Archive of SID

تخلیص و شناسایی برخی خصوصیات ایمونوگلوبولین سرم در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

محمدرضا کلباسی[۱] ؛ علی مصطفایی[۲] و جعفر مجیدی[۳]

Kalbas_m@modares.ac.ir

۱ ـ گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور صندوق پستی: ۳۵۶-۴۶۴۱۴

۲ ـ گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، کرمانشاه صندوق پستی: ۱۵۶۸-۶۷۱۴۵

۳ ـ گروه ایمونولوژی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی تبریز، تبریز صندوق پستی: ۴۳۱۶۱-۵۱۵۷۶

تاریخ دریافت : دی ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش : شهریور ۱۳۸۲

چکیده

در این مطالعه ایمونوگلوبولین سرم تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) خالص و برخی خصوصیات آن از جمله وزن زنجیره‌های سبک و سنگین و توزیع مولکولی تعیین گردید. ایمونوگلوبولین تاس‌ماهی ایرانی از مخلوط سرم این ماهی با استفاده از روشهای ترسیب نمکی، کروماتوگرافی تعویض یون و ژل فیلتراسیون خالص گردید. در کروماتوگرافی تعویض یون و ژل فیلتراسیون بترتیب از ستون دی‌اتیل آمینو اتیل سفارز و ستون سفارز سی ال - ۶ بی استفاده شد. خلوص محصولات، وزن مولکولی زنجیره‌های سبک و سنگین و توزیع مولکولی ایمونوگلوبولین با روش SDS-PAGE در شرایط احیایی و غیراحیایی تعیین گردید. ایمونوگلوبین خارج شده از ستون سفارز سی ال - ۶ بی شامل دو بخش تک واحدی یا ایمونوگلوبولین با وزن مولکولی پایین (LMW Ig) و چند واحدی یا ایمونوگلوبولین با وزن مولکولی بالا (HMW Ig) بود. این دو بخش در SDS-PAGE احیایی الگوی یکسانی داشتند و محتوای پروتئینی هر یک شامل دو باند ۲۷-۲۹ و ۷۳ تا ۷۵ کیلودالتونی بود. در کروماتوگرافی تعویض یون، ایمونوگلوبولین تاس‌ماهی به صورت سه بخش تقریباً مجزا خارج گردید. در این میان بخش اول منحصراً شامل ایمونوگلوبین تک واحدی و بخش‌های دیگر حاوی مخلوطی از ایمونوگلوبین‌های تک واحدی و چند واحدی بود. این مطالعه که نخستین گزارش منتشره در خصوص ویژگیهای ایمونوگلوبولین سرم تاس‌ماهی ایران است، حاوی نتایج قابل توجهی در مقایسه با نتایج مطالعات انجام شده بر روی ایمونوگلوبولین سایر گونه‌های ماهیان است و نشان می‌دهد که ایمونوگلوبولین تاس‌ماهی از نظر اشکال مولکولی، تفاوت نقطه ایزوالکتریک و نوع زنجیره سبک همگون نیست. چنین تنوع ساختمانی می‌تواند ناشی از وجود بیش از یک ژن برای تولید زنجیره سبک و یا سنگین آنتی بادی و یا تغییرات پس از نسخه‌برداری ژن و یا ترجمه mRNA باشد.

