

تعیین ارتباط پلی مورفیسم D/I ژن آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) با سقط مکرر جنین

فاطمه شاکرمی^۱، محمد تقی اکبری^{۲*}، شهره زارع کاریزی^۳، فرزاد عجمیان^۴

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ^۲ گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، ^۳ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران، ^۴ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۲/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: منظور از سقط تکراری وقوع ۲ یا ۳ بار سقط متوالی خود به خودی، قبل از هفته ۲۰ می‌باشد. علل متعددی در ایجاد سقط تکراری در زنان نقش آفرینی می‌کنند که از آن جمله می‌توان به مشکلات انعقادی اشاره نمود. هدف این مطالعه تعیین ارتباط پلی مورفیسم D/I ژن آنزیم مبدل آنژیوتانسین با سقط مکرر جنین بود.

روش بررسی: در این مطالعه مورد - شهادی، ۱۰۰ بیمار با سابقه سقط (حداقل دو بار) به عنوان گروه مورد و ۱۰۰ خانم سالم بدون سابقه سقط به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. برای بررسی پلی مورفیسم‌های ژن آنزیم مبدل آنژیوتانسین (D/I) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با جفت پرایمر طراحی شده انجام شد. داده‌ها با آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: ژنوتیپ I/I در افراد گروه مورد دارای فراوانی ۷ درصد بود، در حالی که در گروه شاهد هیچ موردی مشاهده نشد ($P < 0/05$). همچنین فراوانی آلل I در گروه مورد و شاهد به ترتیب ۳۶/۶ و ۲۴ درصد بود ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد، ارتباطی بین ژنوتیپ D/D و آلل D با سقط مکرر جنین وجود ندارد.

واژه‌های کلیدی: سقط مکرر، آنزیم مبدل آنژیوتانسین، پلی‌مرز

*نویسنده مسئول: دکتر محمدتقی اکبری، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه ژنتیک پزشکی

Email: akbarimt@gmail.com

عروقی مثل پره اکلامپسی و سقط جنین نیز در آنها بیشتر می شود (۳-۵).

مهار کننده فعال کننده پلاسمینوژن - ۱ (PAI-1) میزان تشکیل لخته در سیستم انعقادی را تنظیم می کند و سنتز آن از طریق آنژیوتانسین ۲ کنترل می شود. آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) یک پروتئاز حاوی روی است که با اثر بر آنژیوتانسین ۱ آن را به آنژیوتانسین ۲ تبدیل می کند و از این طریق با تأثیر در روند سنتز PAI-1 ایجاد لخته را تنظیم می کند (۵). ژن ACE انسانی با ۲۶ اگزون و ۲۵ اینترون و طولی معادل ۲۱ کیلوبازی داشته و روی کروموزوم ۱۷ در ناحیه q23.3 قرار دارد. چندین چندشکلی در ژن ACE گزارش شده که شایع ترین آن به صورت حذف یا اضافه شدن (I/D) یک قطعه ۲۷۸ bp در اینترون ۱۶ این ژن می باشد که در تنظیم میزان آنزیم نقش دارد (۶). چندشکلی ACE I/D به شدت با سطح در گردش آنزیم ACE مرتبط است. متوسط سطح ACE پلاسما در افراد با ژنوتیپ D/D حدود دو برابر بیشتر از افراد دارای ژنوتیپ I/I است، در حالی که افراد دارای ژنوتیپ I/D سطح متوسطی از میزان گردش آنزیم را نشان می دهند (۶-۷). مطالعه های متعدد روی این ژن، نشان دهنده ارتباط احتمالی این ژن با اختلالات انسانی مانند؛ بیماری آلزایمر (۷)، کلیه پلی کیستیک (۸)، دیابت و نروپاتی (۹)، بیماری عروق کرونر (۱۰) و عوارض دوران بارداری مانند سقط مکرر می باشد (۱۱). مطالعه های زیادی به بررسی ارتباط پلی مورفیسزم ژن ACE با سقط مکرر جنین در جمعیت های مختلف غیر

