مقاله پژوهشی

مطالعه اثر ضدباکتریایی ۴ عصاره گیاهی دارچین ، زیره سیاه ، رازیانه و شوید بر روی هلیکوباکترپیلوری به روش دیسک دیفیوژن و فلوسیتومتری

پروانه رنجبریان* ، دکتر سیاوش صادقیان ، دکتر محمدحسن شیرازی *** ، دکتر عبدالفتاح صراف نژاد****
دکتر محمدرضا فاضلی***** ، دکتر غلامرضا امین****** ، دکتر امیر مجلسی*******
مهندس خسرو مانی کاشانی******** ، مسعود کورکی********

چکیده:

هلیکوباکتر پیلوری به عنوان عامل ایجاد کننده زخم پپتیک و سرطان معده شناخته شده است. عفونت مجدد و عدم پاسخگویی به درمان ریشه کنی مشکلات اصلی در روند معالجه بیماران می باشد. گیاهان بعلت داشتن موادی با اثر درمانی یکی از مهمترین منابع درمانی بسیاری از بیماریها محسوب میشوند. با توجه به اهمیت موضوع، مطالعه حاضر طرح ریزی گردید که در طی آن میزان حساسیت هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران نسبت به ٤ عصاره گیاهی دارچین ـ زیره سیاه - رازیانه - شوید و آنتی بیوتیکهای آموکسی سیلین ـ تتراسیکلین و سیپرو فلوکساسین مشخص گردد.

١٤ سویه هلیکوباکتر پیلوری بدست آمده در جریان اندوسکوپی از ۳۰ بیمار از لحاظ حساسیت به دارچین- زیره سیاه- رازیانه – شوید و آنتی بیوتیکهای آموکسی سیلین – تتراسیکلین و سیپرو فلوکساسین با روش دیسک دیفیوژن و فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفتند.در تجزیه وتحلیل اطلاعات از آزمون ناپارامتریک Cochranاستفاده شدو به منظور مقایسات دو به دوئی بین گروه های مختلف عصاره های گیاهی از آزمون Mcnemar با اصلاح Bonferroni نیز بهره گرفته شد.

از ١٤ سویه هلیکوباکتر پیلوری، ١٤ مورد (١٠٠٪) به عصاره شوید، ١١ مورد (٧٨/٦٪) به عصاره زیره سیاه، ٩ مورد (٦٤/٣٪) به عصاره رازیانه و ۶ مورد (٤٢/٩٪) به عصاره دارچین حساسیت نشان دادند. همچنین در تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی، ١٤ مورد (١٠٠٪) به آموکسی سیلین مقاوم و ١٤ مورد (١٠٠٪) به تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین حساس بودند.

با استفاده از روش دیسک دیفیوژن نشان داده شد که هر ٤ عصاره گیاهی دارای اثر ضد باکتریایی روی هلیکوباکتر پیلوری هستند و در مقایسه تاثیر ٤ عصاره مشخص شد که شوید و رازیانه بیشترین تاثیر ممانعت کنندگی را روی هلیکوباکتر پیلوری دارند.

کلید واژه ها : آنتی بیوتیکها / گیاهان شفابخش / هلیکوباکتر پیلوری

---

* کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
*** استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
**** دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
***** استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران
****** استادیار گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران
******* استادیار گروه داخلی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
******** عضو هیأت علمی گروه پزشکی اجتماعی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
********* کارشناس مسئول اطلاع رسانی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

مقدمه :

هلیکوباکترپیلوری یکی از شایع ترین عوامل عفونی در انسان است و گفته می شود بیش از ۵۰ درصد از مردم دنیا میزبان این باکتری هستند(۱). این باکتری بعنوان عامل زخم پپتیک و سرطان معده معرفی شده است (۲،۳).

