بررسی تأثیر سموم ارگانوفسفره بر فعالیت کولین استراز اریتروسیت در کارگران مزارع برنج

دکتر محمد علی ابراهیم زاده*، محمد شکرزاده لموکی**، دکتر مهشاد بیوک آبادی***

چکیده:

زمینه و هدف: **استفاده از سموم ارگانوفسفره به عنوان حشره کش یا علف کش از دیر باز در استانهایی مانند مازندران بعلت وفور مزارع کشاورزی رواج داشته است. از آنجا که بسیاری از کارگران مزارع در تماس با این سموم قرار می گیرند بنابراین امکان جذب این سموم از طریق پوست وجود دارد. این کار تحقیقی به منظور بررسی میزان جذب سموم از طرق مختلف در این کارگران انجام شده است.**

روش مطالعه: **بدین منظور از روش رنگ سنجی المن در سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AchE) استفاده شد. نمونه ها از ۳۵ کارگر زمین کشاورزی برنج که ۱۰ تا ۱۵ روز پس از استفاده از سموم ارگانو فسفره، در داخل زمین کشاورزی بطور پا برهنه کار می کردند، گرفته شد و ۳۵ نفر نمونه به عنوان شاهد از بین افراد سالم با شرایط یکسان انتخاب شدند با این تفاوت که در تماس یا مواجهه با این سموم نبوده و در زمین کشاورزی نیز کار نمی کردند. فعالیت آنزیم استیل کولین استراز به صورت واحد در میلی لیتر گلبول قرمز محاسبه شد.**

نتایج: **تفاوت معنی داری بین میانگین فعالیت آنزیم در مردان و زنان شاهد بدست نیامد اما این تفاوت در مردان و زنان کارگر از نظر آماری معنی دار نشان داده شد (P<۰/۰۵). بررسی آماری نشان داد که میان فعالیت این آنزیم در مردان کارگر با گروه شاهد تفاوت معنی داری وجود دارد (P<۰/۰۵). تفاوت معنی داری نیز بین میانگین فعالیت آنزیم در زنان کارگر با افراد شاهد بدست آمد (P<۰/۰۵).**

نتیجه گیری: **میزان جذب سموم در کارگران مزرعه بالاست. امکان کاهش آن با استفاده نمودن از چکمه و دستکش و همچنین اجتناب از بکارگیری کارگران قبل از گذشت دو هفته پس از سم پاشی وجود دارد.**

واژه های کلیدی: کولین استراز، روش المن، کارگران مزارع کشاورزی، سموم ارگانوفسفره.

مقدمه:

ترکیبات ارگانوفسفره بطور گسترده ای به عنوان حشره کش مورد استفاده قرار می گیرند. این ترکیبات در افرادی که در مواجهه یا تماس با آنها هستند، خطرات و مشکلاتی را ایجاد می کنند. مهار برگشت ناپذیر استیل کولین استراز (AChE, EC 3.1.1.7) و بوتیریل کولین استراز (BChE, EC 3.1.1.8) مکانیسم اصلی سمیت با ارگانوفسفره ها بوده که موجب اختلال در عملکرد اعضای متعددی در بدن می شود (۱۲،۶). اطلاع از وضعیت این آنزیم در تشخیص اولیه مسمومیت در

*استادیار گروه شیمی دارویی - دانشگاه علوم پزشکی مازندران: *دانشکده داروسازی ساری - گروه فارماکولوژی - تلفن: ۳۲۵۹۸۰۲ - ۰۱۵۱*، Email:zadeh20@yahoo.com، (**مؤلف مسئول**).

**عضو هیات علمی گروه داروسازی-دانشگاه علوم پزشکی مازندران. ***دکتر داروساز-مسئول فنی کارخانه پاک و داروخانه هلال احمر.

مواجهـــه با سـموم ارگانوفـسفره یـا سـمیت زدائـی آن، حیـاتی مـی بـاشد (۲). از آنجـا کـه کولیـــن اسـتراز عـضلات بـرای انـدازه گیـری مـستقیم در دستـــرس نمـی باشـد، کـولین اسـتراز گلبـول قرمزجانـشین قابـل اعتمادی بدین منظـــور می باشد (۱۴). سطح این آنـزیم یک شاخص مهم بیـــوشیمیائی و یک پارامتـــر حساس از برخـــورد با سموم و یـا حـضور مـواد سـمی در بـدن است (۳).

