

Klorprifos-etil'in HEPG2 hücre dizilerinde hücre canlılığına etkisi ve melatoninin koruyucu etkisi

Sultan Patat*, Hakan Akça**, Süleyman Kaleli***,
İnanç Karakoyun*, Ahmet Koçak****, Fatih Gültekin*

* Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, Isparta

** Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Denizli

*** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta Sağlık Yüksek Okulu, Isparta

**** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Isparta

Özet

Klorprifos-etil (KE), yaygın olarak kullanılan organofosfat insektisitlerden biridir. Bu çalışmada, KE'in insan karaciğer hücre dizisi HepG2 üzerine sitotoksik etkisini ve melatoninin koruyucu etkisini araştırdık.

Çalışma grupları şu şekilde organize edildi:

1. Kontrol grubu (Diğer grupların canlılık oranları bu gruba göre değerlendirildi.)
2. KE grubu (Değişik dozlarda KE ile muamele edildi.)
3. Melatonin+ KE grubu (Değişik dozlarda KE'ye ek olarak melatonin eklendi.)

Hücreler 96 well petri kaplarına her well'de 3×10^5 olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra KE grubundaki hücreler 1080, 540, 270, 135, 67.5, 33.7, 16.8, 8.4, 4.2, 2.1, 1 ve 0.5 mikrogram/ml0 konsantrasyonlarında KE ile 72 saat 37 °C'de inkübe edildiler. Melatonin+KE grubundaki HepG2 hücreleri ise 1 saat 10 mg/l konsantrasyonunda melatonin ile ön inkübasyona alındıktan sonra değişen KE konsantrasyonları ile 72 saat muamele edildiler. Daha sonra KE ve KE+M gruplarında hücre canlılığı belirlendi.

KE verilen HepG2 hücrelerinin canlılığı kontrol grubundaki hücrelere oranla anlamlı olarak düşük bulunmuştur. KE'nin sitotoksitesitesi uygulanan KE konsantrasyonuyla ilişkili bulunmuştur. KE konsantrasyonu düştükçe sitotoksitesite de buna paralel olarak azalmıştır (Kruskal-Wallis Test $p=0.024$). Buna ek olarak çalışmamızda melatoninle bir saat inkübe edilen HepG2 hücrelerine KE uygulaması melatonin uygulanmayan gruba oranla hücre canlılığını anlamlı olarak artmıştır (Mann Whitney U Test, $p<0.05$).

Sonuç olarak KE'in insan karaciğer hücre dizisi HepG2 üzerine in vitro şartlarda uygulanmasıyla, bu hücreler üzerinde anlamlı olarak sitotoksik etki gösterdiği, melatonin uygulanması ise karaciğer hücre dizilerini klorprifos-etil sitotoksitesitesinden önemli derecede koruduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: organofosfat, klorprifos, hücre kültürü, HepG2, melatonin.

Abstract

The effect of chlorpyrifos-ethyl on cell viability in HEPG2 cell lines and protective role of melatonin

Chlorpyrifos-ethyl (CE) is one of the organophosphate insecticides which are commonly used. In this study, we investigated the cytotoxic effect of Chlorpyrifos-ethyl onto HepG2 liver cells and melatonin's protecting effect. The working groups were arranged as shown:

1. Control group (Other group's viability percentage were evaluated comparing to this group)
2. CE group (The treatment was made with different dosages of CE)
3. M+CE group (Melatonin was added to the different dosages of CE)

HepG2 cells were seeded in 96-well plates (3×10^5 cells/well). Each of 3×10^5 cells were put into 96 well Petri cups. After 24 hours the cells in CE group were incubated with Chlorpyrifos-ethyl with the doses of 1080, 540, 270, 135, 67.5, 33.7, 16.8, 8.4, 4.2, 2.1, 1 and 0.5 microg/ml in 37°C for 72 hours. On the other hand, the HepG2 cells in the M+CE group were pre-incubated with melatonin with the dose of 10 mg/l for an hours and were handled with the changing CE concentration for 72 hours. After that, the cell viability of CE and M+CE groups were established.