از مشکلات بیماران، عفونت مجدد و عدم پاسخگویی به درمان ریشه کنی بعلت تبدیل باکتری به فرم کوکوئید و محل اقامت باکتری در زیر لایه ترشحات مخاطی معده است این امر تاثیر و دسترسی عوامل ضد میکربی را محدود می سازد. بسیاری از متخصصین راه مناسب را استفاده از گیاهان دارویی می دانند اهمیت گیاهان دارویی در این است که علاوه بر ماده موثره اصلی دارای موادی با اثر درمانی هستند که ضمن تشدید اثر درمانی گیاه در بسیاری از موارد می توانند از سمیت و اثرات ناخواسته آن جلوگیری نمایند. امروزه اثرات ضد میکربی بسیاری از گونه های گیاهی بر روی هلیکوباکترپیلوری از جمله چای سبز و سیاه، آویشن، مرزنجوش، سیر، شیرین بیان، مریم گلی، مورد، افسنطین، اسفند، شیطان زیتون، گلپر، نعناع، بومادران، بابونه، رزماری و... مورد بررسی قرار گرفته است (۸-۴).

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره های گیاهی همانند آنتی بیوتیکها به روش های مختلف انجام می شود در این مطالعه جهت بررسی میزان حساسیت باکتری نسبت به عصاره های گیاهی و آنتی بیوتیکها از روش دیسک دیفیوژن و به منظور تعیین زنده بودن باکتری بعد از تاثیر عصاره ها و آنتی بیوتیکها از روش فلوسیتومتری استفاده شد. فلوسیتومتری روشی ساده، سریع و دقیق جهت افتراق باکتری زنده از مرده می باشد و حتی میزان زنده بودن (فعالیت و تنفس) باکتری را مشخص می کند. در این روش، باکتری در مجاورت رنگ رودامین (ماده فلورسانس) قرار گرفته و در صورت زنده بودن، رنگ را جذب کرده و باکتری خاصیت فلورسانس پیدا می کند پس از این با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر می توان باکتری فلورسانس شده را شناسایی و شمارش کرد. بدین ترتیب می توان تاثیر عوامل دارویی را بر حیات باکتری به راحتی و به سرعت و دقت مورد مطالعه قرار داد(۹،۱۰).

روش کار:

نمونه های هلیکوباکترپیلوری از بیماران با ناراحتی دستگاه گوارش که مورد اندوسکوپی قرار گرفته بودند جدا شدند. نمونه های بدست آمده روی محیط پایه کمپیلوباکتر به همراه ۷-۵٪ خون گوسفند – ۷٪ سرم اسب- ۲ mg/l آمفوتریسین B-mg/l ۱۰ وانکومایسین- ۵ mg/l تری متوپریم و ۰/۲۵ mg/l پلی مکسین B کشت داده شد(۱۱). بعد از ۴-۳ روز در جار بی هوازی با گازپک C و حرارت 37° C ، کشتهای بدست آمده تحت آزمایش حساسیت به عصاره ها و آنتی بیوتیکهای تتراسیکلین ، آموکسی سیلین و سیپروفلوکساسین با روش دیسک دیفیوژن و فلوسیتومتری قرار گرفتند.

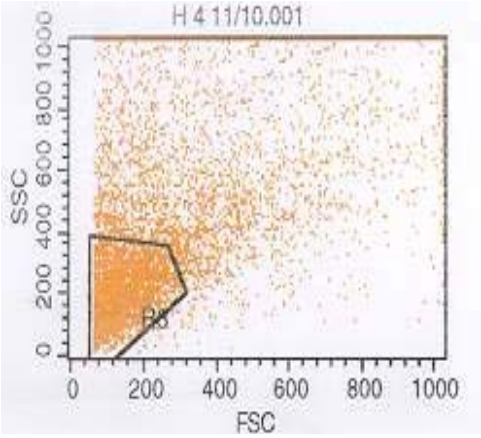
۴ عصاره گیاهی به روش پرکولاسیون تهیه گردید سپس غلظتهای ۰/۰۱-۰/۰۲- ۰/۰۴- ۰/۰۸-۰/۱-۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در میلی لیتر از هر ۴ عصاره گیاهی در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) تهیه و ۳۰ میکرولیتر از هر یک از غلظتها به دیسکهای بلانک تلقیح گردید. سوسپانسیون میکربی با کدورتی معادل استاندارد ۰/۵ MacFarland درمحیط BHIb (Brain-Heart infusion broth) تهیه شد سپس از این سوسپانسیون بصورت فشرده روی محیط مولرهینتون آگار خون دار کشت داده شد از دیسک حاوی DMSO به عنوان شاهد منفی و دیسک تتراسیکلین بعنوان شاهد مثبت استفاده گردید. دیسکهای عصاره های گیاهی و دیسکهای شاهد مثبت و منفی روی محیط کشت با رعایت شرایط استاندارد چیده شد.