روش های حـساس و اختـصاصی متعـددی بـرای تعیین فعالیت کولین استراز گزارش شـده انـد ا ز جملـه: الکترومتـری، pH stat، تینتـو متـری، رادیـومتری و رنـگ سـنجی (۱۱). امـا اسـتفاده روتـین از آنهـا بعلـت مشکلات در تهیه نمونـه، زمـان انـدازه گیـری طـولانی، اختـصاصی نبـودن سوبـسترا بـه انـدازه کـافی و اخـتلال توسـط محـیط نمونـه امکـان پـذیر نمـی باشـد. روش رنـگ سـنجی Ellman (۵،۴) عمومـــاً روش ارجـح در مانیتور نمـــودن بیماران مسموم شده با حـشره کـش هـا مـــی باشـــد (۱۳). اســتفاده از ســـموم حـــشره کـــش و علف کش کشاورزی از دیـــر بـاز در اسـتانهایی ماننـد مازندران به علت وفور مـــزارع کـشاورزی رواج داشـته است. این ترکیبات در آب حل شده و سـپس مـزارع بـا این آب آبیاری و یـا سمپاشـی مـی شـود. از طرفـی ایـن مزرعه محل کار بسیاری از کارگران مزرعـه مـی باشـد که بطور پا برهنه در آن کار می کننـد لـذا منطقـی بنظـر می رسد که این افـــراد در تمـاس با ایـــن سموم قـرار گیرند. در این تحقیـق میزان جذب سمـــوم از طریـــق پوست بـــدن در کارگرانی که ساعت ها به طور پا برهنه در مزرعـــه مـشغول بکـار هـستند مـورد مطالعـــه قـرار گرفـت. ایـــن سمـــــوم بخـوبی از طریـق دهـــــانی، پوستـــــی و تنفسی در انسان قابلیت جذب دارند (۷).

مواد و روشها:

مواد شیمیائی و دستگاهها:

کلیه مواد مصرفی شامل دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبه، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سولفات کینیدین، اسیـد دی تیو بـیس نیتـرو بنزوئیـک، اسـتیل تیـو کـولین یدایـد و هیـامین ۱۶۲۲ از شـرکت فلوکـا (سـوئیس) خریداری شد. هپارین، سرنگ و سـایر نیازمنـدی هـا در مرحله خـونگیری از جملـه پنبـه، الکـل، گـار و غیـره از داروخانـه هـا تهیـه شـد. بـرای قرائـت میـزان جـذب از دسـتگاه اسـپکترو فتـومتر Shimadzu UV-mini 1240 سـاخت ژاپـن اسـتفاده شـد. عملیـات سـانتریفیوژ نیـز بـه کمک دستگاه Hettich Universal ساخت آلمان انجام شد.

واکنشگر ها:

بـافر فـسفات (PP, 0.1 mol/L, pH=7.4)، محلول یک: ۱۷/۸ گرم دی سدیم هیـــدروژن فـسفات دو آبـــه در یـک لیتـــــر آب مقطـر حـل شـــــد (۱). محلول دو: ۲/۷۲ گـــرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردیـــد سـپس از محلـول دو به محلول یک اضافه شد تا pH در دمای اتاق بـه ۷/۴ برسد (حدود ۶۰ میلی لیتر از محلول دو لازم می باشـد). این محلول در دمای یخچال تـا ۲ هفتـــه قابـل اسـتفاده می باشد (۱۴).

واکنشگر DTNB (dithiobis nitrobenzoic acid):

۰/۲۷ میلی مـول (۱۰۷ میلـی گـرم) از DTNB و ۲۰ میکـرو مـول (۱۶ میلـی گـرم) سـولفات کینیـدین در یک لیتـر از بـافر فـسفات تهیـه شـده از روش قبـل حـل گردیـد. ایـن محلـول در بطـری تیـره در دمـای یخچـال قابل نگهداری می باشد.