The viability of HepG2 cells in CE treated group was found lower than the cells which were chosen to control. This was found related to the CE concentration. As the Chlorpyrifosethyl concentration decreases the cytotoxic rate decreases (Kruskal-Wallis Test $p=0.024$). The viability of the HepG2 cells incubated with melatonin for one hour before the CE application found to increased (Mann Whitney U Test, $p<0.05$).

As a result; it was concluded that when CE was superimposed onto HepG2 liver cell series in in vitro conditions, it showed significantly cytotoxic effect, and melatonin protected the liver cells from the cytotoxic effect of CE.

Keywords: Organophosphate, chlorpyrifos, cell-culture, HepG2, melatonin

Giriş

Klorprifos-etil (KE; 0,0'- diethyl 0- [3,5,6 - trichloro-2- pyridyl] phosphorothionate), bahçe, tarım ve orman zararlılarına karşı yaygın olarak kullanılan dolayısı ile insanların sıkça maruz kaldığı bir organofosfat insektisittir (1). Klorprifos-etil'in metabolitleri, klorprifos-okson ve 3,5,6-trikloro-2-pridinol klorprifos'dan daha toksiktir (1-2). KE'in metaboliti, klorprifos-okson sinir kavşaklarında asetilkolin esterazı inhibe ederek ciddi bir kolinerjik toksisite oluşturur (3-4). İn vivo ve in vitro deneysel çalışmalarda, akut ve kronik organofosfat uygulamalarının sonucu ortaya çıkan toksik etkilerin (hepatotoksisite, nörotoksisite, genetik toksisite, embriyotoksisite, immünotoksisite gibi) patogenezinde oksidatif doku hasarının rol oynadığı ortaya konulmuştur (5-6).

Serbest radikaller, özellikle DNA ve protein ve hücre fosfolipitlerinin çoklu doymamış yağ asitleri başta olmak üzere bir çok organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girerler. Özellikle DNA'yı etkileyen serbest radikaller önemli zararlara neden olurlar. Bu zararlar da karsinojenik mutasyonlara neden olabilmektedir (7).

Karsinojenik ksenobiyotikler, hücre içindeki sitokrom p450, peroksizomlar ve mitokondriyondaki enzimatik sistemleri değiştirerek veya indükleyerek serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Bu serbest radikaller hücreyi koruyan enzimatik veya enzimatik olmayan sistemlerin tükenmesine veya inhibisyonuna yol açmaktadırlar. Tüm bu etkilerin sonucunda oluşan oksidatif hasar, hücrede lipit peroksidasyonu, deoksiribonükleik asit hasarı veya protein değişikliklerine yol açmaktadır. Bunlar da azalmış gap junction aracılıklı haberleşme, transkripsiyon faktörlerinin (AP- 1, NF-kB) aktivasyonu, intraselüler kalsiyum ve pH değişiklikleri veya hücre ölümü gibi hücre fonksiyon bozukluklarına yol açabilmektedir (6).

Vücutta reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için birçok savunma mekanizması bulunmaktadır. Bunlar, "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak adlandırılmaktadırlar. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe ederler ve enzim yapılı olanlar ve olmayanlar şeklinde sınıflandırılırlar (9,10).

Melatonin güçlü bir antioksidan etkisi olan bir maddedir. Özellikle en zararlı serbest radikallerden birisi olan 'hidroksil radikali' (OH) ile reaksiyona girerek, onu indolil katyonuna dönüştürerek etkisizleştirmektedir (11). Bir grup araştırmacı melatoninin LOO radikalini de nötralize etme yeteneğinde

olduğunu bildirmişler. Pieri ve ark.'larının melatonin LOO toplama yeteneklerine bakmışlar ve suda çözünen E vitamini , C vitamini ve GSH ile karşılaştırmışlar. Buna göre nötralize yeteneği en fazla melatoninde sonra suda çözünebilen E vitaminin de daha sonra ki sırayı ise C vitamini ve GSH almıştır. Melatonin diğer antioksidanlardan bir farkı uzun süreli kullanıldığında bile toksik etkisini olmamasıdır (12).