بعد از دوره انکوباسیون ۴-۳ روز و شرایط میکروآئروفیلیک و دمای 37° C محیطهای کشت مورد بررسی قرار گرفت. آنتی بیوگرام با آنتی بیوتیکهای تتراسیکلین – آموکسی سیلین و سیپروفلوکساسین نیز انجام شد.

در روش فلوسیتومتری، تاثیر هر۴ عصاره باغلظتهای ذکر شده در روش دیسک دیفیوژن روی ۱۴ سویه هلیکوباکترپیلوری بررسی شد سوسپانسیون میکربی با کدورتی معادل استاندارد ۱ MacFarLand در محیط BHIb تهیه گردید سوسپانسیون میکربی بدون تاثیر عصاره ها و مواد ضد میکربی بعنوان شاهد مثبت و سوسپانسیون میکربی تحت تاثیر هیپوکلریت سدیم ۵٪

به عنوان شاهد منفی تهیه گردید. در ضمن تاثیر دو محلول آنتی بیوتیک تتراسیکلین بعد از افزودن به سوسپانسیون میکربی با غلظت نهایی ۱۰۰-۱۵۰-۳۰۰-۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین با غلظت نهایی ۱۰۰- ۵۰-۲۵-۱۲/۵-۶/۵-۳-۱/۵ میکروگرم در میلی لیتر بر روی هلیکوباکترپیلوری موردمطالعه قرار گرفت. زمان در معرض قرارگیری باکتری با عصاره ها و آنتی بیوتیکها ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد بعد از زمان در معرض قرار گیری، همه لوله ها ۲ بار با معرف PBS در دور ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه شسته شدند سپس به رسوب حاصل ۲ml رودامین (۲μg/ml) (Rhodamin 123 Sigma) cat R 8004 همراه با EDTA، (PH=8،1mM) اضافه شد(۱۲). و بعد از یک دوره انکوباسیون ۳۰ دقیقه ای در دمای آزمایشگاه و تاریکی، یکبار شستشو با معرف PBS انجام شد و فرمالین ۱۰٪ بعنوان Cellfix به رسوب بدست آمده اضافه گردید.در تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون ناپارامتریک Cochran استفاده شد و به منظور مقایسات دوبه دوئی بین گروه های مختلف عصاره های گیاهی از آزمون Mcnemar با اصلاح Bonferroni بهره گرفته شد.

دستگاه فلوسیتومتر: از دستگاه coulter مدل FACSCalibur استفاده شد. نور دستگاه توسط لیزر آرگن با طول موج ۴۸۸ نانومتر تامین شده است سلولهای نشاندار بعد از ورود به دهانه فلوسیتومتر توسط غلافی از ایزوتون در بر گرفته می شوند سپس یکی یکی از میان پرتو لیزر عبور کرده و هرسلول نور فلورسانس ایجاد می کند و باعث پراکندگی نور نیز می گردد فوتونهای نور پراکنده و نور فلورسانس به پالسهای الکترونیکی تبدیل شده و اطلاعات به صورت هیستوگرام نمایش داده می شود. برای دیدن باکتری و تحلیل داده ها از پارامترهای FS (Forward Scater) که نشان دهنده اندازه باکتری است، SS (Side Scater)که نشاندهنده دانسیته باکتری است وFL3 (Fluorescence Light Scater) که نشان دهنده میزان جذب رودامین توسط باکتری است، بهره گرفته شد (۱۳). سرعت عبور باکتری از مقابل لیزر (سرعت جریان در داخل Flow cell) معادل ۵۰۰۰ باکتری در هر ثانیه می باشد(شکل ۱).