سقط مکرر اغلب به دو یا بیش از دو سقط متوالی پیش از هفته ۲۰ بارداری (به وسیله سونوگرافی یا از اولین روز آخرین پریود)، یا در زمانی که وزن جنین کمتر از ۵۰۰ گرم باشد، اطلاق می شود. سقط مکرر بر دو نوع اولیه و ثانویه است. در نوع اولیه، بلافاصله چند سقط متوالی رخ می دهد، ولی در نوع ثانویه، پس از یک بارداری موفق، سقط های متوالی آغاز می شوند (۱). حدود ۵۰ درصد موارد سقط تکراری شامل؛ علل آناتومیک، ایمونولوژیک، ژنتیک، آندوکراین، ترومبوفیلیک و فاکتورهای محیطی می باشد. با این حال در ۵۰ درصد موارد علت سقط نامشخص است (۲). از آنجا که بیش از نیمی از موارد سقط های تکراری با علت نامشخص با اختلالات ترومبوفیلی در ارتباط می باشند، آنالیز چندشکلی ژن های مؤثر در ترومبوفیلی باید در موارد مختلفی مورد مطالعه قرار گیرد. از جمله این ژن ها ژن آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) است. زنان مبتلا به ترومبوفیلی در خطر افزایش ابتلا به ترومبوز در دوران بارداری و عوارض نامطلوب مادری و جنینی هستند. در زمان بارداری مادامی که تعادلی بین سیستم انعقادی و فیبرینولیز مادر وجود دارد مشکلی رخ نمی دهد، چرا که مانع از رسوب فیبرین در عروق جفت و فضاهای بین پرزی می شود و صفحه پایه جفت پایدار باقی می ماند، اما زنانی که مشکلات ترومبوفیلی دارند، نه تنها در بارداری خطر ابتلا به ترومبوآمبولی دارند، بلکه احتمال سایر عوارض

ایرانی و ایرانی، پرداخته و نتایج متناقضی نیز از این مطالعات حاصل شده است. به همین دلیل هدف این مطالعه تعیین ارتباط پلی مورفیسم D/D ژن آنزیم مبدل آنژیوتانسین با سقط مکرر جنین بود.

روش بررسی

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۰۰ بیمار با سابقه حداقل دو سقط خود به خودی که ابتدا از بابت عوامل شناخته شده دخیل در سقط مکرر جنین مانند؛ عوامل آناتومیکی، عوامل ایمونولوژیک، عوامل عفونی، عوامل مرتبط با سیستم اندوکرینی و کاریوتیپ، مورد بررسی قرار گرفتند و در تمام موارد سنجش شده، طبیعی بودند به عنوان گروه مورد و ۱۰۰ خانم دارای حداقل ۲ تولد موفق، بدون هیچ تاریخچه‌ای از سقط، آندومترئوز و یا ناباروری به عنوان گروه شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند. سن گروه مورد بین ۲۰-۴۵ سال و تعداد سقط‌های مکرر بین ۲-۶ و سن گروه شاهد بین ۲۰-۵۰ سال و تعداد بارداری‌های موفق این گروه ۲-۶ بود. افراد شرکت کننده در گروه مورد از میان افراد مبتلا به سقط مکرر جنین که به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران (دکتر اکبری) مراجعه داشتند، انتخاب شدند. همچنین از تمام افراد مورد مطالعه پس از دادن آگاهی، رضایت‌نامه دریافت شد.

از کلیه افراد مورد مطالعه ۵ میلی‌لیتر خون محیطی در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA اخذ گردید. استخراج DNA ژنومی به روش نمک اشباع انجام شد (۱۲-۱۳). پس از آن تکثیر قطعه ژنی مورد نظر به

وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی مستقیم و معکوس '5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT3' و '3'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT5' انجام گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش PCR، ۰/۲۵ میلی‌مولار از هر dNTPs، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۷-۵ پیکو مول از هر پرایمر و ۰/۵ واحد آنزیم DNA polymerase Taq صورت گرفت. تکثیر در ۳۰ سیکل، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۸ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و طویل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. جهت شناسایی چندشکلی I/D ژن ACE محصولات حاصل از PCR روی ژل آکرلامید ۱۲ درصد برده شده، پس از رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره، نتایج حاصل بررسی شدند. محصول PCR ژنوتیپ I/I قطعه‌ای به طول ۱۹۰ جفت باز می‌باشد و در صورت عدم حذف (ژنوتیپ D/D)، طول این قطعه ۴۹۰ جفت باز خواهد بود.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصله، فراوانی آلل I در جمعیت از افراد گروه مورد و شاهد به ترتیب ۳۶/۶ و ۲۴ درصد گزارش شد. در واقع آلل I در جمعیت از افراد گروه مورد نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($p=0/007$) و میزان خطر نسبی برای آن در جمعیت تقریباً ۱/۸۳ می‌باشد. این نتایج در مورد ژنوتیپ II با فراوانی ۷ درصد در گروه مورد و صفر درصد در گروه شاهد، مشاهده شد ($p<0/05$) (جدول ۱).