Bu araştırmanın amacı tarım alanında insektisit olarak sıklıkla kullanılan ve uygunsuz kullanımda oldukça toksik olan KE'in, in vitro ortamda insan karaciğer hücre dizileri Hepatoma G2 üzerine olan sitotoksik etkisini ve melatonin uygulanmasının bu sitotoksisite üzerindeki olumu etkilerini gösterebilmektir.

Materyal ve Method

Hücre Canlılığının Ölçülmesi

Çalışma grupları şu şekilde organize edildi: 1. Kontrol grubu (Diğer grupların canlılık oranları bu gruba göre değerlendirildi) 2. KE grubu (Değişik dozlarda KE ile muamele edildi) 3. M+KE grubu (Değişik dozlarda KE'ye ilave olarak melatonin eklendi)

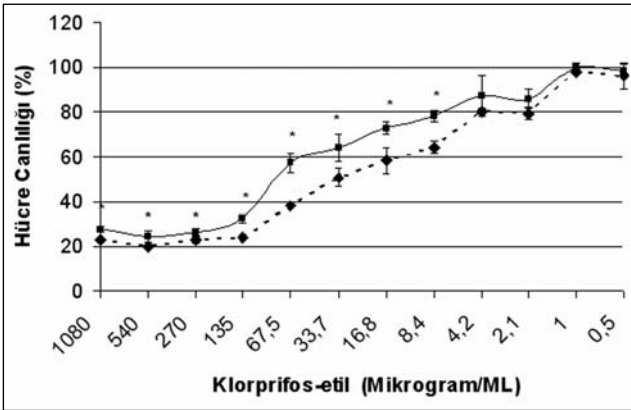
İnsan HepG2 Hücre dizileri Dr. Hakan Aydın (Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye)'dan sağlanmıştır. Hücreler %10 FBS, 2 mM Glutamin ve penicillin-streptomycin içeren DMEM besi ortamında inkübe edildiler. Hücreler 96 well petri kaplarına her well'de 3×10^5 olacak şekilde ekildiler. 24 saat sonra KE grubundaki hücreler KE (1080, 540, 270, 135, 67.5, 33.7, 16.8, 8.4, 4.2, 2.1, 1 ve 0.5 mikrogram/ml) ile 72 saat 37 oC'de inkübe edildiler. M+KE grubundaki HepG2 hücreleri ise 1 saat (10 mg/l konsantrasyonunda melatonin olacak şekilde önceden hazırlanmış Mel+ DMEM karışımından 100 mikrolitre eklendi.) melatonin ile ön inkübasyona alındıktan sonra değişen KE konsantrasyonları ile 72 saat muamele edildiler. İnkübasyon süresinin sonunda besi ortamı hücreler üzerinden uzaklaştırılarak yerine 0.5% crystal-violet (W/V : in 50 % methanol) solüsyonu kondu ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Daha sonra hücrelerin absorbe ettiği boya Na-citrate (0.1 M Na-citrate in 50% ethanol pH: 4.2) tamponuyla dışarı çıkartılarak absorbansı 640 nm' de okutuldu ve kontrol oranla grafiği çizildi.

İstatistik

Konsantrasyonlara bağlı hücre canlılığındaki değişimi değerlendirmek için Kruskal Wallis testi, melatonin ve kontrol grupları arasında hangi klorprifos-etil konsantrasyonlarında anlamlı farklılık olduğunu belirlemek içinde Mann-Whitney U testi uygulandı.