کلمات کلیدی: تاس‌ماهی ایرانی، *Acipenser persicus* ایمونوگلوبولین، تخلیص، سرم

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در سرم ماهی عمدتاً یک کلاس ایمونوگلوبولینی دیده می‌شود (Bourmaud *et al.*, 1995 ; Reinisch & Litman, 1989). برغم مطالعات چندی که در ماهی‌ها صورت گرفته است، هنوز اطلاعات کاملاً روشنی در مورد ساختمان، انواع زنجیره‌ها و توزیع مولکولی ایمونوگلوبولین در بسیاری از گونه‌های ماهی وجود ندارد (Wilson & Warr, 1992 ; Hordvik, 1998). نتایج مطالعات انجام گرفته حاکی از وجود یک کلاس ایمونوگلوبولین شبیه IgM پستانداران در ماهی‌ها است که عمدتاً به صورت چهار واحدی و به میزان کمتر در اشکال سه، دو و تک واحدی دیده می‌شود (Press, 1998 ; Wilson & Warr, 1992). تاس‌ماهی دریای خزر یکی از گونه‌های ماهیان خاویاری است که به دلیل عدم ارتباط دریای خزر با سایر آبهای سطح زمین، به این دریا منحصر می‌شود و از نظر فیلوژنی و اقتصادی جایگاه ویژه‌ای دارد. این ماهی به صورت مصنوعی تکثیر گردیده و سالانه میلیونها عدد بچه تاس‌ماهی ۳ تا ۵ گرمی به دریای خزر رها سازی می‌گردد. به منظور کاهش تلفات این ماهی در هنگام پرورش اولیه، اخیراً در خصوص ایمن‌سازی این ماهیان قبل از رهاسازی به دریا مطالعاتی صورت پذیرفته است (کلباسی، ۱۳۷۹) و در ادامه مطالعات روی این گونه ماهی، ایمونوگلوبولین‌های سرم تخلیص و بعضی از خصوصیات آن از جمله وزن مولکولی زنجیره‌های سبک و سنگین و توزیع مولکولی آنتی بادی تعیین گردید.

مواد و روش کار

نمونه‌های سرم: نمونه‌های سرم مورد استفاده شامل مخلوطی از سرم تاس‌ماهیان نر و ماده سه ساله پرورشی بود که از انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری تأمین گردید و تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند.

جداسازی گلوبولین‌های سرم: سرم دو نوبت با بافر فسفات نمکی (PBS) با pH = ۷/۲ رقیق و به هر حجم از آن، یک حجم محلول سولفات آمونیوم اشباع در PBS اضافه گردید. مخلوط مذکور به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. رسوب حاصل از سانتریفوژ که حاوی بخش ایمونوگلوبولینی سرم ماهی بود، برای مرحله بعد نگهداری گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

گروماتوگرافی تعویض یون: رسوب حاصل از مرحله قبل در بافر تریس ۰/۰۵ مولار با pH =۷/۷ حل و به مدت یک شب در برابر این بافر دیالیز گردید. محلول دیالیز شده سپس به ستون XK 16/20 حاوی رزین دی اتیل آمینو اتیل سفارز (فارماسیا) که با بافر تریس به تعادل رسیده بود، وارد شد. پس از عبور مقدار کافی بافر از ستون، شیب پیوسته یا ناپیوسته کلرید سدیم در بافر تریس بر ستون اعمال گردید.

ژل فیلتراسیون: ژل فیلتراسیون در ستون XK 26/100 و رزین سفارز سی ال ۶- بی (فارماسیا) صورت گرفت. محتوای پروتئینی بخش غنی از ایمونوگلوبولین با سولفات آمونیوم رسوب داده شد. رسوب در برابر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷/۵ حاوی کلرید سدیم ۰/۵ مولار دیالیز گردید و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ستون ژل فیلتراسیون که با بافر فسفات به تعادل رسیده بود، وارد شد. برای خروج تمامی پروتئین‌ها از ستون، حداقل یک حجم ستون از بافر با سرعت ۲۵ میلی‌لیتر در ساعت از ستون عبور داده شد.

الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید (SDS- PAGE): الکتروفورز پروتئین‌ها براساس روش Laemmli (Laemmli, 1970) در شرایط احیایی و غیر احیایی انجام گرفت. در الکتروفورز احیایی از ژل جداکننده ۱۰ درصد و در الکتروفورز غیراحیایی از ژل جداکننده ۴ درصد استفاده شد. در هر حالت، یک حجم بافر نمونه (X ۵) به ۴ حجم نمونه (با غلظت ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه و ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و سپس ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه به چاهک‌ها اضافه شد و الکتروفورز در ولتاژ ۱۵۰ ولت تا رسیدن رنگ نشانگر به انتهای ژل ادامه یافت. برای رنگ آمیزی پروتئین‌ها از کوماسی آبی R-۳۵۰ (فارماسیا) استفاده شد.

اندازه گیری غلظت پروتئین: غلظت پروتئین‌ها به روش برادفورد (Bradford, 1976) با استفاده از گاماگلوبولین گاوی (به عنوان استاندارد) و به منظور تنظیم آن در مراحل کار (خالص سازی و آنالیز محصول) اندازه گیری و برابر ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین گردید.