محلول سوبسترا:

از حل نمودن ۰/۲ مـــول استیل تیو کولین یداید در یک لیتر آب مقطرحاصل شد. در عمل به جهت تازه بودن این محلول، ۵۷۸ میلی گـرم از اسـتیل تیـو کـولین یداید در ۱۰ میلی لیتر آب مقطرحل گردید.

واکنشگر متوقف کننده:

از حل نمودن ۴۳ میلی مول بر لیتر (۲۰ گـرم در لیتر) هیامین ۱۶۲۲ در آب مقطر یا محلول اشباع سولفات کینیدین (حدود ۷ گرم در لیتـر) در آب مقطرتهیـه شـد. ایـن محلـول در بطـری تیـره در دمـای یخچـال قابـل نگهداری می باشد (۵).

نمونه ها:

نمونه های خونی بکار رفته در این تحقیق از ۳۵ کارگر زمین کشاورزی برنج (با محـدوده سـنی ۳۸-۲۷) که ۱۰ تا ۱۵ روز پس از استفاده از سموم ارگانو فـسفره، در داخـل زمـین کـشاورزی بـه طـور پـا برهنـه کـار می کردند، گرفته شد. این افراد در خلال ماه قبل سـابقه بیمـاری نداشـته، در بیمارسـتان بـستری نـشده و داروئـی اسـتفاده نکـرده بودنـد. توسـط کارشـناس آزمایـشگاه ۵ میلـی لیتـر خـون از وریـد سـاعد ایـن افـراد گرفتـه شـد. خون هـا پـس از انجـام چنـد مرحلـه، همـولیز گردیـد و سـپس تـا زمـان آزمـایش (صـبح روز بعـد) بـسرعت در فریزر منجمد شدند. نمونـه هـای شـاهد از همـــان تعـداد افراد سالم با شرایط یکسان انتخاب شدند با ایـن تفـاوت که در تماس یا مواجهه با سموم ارگانو فسفره نبوده و در زمین کشاورزی نیز کار نمی کردند.

محلول همولیز:

خون هـــا بلا فاصله پس از خروج از بدن هپارینـه گردیـده و بسرعت سانتریفیوژ شدند (۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه). بدین ترتیب سرم هـای جـدا شـده توسط سرنگ خارج شد. به جهت عاری نمـودن محـیط از کـولین اسـتراز سـرمی (بوتیریـل کـولین اسـتراز، پـسودو کـولین اسـترازیا کـولین اسـتراز کـاذب) عمـل شستشوی گلبول قرمزبا محلول نرمال سالین سه بار و هـر بار با مقدار هم حجم خود انجام شد. ایـن محلـول از آن جهـت انتخـاب شـد کـه در حـین انجـام عمـل شستـشو همولیزی صورت نگیرد. پـس از هـر بـار شستـشو عمـل سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه و بـا سـرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام شده و هر بار مایع فوقانی با سرنگ کشیده و دور ریخته شد. پس از آخـرین مرحلـه ۱۰۰ میکـرو لیتـر گلبول قرمز به ۶ میلی لیترآب مقطر اضافه شد تا همـولیز صورت پذیرد (این محلول همولیز تا رسیدن زمان انجـام کار بصورت فریز قابل نگهداری است).

روش انجام مرحله سـنجش فعالیـت آنـزیم اسـتیل کولین استراز:

۳ میلی لیتراز واکنشگر DTNB و ۱۰۰ میکرو لیتـر محلول سوبسترا (محلول استیل تیو کولین یداید) در لوله شیـشه ای بـه مـدت ۱۰ ثانیـه در حمـام آبـی ۳۷ درجـه گذاشته شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیترمحلول همـولیز بـرای شروع واکنش به آن اضافه شد. لوله شیـشه ای در حمـام آب ۳۷ درجه گذاشـته شـد و دقیقـاً پـس از ۱۰ دقیقـه ۱ میلی لیتر واکنشگر متوقف کننده به مجموعه اضافه شـد. محتویات داخل لوله شیشه ای بهم زده شده و بـه خـارج از حمام آبی منتقل شد. نمونه های بلانک دقیقاَ به شـرح فوق تهیه شدند با این تفاوت که ۱۰۰ میکرو لیتر محلول همولیز در مرحله آخر پس از افزودن واکنـشگر متوقـف کننده و سپری شدن زمان مربوطه، در خارج حمـام آبـی به هر لوله شیشه ای اضـافه شـد. از آنجـا کـه هـر نمونـه همولیز شده جذب خود را دارا می باشد لذا بدین ترتیب بـــرای سنجش فعالیت آنزیم در هر نمونه، یک بـــلانک

بطور مستقل تهیه گردید. بلافاصله جذب هر نمونه در مقابل بلانک خود در طول موج ۴۴۰ نانومترخوانده شد. این عمل برای هر نمونه همولیز سه بار انجام شد و در نهایت میانگین این اعداد در محاسبات بعدی بکار رفت. بدین ترتیب جذب برای کلیه نمونه های همولیز شده اعم از نمونه های کارگران و نمونه های سالم (افراد شاهد) انجام شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم استیل کولین استرازبصورت واحد در میلی لیتر گلبول قرمز (U / ml of packed erythrocytes) تفاوت جذب نمونه با شاهد در فاکتور ۱۷/۸۷ ضرب شد. این فاکتور از نسبت رقت بر جذب مولی در زمان واکنش بدست آمده است، جائی که رقت ۲۵۶۲، جذب مولی ۱۴۳۴۰ لیتر بر مول در سل (cell) ۱۰ میلی لیتری و زمان واکنش ۱۰ دقیقه ای می باشد.

بررسی های آماری توسط two tailed student t-test انجام شد.

نتایج:

میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مردان شاهد ۱۲/۱۱±۴/۴۳ (میزان جذب ۰/۶۷۷۸±۰/۲۴۸۰) و در زنان شاهد ۱۲/۶۰±۴/۸۳ (میزان جذب ۰/۷۰۵۲±۰/۲۷۰۵) بدست آمد. این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مردان کارگر ۸/۱۷±۴/۴۷ (میزان جذب ۰/۴۵۷۳±۰/۲۵۰۲) و در زنان کارگر ۵/۱۸±۲/۴۴ (میزان جذب ۰/۲۸۹۷±۰/۱۳۶۴) بدست آمد. تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نشان داده شد (P<۰/۰۵). در واقع با اطمینان ۹۵ درصد می توان قضاوت نمود که فعالیت این آنزیم در مردان کارگر بیش از زنان کارگر می باشد. تفاوت محسوسی بین میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مردان کارگر با میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در افراد شاهد وجود داشت. بررسی آماری نشان داد که میان فعالیت این آنزیم در مردان کارگر با گروه شاهد تفاوت معنی داری وجود دارد (P<۰/۰۵). تفاوت محسوسی نیز بین میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در زنان کارگر با میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در افراد شاهد وجود داشت. بررسی آماری نشان داد که میان فعالیت این آنزیم در زنان کارگر نیز با گروه شاهد تفاوت معنی داری وجود دارد (P<۰/۰۵).

بحث:

کولین استراز ها جزء بتا استرازها بوده که توسط مهار کننده هایی از قبیل سموم ارگانو فسفره، آنتی کولین استراز ها و برخی فلزات سنگین (مانند سرب و کادمیوم) مهار می شوند (۱). این آنزیم پس از مهار شدن قادر به هیدرولیز ماده اولیه اختصاصی خود نمی باشد. هر دو گروه کولین استرازها شامل کولین استراز حقیقی یا استیل کولین استراز که در گلبول قرمز و بافت عصبی وجود دارد وکولین استراز کاذب (غیر اختصاصی) یا بوتیریل کولین استراز که علاوه بر سرم، در سلول های ژلیال (glial cells) و کبد یافت می شود قادر به هیدرولیز استیل کولین می باشند. ولی در مواردی از قبیل ویژگی سوبسترا، pH مناسب، پراکندگی یا پخش در بدن، تنوع مهار کننده ها با یکدیگر اختلاف دارند (۹). ترکیبات ارگانو فسفره یکی از مهمترین گروههای آفت کش می باشند. این ترکیبات به عنوان حشره کش و به میزان کمتر به عنوان ارگانوفسفره مورد مصرف قرار می گیرند. از آنجا که این ترکیبات از طریق مهار آنزیم استیل کولین استراز (AChE) عمل می کنند، تعیین فعالیت این آنزیم در گلبول قرمز ویا آنزیم پسودوکولین استراز در سرم یا پلاسما مطمئن ترین و گسترده ترین شاخص