شکل ۱ تصویر باکتریها در فلوسیتومتر و رسم gate جهت انتخاب آنها. نقطه‌ها هر کدام نماینده یک باکتری است و منطقه محصور شده در واقع gate رسم شده است که کامپیوتر دستگاه جمعیت داخل آن را برای محاسبات و تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد مطالعه قرار می‌دهد.

نتایج :

در روش دیسک دیفیوژن و تعیین حساسیت به عصاره های گیاهی، قطر هاله مهار رشد بین ۱۲-۸ میلی متر مشاهده گردید. از ۱۴ سویه هلیکوباکترپیلوری جدا شده ۱۴ مورد (۱۰۰٪) به عصاره شوید ۱۱ مورد (۷۸/۶٪) به عصاره زیره سیاه ۹ مورد (۶۴/۳٪) به عصاره رازیانه و ۶ مورد (۴۲/۹٪) به عصاره دارچین حساسیت نشان دادند(جدول ۱).

جدول۱: مقایسه‌میزان‌حساسیت H.p نسبت به عصاره‌های گیاهی در غلظت۰/۵ gr/ml

گروههای مقایسه	حساس		مقاوم		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
شوید	۱۴	۱۰۰	۰	۰	۱۴	۱۰۰
رازیانه	۹	۶۴/۳	۵	۳۷/۵	۱۴	۱۰۰
زیره سیاه	۱۱	۷۸/۶	۳	۲۱/۴	۱۴	۱۰۰
دارچین	۶	۴۲/۹	۸	۵۷/۱	۱۴	۱۰۰

Cochran , P=0.007

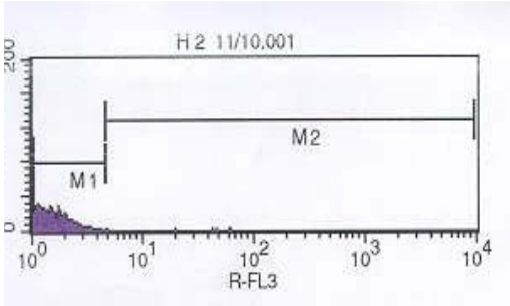
اثر ممانعت کنندگی عصاره های گیاهی در غلظت ۰/۵ g/ml بر H.p در سطح کمتر از ۱ درصد متفاوت از یکدیگر است. تفاوت مشاهده شده بر اساس مقایسه دو به دویی با استفاده از اصلاح Bonferroni بین عصاره

شوید و دارچین در سطح کمتر از ۰/۰۰۸ معنی دار گردید(شکل ۲).

شکل۲: تاثیرضدمیکربی عصاره‌های‌گیاهی‌شوید، رازیانه زیره سیاه، دارچین بر H.p

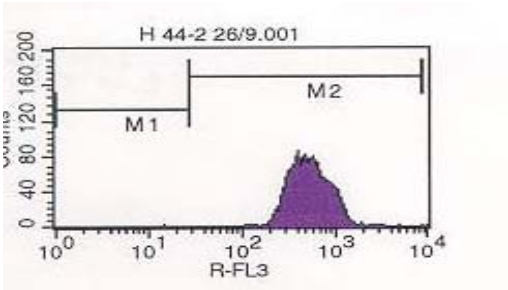
در تاثیر آنتی بیوتیکها در روش دیسک دیفیوژن ۱۴ سویه هلیکوباکترپیلوری (۱۰۰٪) به آنتی بیوتیکهای تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین حساس بودند و هر ۱۴ سویه هلیکوباکترپیلوری (۱۰۰٪) به آموکسی سیلین مقاومت نشان دادند.

در روش فلوسیتومتری، خوانش لوله های کنترل منفی (باکتری کشته شده توسط هیپوکلریت- سدیم ۵٪) نشان داد که ۹۹/۷۹٪ باکتریها کشته شده اند (شکل ۳).