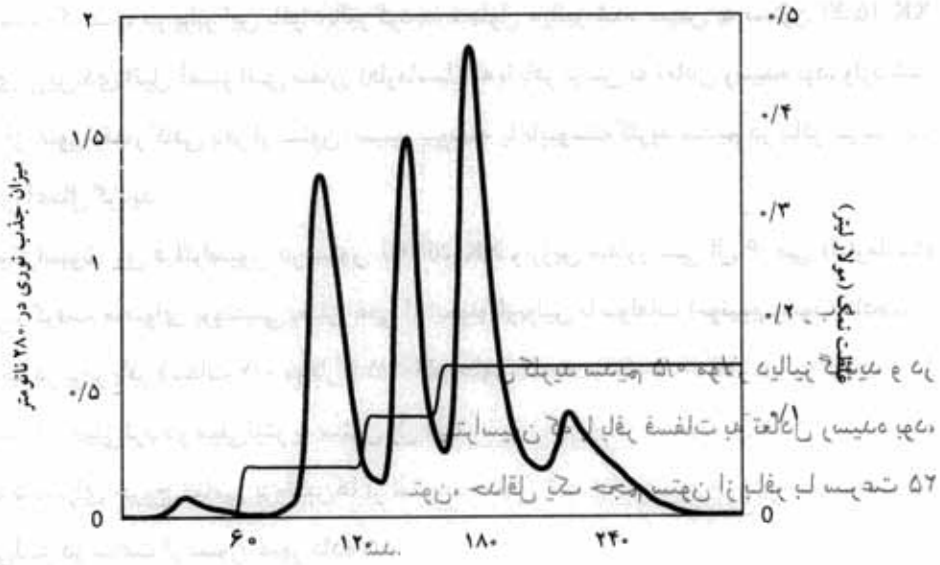
نتایج

با اعمال شیب غلظت کلرید سدیم تا ۱۵۰ میلی مولار، بخش عمده ایمونوگلوبولین تاس‌ماهی

www.SID.ir

Archive of SID

به صورت سه بخش (قله) پروتئینی نسبتاً مجزا از ستون خارج گردید (شکل ۱).



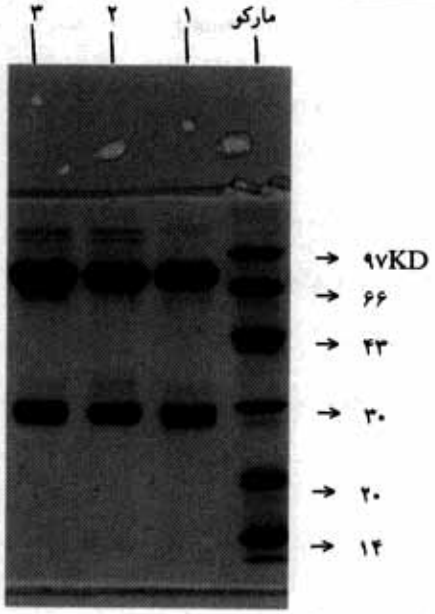
شکل ۱: کروماتوگرافی تعویض یون ایمونوگلوبولین نامی ماهی در ستون DEAE سفارز

بررسی الگوی الکتروفورز این قله‌ها در شرایط احیایی نشان داد که محتوای پروتئینی هر یک عمدتاً شامل دو باند ۲۷ تا ۲۹ و ۷۳ تا ۷۵ کیلودالتونی است که بترتیب موقعیت زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولینی را نشان می‌دهند (شکل ۲). برغم تشابه کلی موقعیت باندهای پروتئینی در این سه قله، در موقعیت زنجیره سبک قله اول، دو باند پروتئینی با اختلاف وزنی جزیی مشاهده گردید (ستون ۳ شکل ۲).