بحث

از میان خانم‌هایی که به سندرم سقط مکرر جنین مبتلا بودند تقریباً در ۵۰ درصد موارد، علت سقط ناشناخته می‌باشد. شواهد بسیاری وجود دارد که نشان می‌دهد ترومبوز در عروق باریک جفت می‌تواند، دلیل بسیاری از سقط‌ها با علت نامشخص باشد. طبق مطالعات انجام شده قبلی شواهدی دال بر ارتباط بین ژنوتیپ‌های ژن ACE و افزایش خطر انواع حوادث ترومبوفیلیک مانند؛ بیماری عروق کرونر، انفارکتوس میوکارد، بروز ترومبوآمبولی سیاهرگی و سقط مکرر وجود دارد (۱۴). به نظر می‌رسد حضور آلل D و یا ژنوتیپ D/D در ژن ACE نه تنها با افزایش فعالیت ACE پلاسما همراه می‌باشد بلکه با افزایش سطح در گردش PAI-1 نیز مرتبط است. بر هم‌کنش این دو سبب کاهش توانایی فیبرینولیز و افزایش تمایل به ترومبوز می‌شود. برخی مطالعات نشان دهنده شیوع بالای ژنوتیپ D/D و یا آلل D در میان بیماران مبتلا به

بیماری‌های ترومبوفیلیک و افراد دچار سقط مکرر می‌باشد (۱۸). از سوی دیگر، در برخی مطالعات هیچ تفاوتی در توزیع ژنوتیپ، فراوانی آللی و ارتباط آن با وقوع سقط یافت نشده است. به منظور بررسی بیشتر در این مطالعه، سه ژنوتیپ احتمالی برای ژن ACE (D/D, I/D, II) در زنان مبتلا به سقط مکرر با علت ناشناخته با سابقه دو و یا بیشتر سقط مکرر بدون علت، بررسی شدند.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه شواهدی مبنی بر ارتباط معنی‌دار بین ژنوتیپ D/D و آلل D در ژن ACE در مقایسه گروه مورد مطالعه و گروه شاهد، با سقط مکرر جنین وجود ندارد. نتایج به دست آمده مشابه نتایج حاصل از دو مطالعه دیگر در ایران روی این فاکتور و ارتباط آن با سقط مکرر جنین است. اولین مطالعه به وسیله باقری روی زنان ایرانی- آذری در سال ۲۰۱۰ در ارومیه و مطالعه دیگر به وسیله اعرابی و همکاران در سال ۲۰۱۱ می‌باشد. هر دو مطالعه بیانگر عدم وجود ارتباط معنی‌دار مابین ژنوتیپ D/D و آلل D و سقط مکرر می‌باشند (۱۵). مطالعه دیگری با نتایج مشابه، مطالعه سال ۲۰۱۱ به وسیله چویی و همکاران در کره است که در این مطالعه نیز عدم ارتباط ژنوتیپ D/D و آلل D با سقط مکرر با وجود ارتباط معنی‌دار بین ژنوتیپ II با سندرم سقط مکرر در گروه مورد مطالعه گزارش گردیده است (۱۶).