بیولوژیک برای تماس انسان با سموم ارگانو فسفره می باشد (۹). در مقالات به منظور بررسی میزان تماس انسان با ترکیبات ارگانوفسفره از دو روش کلی استفاده شده است: در روش اول حشره کش و یا علف کش به شکل سالم و دست نخورده یا متابولیت های آنها در خون یا ادرار مورد تجسس قرار می گیرد و در روش دوم اثرات بیولوژیک اولیه ناشی از مواجهه با سموم بررسی می گردد (۹). روش رنگ سنجی المن عموماً روش ارجح در مانیتور نمودن بیماران مسموم شده با حشره کش ها می باشد.گرچه این روش سریع، ساده و ارزان می باشد ولی از مشکلات این روش تداخل جذب هموگلوبین با جذب TNB- (آنیون ۳- کربوکسی-۴-نیترو بنزن تیولات) معرف رنگی اندازه گیری AChE می باشد.برای حل این مشکل از موادی مانند هیامین استفاده می شود که جذب معرف رنگی را به طول موج بالاتر انتقال داده اما چندان موجب افزایش طول موج جذبی هموگلوبین نمی شود (۵). از طرفی به جهت تصحیح خطای ناشی از فعالیت BChE در اندازه گیری فعالیت AChE در خون کامل از مهار کننده های انتخابی مختلف از جمله کینیدین (۸) و یا مشتقات فنوتیازین (۱۰) استفاده می شود. استیل کولین استراز اریتروسیت توسط رشته های کلاژن به غشای گلبول قرمز متصل شده است. در تعیین فعالیت این آنزیم ابتدا گلبول قرمز باید با شستشوهای متوالی با سرم فیزیولوژیک با دقت از پلاسما جدا شود تا امکان تداخل آن با کولین استراز سرمی حذف گردد. سپس هیدرولیز گلبول قرمز انجام شده و آنزیم توسط سانتریفیوژ از باقیمانده غشای لیز شده گلبول قرمز جدا گردد. در انجام سنجش فعالیت آنزیم کولین استراز در این مقاله از pH ۷/۴ بجای ۸ که در مقاله Ellman پیشنهاد شده، استفاده گردیده است. در این pH هیدرولیز استیل تیو کولین یداید کاهش می یابد (۱۴).

در مطالعه ما تفاوت میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مردان و زنان شاهد از نظر آماری معنی دار نبود. گزارشاتی وجود دارد که صحت عملیات فوق را اثبات می کنند. در مطالعات دیگر آمده است که تفاوتی در میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در زنان و مردان سالم وجود ندارد اما فعالیت کولین استراز سرمی (بوتیریل کولین استراز) بطور قابل ملاحظه ای در مردان بیشتر است (۹). تفاوت معنی دار آماری میان فعالیت این آنزیم در زنان و مردان کارگر با گروه شاهد ($P<۰/۰۵$) زنگ خطر جدی را برای اصلاح روش سنتی کشت برنج در مزارع به صدا در آورده است. بخصوص در مورد زنان که امکان حاملگی و یا شیر دهی در این زمان نیز وجود دارد. مورد اخیر خود سر فصل مطالعه دیگری با انگیزه اثبات وجود این سموم و تعیین مقدار آنها در نوزادان شیرخوار مادرانی خواهد بود که در این زمان به کار کشاورزی اشتغال دارند.