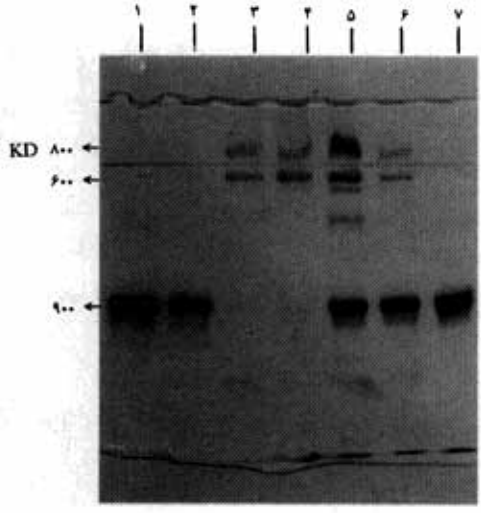
الگوی الکتروفورز غیر احیایی قله‌های پروتئینی خارج شده از ستون تعویض یون در شکل ۳ (ستون‌های ۵ تا ۷) آمده است. همانگونه که این شکل نشان می‌دهد، در قله اول یک باند پروتئینی در موقعیت وزنی حدود ۱۹۰ کیلو دالتون دیده می‌شود (ستون ۷). در قله دوم، سه باند (ستون ۶) و در قله سوم، پنج باند پروتئینی دیده می‌شود (ستون ۵) که عمده‌ترین آنها در موقعیت وزنی حدود ۱۹۰ و ۸۰۰ کیلو دالتون قرار دارند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: SDS-PAGE احیایی ایمونوگلوبولین تاس ماهی ایرانی در ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد. ستون‌های ۱،۲و۳ به ترتیب محتوای پروتئینی بخشهای ۳، ۲ و ۱ جدا شده در ستون تعویض یون را نشان می‌دهند. ستون M مربوط به مارکرها با اوزان ۱۴، ۲۰، ۳۰، ۶۶ و ۹۷ کیلو دالتون است.

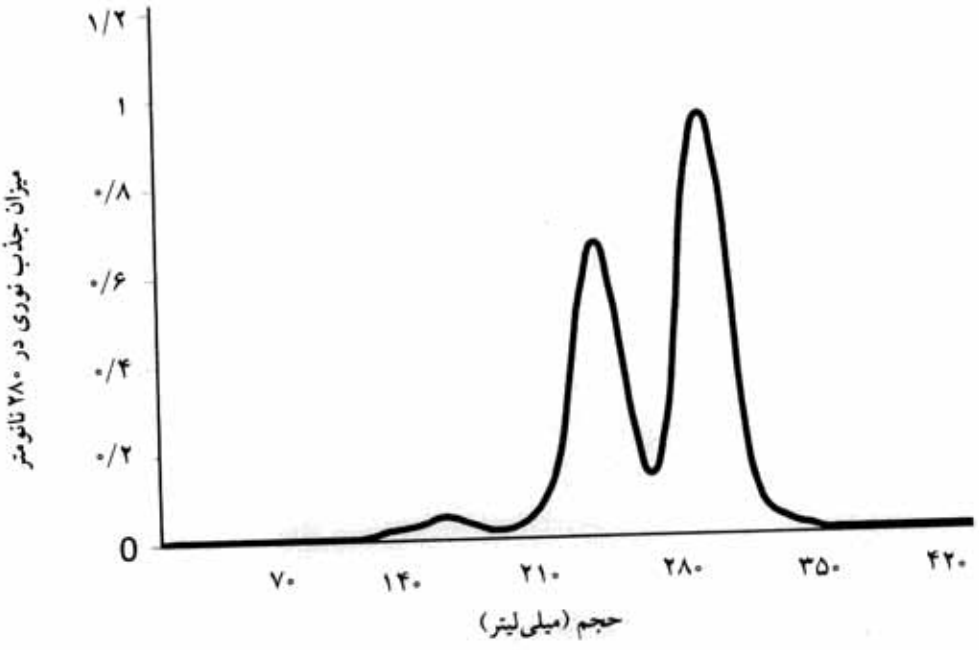


شکل ۳: SDS.PAGE غیر احیایی ایمونوگلوبولین تاس ماهی ایرانی در ژل پلی اکریل آمید ۴ درصد.