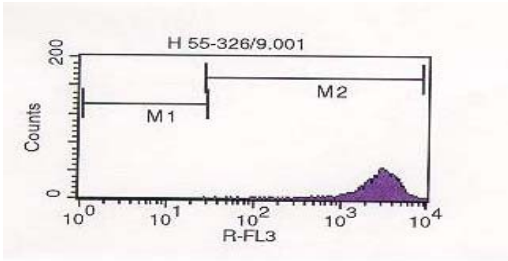
شکل۳: باکتریهای کشته شده توسط هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و عدم رنگ پذیری آنها (کنترل منفی).

خوانش لوله های کنترل مثبت نشان داد که باکتری آنها زنده است و ۹۹/۹۸٪ این باکتریها رودامین را به خود جذب کرده و در منطقه M_2 قرار گرفتند(شکل ۴).



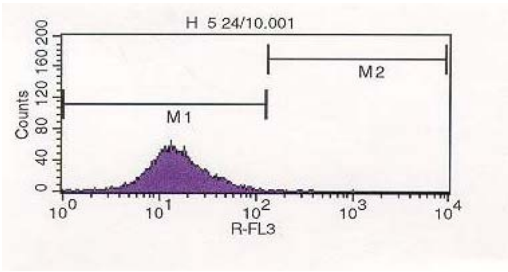
شکل۴: باکتریهای زنده که رنگ رودامین را به خوبی جذب کرده‌اند. (کنترل مثبت)

خوانش لوله های حاوی سوسپانسیونی از هلیکوباکتر پیلوری با 10^8 باکتری در میلی لیتر که تحت تاثیر تتراسیکلین قرار گرفته بودند نشان داد باکتریها زنده مانده و رنگ رودامین را به خوبی جذب کرده اند(شکل۵).



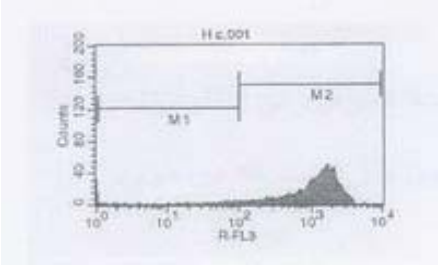
شکل ۵: تاثیر تتراسیکلین بر H.p باکتریهای زنده به خوبی رنگ رودامین را جذب کرده‌اند.

در تاثیر سیپروفلوکساسین تا غلظت ۱/۵ میکروگرم در میلی لیتر باکتریها کشته شده و منحنی هیستوگرام آنها کمترین میزان جذب رنگ را نشان داد(شکل ۶).

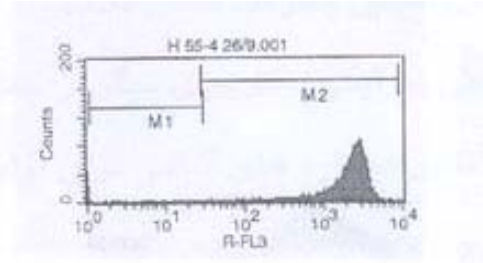


شکل ۶: تاثیر سیپروفلوکساسین بر H.p.باکتریهای کشته شده و عدم رنگ پذیری آنها

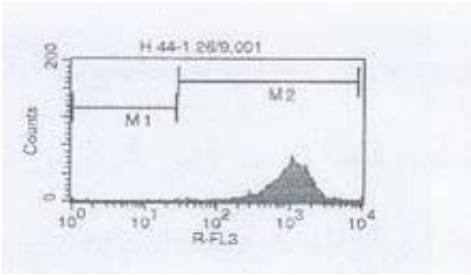
در تاثیر عصاره های گیاهی نشان داده شد که باکتریها زنده اند و منحنی هیستوگرام آنها میزان جذب رنگ بالایی را نشان داد(شکل ۷).