پیشنهادات:

به منظور کاهش میزان جذب سموم علف کش کشاورزی پیشنهاد می گردد که کارگران در هنگام کار در مزارع از چکمه استفاده نموده و همواره دستکش در دست داشته باشند. رعایت این موضوع از جذب سموم ممانعت خواهد کرد. از طرفی تأکید می شود که بایستی از شروع بکار کارگران قبل از گذشت دو هفته پس از سم پاشی جلوگیری نمود. زیرا بر اساس نیمه عمر این سموم، میزان ترکیبات فوق الذکر (به عبارت دیگر غلظت این سموم) پس از این مدت، نصف خواهد شد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله به جناب آقای دکتر محمد عبدالهی دانشیار گروه سم شناسی دانشکده داروسازی تهران که مستقیماً حق استادی بر هر سه نویسنده این مقاله دارند، تقدیم می شود.

همچنین بدینوسیله از مدیریت محترم سازمان برنامه و بودجه استان مازندران که با پرداخت هزینه های موجود انجام این طرح را امکان پذیر نموده و همچنین معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که با پیگیری های فراوان بستری مناسب را برای انجام این طرح فراهم نموده اند، سپاسگزاری می گردد.

Reference:

1. Abdollahi M.; Biukabadi M.; Ebrahimzadeh MA. *In vitro* inhibition of acetyl cholinesterase activity in human red blood cells by cadmium and lead. Acta Med Iranica, 36(2): 74-8, 1998.

2. Ballantyne B.; Marrs TC. Overview of the biological and clinical aspects of oregano phosphates and carbamates. In: Ballantyne B.; Marrs TC. Clinical and experimental toxicology of oregano phosphates and carbamates: From Butterworth & Heinemann. Oxford: UK, 3-14, 1992.

3. Devi M.; Fingerman M. Inhibition of acetyl cholinesterase activity in the CNS of red swamp crayfish by Mercury, Cadmium and Lead. Bull Environ Contam Toxicol, 55: 746-50, 1995.

4. Ellman GL.; Courtney KD.; Andres V.; Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetyl cholinesterase activity. Biochem Pharmacol, 7: 88-95, 1961.

5. George PM.; Abernethy MH. Improved ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. Clin Chem, 29(2): 365-8, 1983.

6. Holmstedt B. Pharmacology of organ phosphorous cholinesterase inhibitors. Pharmacol Rev, 11: 567-88, 1959.

7. Kocabiyik N.; Tuncok Y.; Guven H.; Ates M. Cholinesterase activity in agricultural workers exposed to organophosphates. Book of Abstracts EUROTOX 95. Toxicol Lett Suppl, 1(78): 47, 1995.

8. Magnotti RA.; Dowling K.; Eberly JP. Field measurement of plasma and erythrocyte cholinesterase. Clin Chim Acta, 315: 315-32, 1988.

9. Maroni M.; Colosio C.; Ferioli A.; Fait A. Organ phosphorous pesticides. Toxicology, 143: 9-37, 2000.

10.Meuling WJA.; Jongen MJM.; Van Hemmen JJ. An automated method for the determination of acetyl and pseudo cholinesterase in hemolyzed whole blood. Am J Ind Med, 22: 231-41, 1992.

11.Omer-Vev ST.; Rottinghause GE. Biomedical determination of cholinesterase activity in biological fluides and tissues. In: Ballantyne B.; Marrs TC. Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates: From Butterworth & Heinemann. Oxford: UK, 15-27, 1992.

12.Sramek J.; Cutler N. RBC Cholinesterase inhibition: a useful surrogate marker for cholinesterase inhibitor activity in Alzheimer disease therapy? Alzheimer Dis Assoc Disord, 14(4): 216-27, 2000.

13. Wilson BW.; Sanborn JR.; O'malley MA. Monitoring the pesticide worker. Occup Med, 12: 347-63, 1997.

14. Worek F.; Mast U.; Kiderlen D.; Diepold C.; et al. Improved determination of acetyl cholinesterase activity in human whole blood. Clin Chim Acta, 288: 73-90, 1999.

تاریخ دریافت مقاله: ۸۲/۹/۱۵

تاریخ تأئید نهایی: ۸۳/۷/۵