جدول ۱: مقایسه فراوانی نسبی ژنوتیپ و آللهای D/I ژن آنزیم مبدل آنژیوتانسین

متغیر	گروه	مورد تعداد(درصد)	شاهد تعداد(درصد)	نسبت خطر (OR)	سطح معنی‌داری
II		۷(۷)	۰(۰)	۱۲/۱۱	۰/۰۳
ID		۶۰(۶۰)	۴۸(۴۸)	۱/۶۸	۰/۰۳
DD		۳۴(۳۴)	۵۲(۵۲)	۱	۰/۰۳
I		۷۴(۳۶/۶)	۴۸(۲۴)	۱/۸۳	۰/۰۷
D		۱۲۸(۶۳/۳)	۱۵۲(۷۶)	۱	۰/۰۷

متأثر می‌گردد که بهترین مثال از میانکنش بخش ژن- محیط در ایجاد یک فنوتیپ است. از این رو این امر محتمل است که چند شکلی‌ها تنها در ارتباط با یک پیش زمینه ژنتیکی خاص و یا همراه با عوامل محیطی می‌توانند منجر به اختلال شوند. به همین منظور جهت بررسی دقیق‌تر این فاکتورها و ارتباط آن با سقط مکرر جنین در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود که نمونه‌های انتخابی حتی‌المقدور از مناطق مشابهی انتخاب گردند و یا این که پس زمینه ژنتیکی نمونه‌های شاهد و بیمار با هم مشابهت داشته باشد. عوامل محیطی خطر ساز شناخته شده برای سقط مکرر، مانند استفاده از دخانیات، نمایه توده بدنی در پرسشنامه بیمار لحاظ گردد و ریسک آن با بیماری نیز محاسبه گردد.

نتیجه‌گیری

عملکردهای بیولوژیک ژن ACE در تنظیم فعالیت فیبرینولیتیک در تشکیل جفت و تهاجم تروفوبلاست در دوران بارداری انسان مهم هستند، با وجود این در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین آلل

با این حال مطالعات انجام شده در ارتباط با پلی مورفیسم ACE D/I و سقط مکرر نتایج متناقضی را نشان می‌دهند به طوری که در مطالعه زانگ و همکاران در چین (۲۰۱۱) نتایج گزارش شده نشان دهنده ارتباط معنی‌دار بین ژنوتیپ D/D و آلل D در زن ACE و سقط مکرر بود(۱۷).

مطالعه جامع‌تر، یک مرور سیستماتیک و متآنالیز در سال ۲۰۱۳ روی ارتباط چند شکلی ACE و سقط مکرر به وسیله Mei-Tsz Su و همکاران می‌باشد. در این بررسی، یازده مطالعه واجد شرایط شامل مجموع ۱۲۷۵ بیمار و ۲۰۴۹ شاهد، تحت یک مدل ژنتیکی غالب مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که پلی مورفیسم ACE I/D به طور قابل توجهی با سقط مکرر همراه بوده و زنانی که ژنوتیپ I/D، D/D دارند، ۲۹ درصد خطر ابتلای بالاتری نسبت به زنان دارای ژنوتیپ II دارند(۱۸). علت نتایج متناقض در مطالعات متفاوت احتمالاً مربوط به زمینه‌های ژنتیکی، اندازه، ترکیب، پراکنش جغرافیایی، قومیت و تعداد گروه مورد مطالعه است. اثرات فنوتیپی چند شکلی‌های ژنی به وسیله سایر عوامل ژنتیکی یا زمینه ژنتیکی فرد و عوامل محیطی

D و ژنوتیپ D/D در ژن ACE و سقط مکرر تأیید نشد. مجموع مطالعه‌های انجام گرفته و مطالعه حاضر می‌تواند شواهدی مبنی بر پلی‌ژنیک بودن سقط مکرر خود به خودی باشد. با این حال آنالیز پلی‌مورفیسم ژن‌های مؤثر در ترومبوفیلی باید در موارد مختلفی مورد مطالعه قرار گیرند و کشف ارتباط این پلی‌مورفیسم‌ها با سقط مکرر می‌تواند راهکارهای بهتری جهت درمان ارایه کند.

تقدیر و تشکر

این پروژه با حمایت مالی آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران انجام شد. نویسندگان مقاله از زحمات کارشناسان آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران دکتر اکبری، برای همکاری در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

