکس و گاما زیادتر است. بنابراین دوزهای کم نوترون، همان طور که در این مطالعه هم مشاهده شد، در ایجاد آسیب های کرموزومی بسیار مؤثر واقع می‌شوند.[۲]

در این مطالعه افزایش دمای ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد باعث ایجاد آسیب‌های کروموزمی نشد که

www.SID.ir

www.SID.ir

این یافته با نتایج مطالعه ویسنبورن و اُبه مشابه است. ایشان با مطالعه مراحل مختلف چرخه سلولی نشان دادند افزایش دما در هیچ کدام از مراحل آسیب ایجاد نمی‌کند. [۱۲و ۱۳] در واقع د ر دمای ۳۷ تا ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد در سلول ها یک مقاومت نسبی و تحمل گرمایی به وجود می‌آید که این اثر تا حدودی باعث جلوگیری از تأثیر پرتوها بر سلول می‌شود، اما در ۴۳ درجه سانتی‌گراد با توجه به این که سلول‌ها حساسیت زیادی به افزایش دما نشان می‌دهند تعداد آسیب ها افزایش می‌یابد. مطالعه میشل و همکاران در دمای ۴۲ تا ۴۶ درجه سانتی‌گراد نیز مؤید این نتیجه است. [۴]

با بیشتر نمودن زمان افزایش دما پس از تابش، میزان آسیب‌ها افزایش یافت که این با نتیجه تحقیقات ویسنبورن و اُبه نیز مطابقت دارد. ایشان با مطالعه بر روی لنفوسیت‌ها نشان دادند با بیشتر نمودن زمان افزایش دما از صفر تا ۱۵ دقیقه، فراوانی آسیب‌ها به صورت خطی افزایش می‌یابد. [۱۲و۱۳]

به طور کلی در ترکیب تابش پرتوهای یون‌ساز با افزایش دما، میزان آسیب‌های کروموزومی افزایش می‌یابد و از آن جا که بین میزان این آسیب‌ها و مرگ سلولی رابطه مستقیمی وجود دارد، می‌توان افزایش مرگ سلولی را در ارتباط با میزان آسیب‌های کروموزومی دانست. [۸] به نظر می‌رسد افزایش دما با جلوگیری از روند ترمیم آسیب های DNA باعث افزایش آسیب های کروموزومی و مرگ سلولی می‌شود.

البته باید توجه داشت افزایش دمانمی‌تواند میزان آسیب های ایجاد شده توسط پرتوها را افزایش دهد بلکه بیشتر روند ترمیم DNA را به واسطهٔ درجه حرارت و زمان مهار می‌کند که این مهار از طریق یکی از این دو مکانیسم زیر انجام می‌شود:

یکی، تأثیر بر فعالیت آنزیم اختصاصی ترمیم DNA (DNA - Polymerase ß) . مؤید این مطلب نتایج کار اسپیرو و همکاران است که نشان دادند گرما باعث غیر فعال شدن این آنزیم می‌شود. همین طور رافورست مهم‌ترین عامل تخریب سیستم‌های بیولوژیکی در اثر افزایش دما را غیر فعال شدن پروتئین‌ها و آنزیم‌هاو همچنین ممانعت از سنتز DNA و RNA و در نتیجهٔ غیر فعال شدن آنزیم‌های مؤثر در سنتز بیان کرد. [۸و۱۱]

دوم، افزایش پروتئین‌های غیر هیستونی در اطراف DNA . مؤید این مطلب نتیجه کار روتی و همکاران است که نشان دادند در اثر افزایش دما پروتئین‌های غیر هیستونی در اطراف DNA تجمع و از ترمیم آن جلوگیری می‌کنند. [۱۰] از طرف دیگر افزایش دما پس از تابش باعث مهار ترمیم آسیب‌های زیرکشنده و بالقوه کشنده می‌شود و این مهار بستگی به مقدار دوز گرمایی، مدت زمان آن و همچنین فاصله بین تابش و افزایش دما دارد. [۹]

در تحقیق حاضر اثر افزایش دما بر دوزکم نوترون بررسی شد و پیشنهاد می‌شود این اثر با دوزهای بالاتر نوترون و همچنین با فاصله زمانی بیش از یک ساعت بین تابش و افزایش دما بررسی شود.این تحقیق در محیط کشت انجام شد، پیشنهاد می‌شود مطالعه بر روی تومورهای سطحی بدن که امکان اعمال افزایش دمای موضعی وجود دارد انجام شود.

سپاسگذاری :

بدین وسیله از راهنمایی‌های ارزنده استاد ارجمند جناب آقای دکتر حسین مزدارانی تشکر و قدردانی می‌شود.

Archive of SID

▣ مراجع :

1. Cai Lu, Jiang J. Mild hyperthermia can induce adaptation to cytogenetic damage caused by subsequent X-irradiation. Radiat Res 1995; 143: 26-33

2. Hall EJ. Radiobiology for the radiologist. 4th ed, Philadelphia, JB Lippincott, 1993; 708-13

3. Maurizot MS, Charlier M, Sabatier R. DNA radiolysis by fast neutrons. Int J Rdiat Biol 1990; 57 (2): 304-13

4. Mitchel RE, Birnboim HC. Triggering of DNA strand breaks by 45°C hyperthermia and its influence on the repair of gamma radiation damage in human white blood cells. Cancer Res 1985; 45(5): 2040 - 5

5. Mittler S. Hyperthermia increases chromosome breakage and loss induced by fission neutrons in drosophila melanogaster. Mutat Res 1984; 139(3): 119-21

6. Nevaldin B, Long JA, Hahn PJ. Hyperthermia inhibits the repair of DNA double strand breaks induced by ionizing radiation as determined by pulsed- field gel electrophoresis. Int J Hyperthermia 1994; 10(3): 381-8

7. Nielsen OS. Influence of thermotolerance on the interaction between hyperthermia and radiation in L1A2 cells in vitro. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 1983; 43(6): 665-73

8. Raaphorst GP. Fundamental aspects of hyperthermic biology. in: An introduction to practical aspects of clinical hyperthermia. Tylor and Francis, eds. London, UK, 1990; 90-8

9. Raaphorst GP. Recovery of sublethal radiation damage and its inhibition by hyperthermia in normal and transformed mouse cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 22(5): 1035-41

10. Roti JL, Henle KJ. The kinetics of increase of chromatin protein content in heated cells, a possible role in cell killing. Radiat Res 1980; 85: 504-13

11. Spiro IJ, Denman DL, Dewy WC. Effect of hyperthermia on CHO DNA polymerases α and ß. Radiat Res 1982; 89: 134-49

12. Weissenborn U, Obe G. Modification of X-ray induced chromosome aberration frequency by pre-and postirradiation hyperthermia of human peripheral lymphocytes. Int J Radiat Biol 1991; 59(4): 973-84

13. Weissenborn U, Obe G. Modification of bleomycin - induced chromosome aberration by hyperthermia and under energy depleting conditions in human peripheral lymphocytes. Int J Radiat Biol 1992; 62(3): 289-96

www.SID.ir