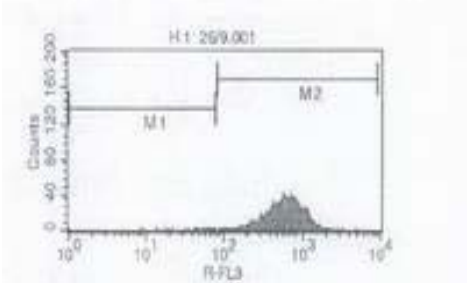
دارچین



زیره سیاه



رازیانه



شوید

شکل ۷: تاثیر چهار عصاره گیاهی بر H.p باکتریهای زنده که رنگ رودامین را به خوبی جذب کرده اند

بحث:

عفونت هلیکوباکتر پیلوری که منجر به زخم پپتیک وسرطان معده میگردد انتشار وسیعی در جهان دارد عفونت مجدد و عدم پاسخگویی به درمان ریشه کنی مشکلات اصلی در روند معالجه بیماران هستند بسیاری از متخصصین بدلیل اهمیت گیاهان به عنوان مهمترین منابع درمان بیماریها، راه مناسب در درمان را استفاده از گیاهان دارویی میدانند با توجه به این اهمیت تاثیر ضد میکروبی ۴ عصاره گیاهی شوید، دارچین، رازیانه، زیره سیاه مورد مطالعه قرار گرفت تحقیقاتی در رابطه با تاثیر شوید ، دارچین روی باکتریها انجام شده است که در این مطالعات این دو عصاره با اثر باکتریوستاتیک معرفی شده اند(۱۶-۱۴). در مطالعه ما با روش دیسک دیفیوژن نشان داده شد که هر ۴ عصاره گیاهی روی هلیکوباکتر پیلوری موثر بوده و با مقایسه نتایج حاصله تاثیر ممانعت کنندگی شوید و رازیانه بیشتر از دارچین و زیره سیاه گزارش گردید. در ضمن با روش فلوسیتومتری توانستیم با کتری های زنده را با رودامین رنگ آمیزی نموده و تفاوت مشخصی را در میزان جذب رنگ توسط باکتری زنده و مرده پیدا کنیم. برای این منظور ابتدا دو نمونه کنترل مثبت (باکتری زنده) و کنترل منفی (باکتری مرده) تهیه نموده و دستگاه فلوسیتومتر را با آنها تنظیم و پروتکل اختصاصی آن را به کامپیوتر دستگاه منتقل کردیم. تاثیر عصاره های گیاهی بر هلیکوباکترپیلوری و بررسی منحنی جذب رنگ نشان داد که باکتری ها زنده هستند و رنگ رودامین را به خوبی جذب کرده اند. با مقایسه نتایج حاصله از خوانش لوله های تحت تاثیر آنتی بیوتیکهای تتراسیکلین (زنده بودن باکتریها و رنگ پذیری آنها) و سیپروفلوکساسین (عدم رنگ پذیری باکتریها) مشخص شد که عصاره های گیاهی همانند تتراسیکلین دارای اثر ممانعت کنندگی از رشد هلیکوباکترپیلوری (باکتریوستاتیک) هستند. لازم به ذکر است سیپروفلوکساسین آنتی بیوتیکی با اثر باکتریسیدال می باشد. شایان ذکر است که پس از تاثیر شوید اگر چه باکتریها کشته نشده اند ولی میزان تنفس باکتری به میزان قابل توجهی کاهش یافته است (حدوداً ۵۰٪ کمتر شده است) .

در حساسیت به آنتی بیوتیکها در تحقیقات انجام شده مقاومت هلیکوباکتر پیلوری به تتراسیکلین مشاهده نشده است (۱۸ ، ۱۷)، در این تحقیق نیز ۱۰۰٪ باکتریها به تتراسیکلین حساسیت نشان دادند. در رابطه با آموکسی سیلین بر اساس مطالعات انجام شده میزان مقاومت ۷درصد گزارش شده است (۱۸، ۱۷)، در این تحقیق هر ۱۴ سویه هلیکوباکتر پیلوری به آموکسی سیلین مقاومت نشان دادند.