www.SID.ir

Archive of SID

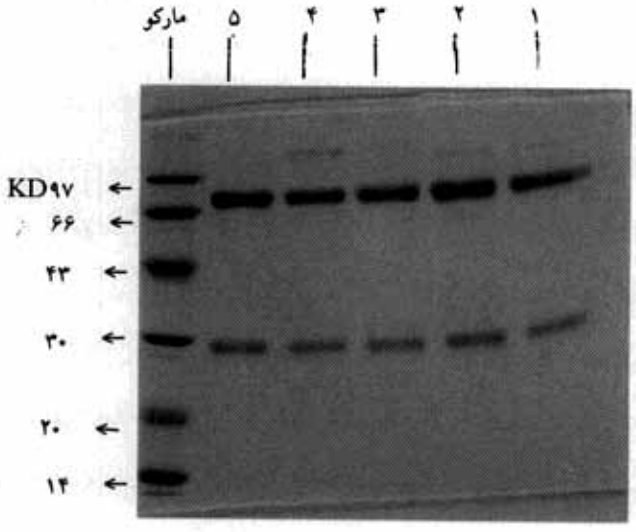
در ژل فیلتراسیون در ستون سفارز سی ال - ۶بی، ایمونوگلوبولین تاس ماهی به دو بخش پروتئینی تفکیک گردید (شکل ۴). این دو بخش الگوی الکتروفورزی یکسانی در شرایط احیایی داشتند و درجه خلوص ایمونوگلوبولین بدست آمده در هر یک از آن دو بیش از ۹۵ درصد بود (شکل ۵). در الکتروفورز احیایی (ستون‌های ۳ و ۴ شکل ۳) قله اول پروتئینی که کمتر از نیمی از ایمونوگلوبولین سرم تاس ماهی را تشکیل می‌داد شامل دو باند پروتئینی عمده با وزن مولکولی تخمینی ۶۰۰ و ۸۰۰ کیلودالتون بود. قله دوم که بیش از نیمی از ایمونوگلوبولین را تشکیل می‌داد، تنها شامل یک باند پروتئینی در موقعیت ۱۹۰ کیلو دالتونی بود (ستون‌های ۱ و ۲ شکل ۳).



شکل ۴: فیلتراسیون ایمونوگلوبولین تاس ماهی ایرانی در ستون سفارز CL-6B

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵: SDS-PAGE احیایی ایمونوگلوبولین تاس ماهی ایرانی بعد از ژل فیلتراسیون. ستون‌های ۱ و ۲ بترتیب مربوط به نوک و بخش پایین رو قله اول، و ستون‌های ۳ و ۴ به ترتیب مربوط به نوک و بخش پایین رو قله دوم ژل فیلتراسیون است. ستون M شامل مارکرها با اوزان ۱۴، ۲۰، ۳۰، ۴۳، ۶۶ و ۹۷ کیلو دالتون است.

بحث

مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که به خالص سازی ایمونوگلوبولین سرم تاس ماهی ایرانی در دریای خزر پرداخته و بعضی از خصوصیات این مولکولها را با نتایج مطالعات مشابه روی سایر گونه‌های ماهی مورد مقایسه قرار داده است. در این مطالعه خالص سازی ایمونوگلوبولین‌های سرم تاس ماهی مبتنی بر جداسازی بخش گلوبولینی سرم با سولفات آمونیوم و تفکیک اجزای آن با دو روش کروماتوگرافی تعویض یون و ژل فیلتراسیون بود. نتایج کروماتوگرافی تعویض یون نشان داد که تا غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم در بافر، بخش عمده ایمونوگلوبولین خارج می‌گردد و

www.SID.ir

Archive of SID

بخش بسیار کمی از آن در ستون باقی می‌ماند. ایمونوگلوبولین خارج شده از ستون تا غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم، بخصوص در بخش اول، از درجه خلوص بالایی برخوردار بود. الگوی الکتروفورز این مولکولها در هر سه بخش شامل دو باند ۲۷ تا ۲۹ و ۷۳ تا ۷۵ کیلو دالتونی بود که با نتایج مطالعات دیگران مشابه می‌باشد (Adkison *et al.*,1996;Partula& Charlemagne, 1993). این دو باند بترتیب موقعیت زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولین را نشان می‌دهند و از نظر وزنی قابل مقایسه با زنجیره‌های سبک و سنگین IgM در پستانداران هستند (Reinisch & Wilson & Warr, 1992 ; Litman, 1989). به همین دلیل، ایمونوگلوبولین‌ها در ماهی به شبه IgM معروفند. برغم تشابه الگوی الکتروفورز سه قله خارج شده از ستون تعویض یون در شرایط احیایی، بررسی این بخش‌ها در SDS-PAGE غیر احیایی نشان داد که قله اول منحصراً حاوی ایمونوگلوبولین تک واحدی است و در محدوده وزنی ۱۹۰ کیلو دالتون قرار دارد (ستون۷، شکل ۳). در مقابل، در قله‌های دوم و سوم علاوه بر ایمونوگلوبولین تک واحدی، ۲ تا ۴ باند پروتئینی دیگر در موقعیت‌های وزنی بالاتر دیده شد (ستون‌های ۵ و ۶، شکل ۳). این باندها مربوط به اشکال چند واحدی ایمونوگلوبولین در تاس‌ماهی ایرانی است که در مطالعات Partula و Charlemagne (۱۹۹۳) و همچنین Adkison و همکاران (۱۹۹۶) روی گونه‌های ماهیان خاویاری *A. baeri* و *A. transmontanus* نیز گزارش شده است. عمده‌ترین این باندها در موقعیت وزنی ۸۰۰ کیلو دالتون قرار داشت و مربوط به مولکولهای چهار واحدی ایمونوگلوبولین بود. نتایج این بخش از مطالعه حاضر نشان داد که ایمونوگلوبولین تاس ماهی ایرانی از نظر میل اتصال به رزین تعویض یون و در نتیجه نقطه ایزوالکتریک همگون نبوده، حداقل دارای سه بخش است. بخش اول که نقطه ایزوالکتریک بالاتری داشت و به صورت یک قله مجزا از ستون خارج گردید، منحصراً حاوی ایمونوگلوبولین تک واحدی بود. بخشهای دوم و سوم که در شیب خطی کلرید سدیم نیز به صورت دو قله نسبتاً مجزا خارج می‌شدند، حاوی مخلوطی از اشکال تک واحدی و چند واحدی ایمونوگلوبولین بودند. از دیگر نتایج قابل توجه این مطالعه، وجود دو نوع زنجیره سبک در