Bulgular

Kontrol ve deney grubu HepG2 hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği Şekil 1'de verilmiştir. Şekil 1'de görüldüğü gibi yüksek doz KE ile muamele edilen gruplarda hücre canlılığı düşük doz KE gruplarındaki hücrelerin canlılık oranlarına göre daha düşüktür. Hem KE grubunda hem de M+KE grubunda KE konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır. (Kruskal-Wallis Test, KE grubu için $p=0.024$, M+KE grubu için $p=0.028$). Hücreler bir saat melatoninle ön inkübasyona alındıktan sonra KE ile muamele edildiklerinde, KE'in sitotoksik etkisini melatonin kombinasyonunun düşürdüğü saptanmıştır. Grafikte görüldüğü gibi 8.4 mikrogram/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda melatonin hücre canlılığını anlamlı olarak arttırmıştır (Mann-Whitney U Testi, $p<0.05$).



Şekil 1 : Değişik konsantrasyonlardaki KE hücre canlılığına etkisi.

KE: Klorprifos-etil, M+KE: Melatonin + Klorprifos-etil. *: KE ve M+KE grupları karşılaştırıldığında anlamlı gruplar, $p<0,05$, Mann-Whitney U testi.

Tartışma

KE ve metabolitlerinin insan ve çeşitli hayvan türlerinde hepatotoksik, nörotoksik tirotoksik, embriyotoksik etkileri gösterilmiştir. Ayrıca bu maddelerin hematolojik, immünolojik, ve genital sistem üzerine de toksik olduklarını bildiren yayınlar bulunmaktadır (1,4,5,13,14,15). KE'in desülfürasyonu ile ortaya çıkan daha aktif ve toksik bir metabolit olan klorprifos-oxon (16), A-esteraz ve alinesteraz enzimleri aracılığıyla detoksifiye edilebilmektedir. Sprague-Dawley sıçanlarında yapılan çalışmalarda A-esteraz ve alinesteraz detoksifikasyon enzimlerinin en yüksek oranda karaciğerde, böbrek ve akciğerlerde orta düzeyde ve beyin, dalak ve iskelet kasında ise az derecede bulunduğu gösterilmiştir (8,10,16). Bu durum KE'un başlıca karaciğer, böbrek ve akciğerde detoksifiye edildiğini açıklamaktadır.

Sultatos, yaptığı çalışmada KE'a maruz kalan erkek sıçan karaciğerlerinin dişilerden daha fazla klorprifos-oxon ürettiklerini fakat KE akut toksitesinin dişilerde daha fazla olduğunu saptanmıştır (17).

Bizim çalışmamızda KE verilen HepG2 hücreleri can-

lılığı kontrol grubu olarak seçilen hücrelere oranla doza bağlı olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. KE konsantrasyonu düştükçe sitotoksosite de buna paralel olarak azalmıştır. Li ve Arkadaşlarının hücre kültürleri üzerinde yaptığı çalışma bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir (18). Bu araştırmacılar KE'in hücre dizileri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik olduğunu rapor etmişlerdir. Fakat yapılan literatür araştırmasında KE insan karaciğer hücre dizisi HepG2 üzerindeki etkilerini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Antioksidan bir madde olan melatonin oldukça lipofildir. Bu özelliğinden dolayı da hücre membranını kolayca geçebilir. Ayrıca, melatonin suda erime yeteneği de yüksektir ve sitoplazma ve çekirdek içindedeki kolayca taşınabilir. Çekirdeğe bağlanarak DNA'yı yerinde koruyucu etki gösterir (19). Tan. ve ark. (20), iki rapor serisinde melatoninin hepAtik nükleer DNA'yı kimyasal karsinojen safrol tarafından oluşturulan oksidatif hasara karşı koruduğunu bildirmişlerdir. Pentney ve Bubenik (21), fareleri dekstran sodyum sulfatla (DSS) besleyerek kolit oluşturmuşlardır. DSS gastrointestinal yolda gram negatif bakterilerin proliferasyonunu artırır; lipopolisakkarit endotoksininin yaygın üretimine sebep olur ve intestinal mukoza bütünlüğündeki değişikliklerle beraber ciddi diyareye sebep olur. Farelere DSS'ye ilaveten melatonin de verildiğinde ise kolit bulgularının önemli derecede azaldığını rapor etmişlerdir.