اگر چه فلوسیتومتری برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی باکتریهای دیگر از جمله هموفیلوس انفلوانزا – انتروکک- Ecoli بکار رفته است ولی گزارش تاثیر

عصاره های گیاهی برای اولین بار است که در مورد هلیکوباکتر پیلوری اجرا و ارائه گردیده است.

بدیهی است با آنالیز و استخراج مواد موثره در گیاهان ضمن تهیه استاندارد برای اندازه قطر هاله مهار رشد می توان به نتایج بهتری نیز دست یافت همچنین با استفاده از روش فلوسیتومتری به عنوان روشی حساس، دقیق و سریع می توان در مدت کوتاهی تعداد زیادی باکتری، مقاومت و حساسیت آن را در برابر عوامل مختلف دارویی مورد مطالعه و تجزیه و تحلیل قرار داد.

منابع :

1. Brown LM. H.pylori : epidemiology and routes of transmission. Epidmiol Rev 2000; 22(2): 283-97.
2. Mobley HLT, Mendz GL. Hazell SL. Helicobacter pylori. Washington DC: ASM , 2001: 481-85.
3. Kato S. epidemiology and clinical role of childhood H.pylori infection. Nippon Rinsho 2001. Feb; 59(2): 337-41.
4. Cellini L, Di Campli E, Masulli M, Di Bartolomeo S, Allocat N . Inhibition of H.pylori by garlic extract. FEMS Immunol Med Microbiol 1996;13: 273-277.
5. Tabak M, Armon R, Potasman I, Neeman I. In vitro inhibition of H.pylori by extracts of thyme. J APPI Bacteriol 1996; 80 (6) : 667-674.
6. Yousef RT, Tawil GG. Antimicrobial activity of volatile oils. Pharmazie 1980; 35 (11): 698-701.

۷. اژه ئیان ژ. بررسی اثر ۵ گیاه بومی ایران روی H.pylori پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و دانشکده داروسازی دانشگاه تهران ، ۱۳۷۹.

۸. خواجه کرم الدینی م ، فضلی بزاز. تاثیر عصاره شیرین بیان بر روی H.pylori به روش دیسک دیفیوژن. سومین کنگره میکروبیولوژی ایران، همدان ، ۱۳۷۹.

9. Colvin RB, Bhan AK, Mccluskey RT. Diagnostic Immunopathology. New York: Raven , 1994: 725-47.
10. Macey MG. Flow cytometry clinical application. London; Blackwell, 1994: 284-288.
11. Goodwin CS, Armstrong JA. Transfer of campylobacter pylori. Int Syst Bacteriol 1989; 39: 397-405.

۱۲. صراف نژاد ع ، نورعلی ف. فلوسیتومتری روشی سریع و دقیق برای افتراق هلیکوباکترپیلوری زنده از مرده. حکیم. سال پنجم، شماره ۲، ۱۳۸۱: ۱۰۳-۹۹.

13. Burtis CA, Ashwood ER. Textbook of clinical chemistry. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999: 104-106.
14. Nir Y, Potasman I, Stermer E, Tabak M, Neeman I. Controlled trial of the effect of cinnamon extract on H. pylori. Helicobacter 2000 Jun; 5(2): 94-97.
15. Smith PA, Steuart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett Appl Microbiol1998 Feb; 26(2): 118-122.
16. Tirranen LS, Borodina EV, Ushakova SA , Rygalov VY, Gitelson JI. effect of volatile metabolites of dill, radish and garlic on growth of bacteria. Acta Astronaut 2001 Jul; 49(2): 105-108.
17. Wolle K, Leodolter A, Malfertheiner P, Konig W. Antibiotic susceptibility of H. pylori in Germany, Stable primary reisistance from 1995 to 2000. J Med Microbial 2002; 51: 705-709.

۱۸. سیاوشی ف ، پورخواجه ع. تعیین میزان حساسیت سوش های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران ایرانی نسبت به آنتی بیوتیکهای منتخب. گوارش. شماره ۲۴و۲۳ ، ۱۳۷۹: ۱۴۷-۱۴۳.