www.SID.ir

Archive of SID

ایمونوگلوبولین این گونه ماهی است. این دو نوع زنجیره سبک که تفاوت وزنی بسیار کمی دارند، تنها در ایمونوگلوبولین تک واحدی بخش اول کروماتوگرافی تعویض یون دیده شد (ستون ۳، شکل ۲) و در دیگر بخشها قابل مشاهده نبود. ناهمگونی ایمونوگلوبولین ماهی از نظر نقطه ایزوالکتریک و تفاوت زنجیره سبک در چندین مطالعه روی گونه‌های مختلف ماهی‌های استخوانی گزارش شده است (Acton *et al.*, 1971 ; Bourmand *et al.*, 1995). برای مثال در چند مطالعه روی ماهی‌های استخوانی، وجود حداقل دو فراکسیون ایمونوگلوبولینی با نقطه ایزوالکتریک متفاوت در سرم نشان داده شده (Havarstein *et al.*, 1988) یا به وجود بیش از یک نوع زنجیره سبک اشاره شده است (Partula *et al.*, 1996). با این وجود، تاکنون اطلاعات دقیقی در مورد وضعیت و آرایش ژن‌های ایمونوگلوبولینی و وقایع پس از نسخه‌برداری و ترجمه در ماهی‌های خاویاری در دست نیست.

در این مطالعه همچنین معلوم گردید که ایمونوگلوبولین تک واحدی بیش از نیمی از ایمونوگلوبولین‌های سرم تاس ماهی را شامل می‌شود و شکل چهار واحدی آنتی بادی کمتر از نیمی از محتوای ایمونوگلوبولینی را به خود اختصاص می‌دهد. این نتیجه با نتایج مطالعات انجام گرفته روی گونه‌های دیگر ماهی مشابه نیست، چرا که نتایج این مطالعات حاکی از غالب بودن شکل چهار واحدی ایمونوگلوبولین از نظر مقدار است (Acton *et al.*, ; Adkison *et al.*, 1996 1971). بررسی محتوای پروتئینی هر یک از دو قله خارج شده از ستون سفارز سی ال - ۶ بی نشان داد که الگوی SDS-PAGE آنها در شرایط احیایی کاملاً مشابه و میزان خلوص ایمونوگلوبولین در هر دو بخش نیز بسیار بالا می‌باشد. چنین فرآورده‌ای را می‌توان در جهت اهداف مختلفی از جمله تولید Anti-sturgeon IgM (به منظور انجام آزمایشات تشخیصی ایمونولوژیک از قبیل الایزا و غیره)، مطالعات ایمن سازی و یا تعیین توالی اسیدهای آمینه به کار برد. در مقابل، در SDS-PAGE غیر احیایی معلوم گردید که بخش اول منحصراً حاوی اشکال چند واحدی (عمدتاً ۳ و ۴ واحدی) ایمونوگلوبولین تاس ماهی و بخش دوم حاوی شکل تک واحدی آنتی بادی است.