Öncü ve ark. (22) ratlara KE vererek yaptıkları çalışmada, KE verilen ratların karaciğerlerinde sinüzoidal dilatasyon, piknotik çekirdekçikler ve safra kanalı proliferasyonu gözlenirken, KE+melatonin verilen ratlarda bu bulguların normale döndüğünü gözlemlemişlerdir. Yine bu çalışmada KE'nin lipid peroksidasyonunu artırdığını melatoninin ise bu artışı engellediğini göstermişlerdir. Buldukları bulgulardan hareketle, KE'nin rat karaciğer dokusunda oksidatif strese neden olduğu, bu oksidatif stresin KE hepatotoksitesinde rol oynayabileceği ve melatoninin KE'nin karaciğer üzerine toksik etkilerini fark edilir derecede azaltabileceği kanaatine varmışlardır.

Gültekin ve ark. (23-28) yaptıkları bir dizi çalışmada eritrosit, böbrek, akciğer ve beyin dokularında KE'nin lipid peroksidasyonunu artırdığını göstermişlerdir. Bu dokularda melatonin verilmesiyle lipid peroksidasyonunun azaldığını, dolayısıyla doku hasarının azaldığını histopatolojik olarak ortaya koymuşlardır. Melatoninin bu iyileştirici etkisini ise antioksidan özelliğine bağlamışlardır.

Bizim çalışmamızda da melatoninle bir saat inkübe edilen HepG2 hücrelerine KE uygulaması melatonin uygulanmayan gruba oranla hücre canlılığını anlamlı olarak artırmıştır.

Bu çalışmada melatoninin hangi mekanizma ile hücre canlılığını artırdığı ortaya koyulmamıştır. Ancak literatür bilgileri ışığında değerlendirildiğinde melatoninin antioksidan özelliği bu olumlu etkiyi gösterdiği kanaatine varılabilir. Ancak bunun daha kesin söylenebilmesi için ilave parametrelerin çalışılmasına ihtiyaç vardır. Belki bu ikinci bir çalışma konusu olabilir.

Sonuç olarak, KE'in insan karaciğer hücre dizisi HepG2 üzerine in vitro şartlarda uygulandığında, bu hücreler üzerinde aşırı derecede sitotoksik etki gösterdiği, melatonin kombinasyonunun ise karaciğer hücre dizilerini KE sitoksisitesinden önemli derecede koruduğu sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