www.SID.ir

Archive of SID

در جمع‌بندی نهایی می‌توان اظهار نمود مطالعه حاضر روی ایمونوگلوبین سرم تاس‌ماهی ایرانی، حاوی نتایجی است که بعضاً در مطالعات مشابه دیده نمی‌شود. در این مطالعه با روشی نسبتاً ساده، ایمونوگلوبولین سرم تاس ماهی ایرانی با درجه خلوص بالا بدست آمد و روشن گردید IgM تک واحدی، بخش قابل توجهی از ایمونوگلوبولین سرم را به خود اختصاص می‌دهد. ایمونوگلوبولین چند واحدی نیز از نظر تعداد واحدها توزیع متفاوتی دارد ولی بخش عمده آن به صورت چهار واحدی است. اشکال مولکولی IgM مخصوصاً نوع تک واحدی، رفتار همگونی در کروماتوگرافی تعویض یون ندارد و به ۲ تا ۳ بخش از نظر نقطه ایزوالکتریک قابل تقسیم است و بیش از یک نوع زنجیره سبک در ساختمان ایمونوگلوبولین این گونه از ماهی وجود دارد. این ناهمگونی ساختاری در ایمونوگلوبولین می‌تواند ناشی از وجود بیش از یک ژن برای تولید زنجیره سبک یا سنگین آنتی بادی و یا تغییرات پس از نسخه برداری ژن یا ترجمه mRNA باشد که در صورت مطالعات بیشتر می‌توان به روشن ساختن بسیاری از نکات آن پرداخت.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نگارندگان برخود لازم می‌دانند از همکاری صمیمانه ریاست و پرسنل محترم انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری در اجرای این تحقیق قدردانی نمایند.

منابع

کلباسی، م.ر.، ۱۳۷۹. ایمن‌سازی و مطالعه پاسخ ایمنی در تاس‌ماهی ایرانی. رساله دکترا شیلات. دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس. ۸۵ صفحه.

Acton, R.T. ; Weinheimer, P.F. ; Hall, S.J. ; Niedrmeier, W. ; Sheiton, E. and Bennett, J.C. , 1971. Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 68, pp.107-111.

www.SID.ir

Archive of SID

Adkison, M.A. ; Basurco, B. and Hedrick, R.P. , 1996. Humoral immunoglobulins of the white sturgeon, *Acipencer transmontanus*: partial characterization of and recognition with monoclonal antibodies. Dev. Comp. Immunol. Vol. 20, pp.285-298.

Bourmaud, C.A. ; Romestand, B. and Bouix, G. , 1995. Isolation and characterization of IgM-Like seabass immunoglobulin. Aquaculture, Vol. 132, pp.53-58.

Bradford, M.M. , 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. Vol. 72, pp.248-254.

Havarstein, L.S. ; Aasjord, P.M. ; Ness, S. and Endersen, C. , 1988. Purification and partial characterization of an IgM-Like serum immunoglobulin from Atalatic Salmon. Dev. Comp. Immunol. Vol. 12, pp.773-785.

Hordvik, I. , 1998. The impact of ancestral tetraploidy on antibody heterogeneity in salmonid fishes. Immunological Rev., Vol. 166, pp.153-157.

Laemmli, U.K. , 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, Vol. 227, pp.680-685.

Partula, S. and Charlemagne, J. , 1993. Characterization of serum immunoglobulins in chondrostean fish, *Acipenser baeri*. Dev. Comp. Immunol. Vol. 17, pp.515-524.

Partula, S. ; Schwager, J. ; Timmusk, S. and Pilstrom, I. , 1996. A second immunoglobulin light chain isotype in the rainbow trout. Immunogenetics, Vol. 45, pp.44-51.

Press, C. , 1998. Immunology of fishes. Immunoglobulins *In*: Handbook of

www.SID.ir

Archive of SID

vertebrate immunology. (Eds. P.P. Pastoret ; P. Gnebel ; H. Bazin and A. Govaerts). Academic Press, london, UK.pp.16-25.

Reinisch, C.L. and Litman, G.W. , 1989. Evolutionary immunology. Immunology Today, Vol. 10, pp.287-280.

Wilson, M.R. and Warr, G.W. , 1992. Fish immunoglobulin and the genes that encode them. Ann. Rev. Fish Dis., Vol. 2, pp.201-221

www.SID.ir