- Hunter DL., Lassiter TL., Padilla S. Gestational exposure to chlorpyrifos : comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;158(1) : 16-23.
- Muscarella DE, Keown JF, Bloom SE. Evaluation of the genotoxic and embriyotoxic potential of chlorpyrifos and its metabolites in vivo and in vitro. *Environ Mutagen.* 1984; 6(1) : 13-23.
- Li WF, Furlong CE, Costa LG. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett* 1995;76(3): 219-26.
- Bigbee JW, Sharma KV, Gupta JJ, Dupree JL. Morfogenik role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environ Health Perspect.* 1999; 1:81-8.
- Dwivedi PD, Mukul D, Khanna SK. Role of cytochrome p-450 in quinalphos toxicity : Effect on hepatic and brain antioksidant enzymes in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 1998; 36 , 437-44.
- Stephen B, Kyle L, Yong X, Cynthia A, Donald E, Earl F, James E. Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity. *Annals of Clinical and Laboratory Science.* 1997; 27(3) : 196-208.
- Kazanç MB. Antioksidan vitaminler. *Sendrom.* Temmuz, 1997;14-23
- Richardson RJ. Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorous compounds : a critical review of the literature. *J Toxicol Environ Health.* 1995; 44(2): 135-65.
- Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology.* 1995; 104(1-3) : 129-40.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry . *Br. Med. Bull.* 1993; 49(3) 479-80.
- Özgüner F, Delibaş N, Özçankaya R, Karaca H, Koyu A. Yaşla azalan melatoninin oksidatif hasar ve mental yetilerle ilişkisi. *Yeni Tıp Dergisi.* 1996; 13(6) : 367-69.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 1994; 55:PL271-6.
- Datta C, Gupta J, Sarkar A, Sengupta D. Effects of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defence components of human erythrocyte and plasma. *Indian Journal of Experimental Biology.* 1992; 30 : 65-67.
- Prasanta KM, Anand K. Dimethoate inhibits extrathyroidal 5' - monodeiodination of thyroxine to 3,3', 5- triiodothyronine in mice : the possible involvement of the lipid peroxidative process. *Toxicology Letters* 1997; 91: 1-6.
- Thrasher JD, Madison R, Broughton A. Immunologic abnormalities in humans exposed to chlorpyrifos : preliminary observations. *Arch Environ Health .* 1993; 48(2) : 89-93.
- Pond AL, Chambers HW, Chambers JE. Organophosphate detoxication potential of various rat tissues via A - esterase and aliesterase activities. *Toxicol Lett.* 1995; 78(3) : 245-52.
- Sultatos LG. Metabolic activation of the organophosphorus insecticides chlorpyrifos and fenitroton by perfused rat liver. *Toxicology.* 1991; 68(1) : 1-9.
- Li W, Casida JE. Organophosphorus neuropathy target esterase inhibitors selectively block at growth of neurite-like and cell processes in cultured cells. *Toxicol Lett.* 1995; 76(3):219-2.
- Özgüner F, Özçankaya R, Delibaş N, Koyu A, Çalışkan S. Melatonin ve klinik önemi . *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi.* 1995; 2(4) : 1-6.
- Tan D, Reiter RJ, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole. *Carcinogenesis .* 1994; 15:215-8.
- Gros V, Arndt H, Andus T, Palitzsch KO, Schölnerick J. Free radicals in inflammatory bowel diseases . Pathophysiology and therapeutic implications. *Hepato-Gastroenterology.* 41:320-7.
- Öncü M, F. Gültekin, E. Karaöz, İ. Altuntaş, N. Delibaş. Klorprifos-etil tarafından oluşturulan oksidatif hasarın sıçan karaciğerine etkileri. *T. Klin. Tıp Bilimleri.* 2002; 22(1): 50-5.
- Gültekin F, Delibas N, Arican A, Sutcu R, Kilinc I, Kaptanagasi M. Investigation of the relation between LD50 and lipoperoxidative effect of certain agrochemical. *Biomedical Research* 2000; 11: 67-71.
- Gültekin F, Ozturk M, Akdogan M. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). *Archives of Toxicology* 2000; 74: 533-538.
- Gültekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on

oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. Archives of Toxicology 2001; 75: 88-96.

26. Gultekin F, Kaleli S, Altuntas I, Oncu M, Gokcimen A, Sutcu R. The in vivo lipoperoxidative effect of chlorpyrifos-ethyl on testis tissue of rats. Genel Tıp Dergisi 2000; 10: 147-152.

27. Gultekin F, Delibas N, Kutluhan S, Akdogan M, Kilinc I, Sutcu R. The changes in antioxidant system caused by chlorpyrifos-ethyl in rat brain and protective effect of melatonin and vitamin C + vitamin E. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2001; 17: 79-86.

28. Oncu M, Gultekin F, Karaoz E, Altuntas I, Delibas N. Nephrotoxicity in rats induced by chlorpyrifos-ethyl and ameliorating effects of antioxidants. Human and Experimental Toxicology, 21: 223-230, 2002.

Yazışma Adresi

Sultan Patat
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya AD , 32260 Isparta

Tel: 0 246 211 33 07

E-mail: sultanpatat@hotmail.com