1. Tulandi, Togas, Al-fozan Haya. Definition and etiology of recurrent pregnancy loss. 2011; uptodate version 18/3.
2. Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knegt AC, Gerssen-Schoolt KB. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2005; 331(7509):137-41.
3. Al Sallout RJ, Sharif FA. Polymorphisms in NOS3, ACE and PAI-1 Genes and Risk of Spontaneous Recurrent Miscarriage in the Gaza Strip. *Med Princ Pract* 2010; 19: 99–104.
4. Baek KH. Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. *Trends Mol Med* 2007; 13: 310-7.
5. Fatini C. ACE DD genotype: an independent predisposition factor to venous thromboembolism. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 642-7.
6. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounts for half the variance of serum enzyme levels. *The Journal of Clinical Investigation* 1990; 86, 1343–6.
7. Farrer LA, Sherbatich T, Keryanov SA, Korovaitseva GI, Rogaeva EA, Petruk S. Association between angiotensin-converting enzyme and Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 2000; 57: 210–4.
8. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 2008; 359: 641–4.
9. Kvetny J, Gregersen G, Pedersen, RS. Randomized placebo-controlled trial of perindopril in normotensive, normoalbuminuric patients with type 1 diabetes mellitus. *QJM* 2001; 94: 89–94.
10. Zee RY, Solomon SD, Ajani UA, Pfeffer MA, Lindpaintner K. A prospective evaluation of the angiotensin-converting enzyme D/I polymorphism and left ventricular remodeling in the 'Healing and Early Afterload Reducing Therapy' study. *Clinical Genetics* 2002; 61: 21–5.
11. Zhang S. Strong association between angiotensin I-converting enzyme I/D polymorphism and unexplained recurrent miscarriage of Chinese women—a case-control study. *Reprod Sci* 2011; 18: 743-46.
12. Elles R. Methods in molecular medicine. Molecular diagnosis of genetic diseases. Humana press, Totowa, NJ 1996; pp 37-62.
13. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998; 16(3): 1215.
14. Fatini C, Gensini F, Battaglini B, Prisco D, Cellai AP, Fedi S. Angiotensin-converting enzyme DD genotype, angiotensin type 1 receptor CC genotype, and hyperhomocysteinemia increase first-trimester fetal-loss susceptibility. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 2000; 11, 657–62.
15. Bagheri M, Isa A, Mir D. OMRANI, Fariba N. Polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene in Iranian Azeri Turkish women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Human Fertility* 2010; 13(2): 79–82.
16. Choi YS, Kwon H, Kim JH, Shin JE, Yoon TK, et al. Haplotype-based association of ACE I/D, AT1R 1166A>C, and AGT M235T polymorphisms in renin-angiotensin-aldosterone system genes in Korean women with idiopathic recurrent spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; Oct 1;158(2):225-8.
17. Zhang S, Wang J, Wang B, Ping Y, Ma X. Strong association between angiotensin I-converting enzyme I/D polymorphism and unexplained recurrent miscarriage of Chinese women—a case-control study. *Reprod Sci*. 2011;18(8):743-6.
18. Su MT, Lin SH, Chen YC, Kuo PL. Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost* 2013; 109(1): 8-15.

Association of angiotensin converting enzyme (ACE), D/I polymorphisms with recurrent pregnancy loss

Shakarami F¹, Akbari MT², Zare Karizi SH³, Ajamian F⁴

¹Department of Biology, Guilan university, Rasht, Iran, ²Department of Medical Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, ³Department of Biology, Varamin Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran, ⁴Department of Biology, Guilan university, Rasht, Iran

Received: 11 Jan 2014

Accepted: 13 March 2014

Abstract

Background & aim: Recurrent pregnancy loss (RPL) refers to the occurrence of two or more consecutive losses of clinically recognized pregnancies prior to the 20th week of gestation. The aim of this study was to investigate the hypothesis that recurrent pregnancy loss (RPL) is associated with a common insertion-deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene..

Methods: The present paper intended to study the ACE deletion (D)/insertion (I) polymorphism in women with recurrent abortion. One hundred patients with recurrent abortions (at least two) as cases and one hundred healthy female with two or more normal term deliveries and without a history of abortion selected as controls. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes and the ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism in intron 16 was performed by polymerase chain reaction (PCR). For the statistical analysis, SPSS software version 18 was used and Chi-square tests were calculated.

Results: Seven patients, (7 %), and non from the control group, were homozygote (I/I) for ACE polymorphism (OR=22.82; 95% CI=1.26-412.69; p=0.034), depicting no significant associations between ACE D allele or DD genotype and RPL.

Conclusion: The present study showed no significant associations between ACE D allele or DD genotype and RPL.

Key words: Recurrent Pregnancy Loss, Angiotensin Converting Enzyme, Polymerase

*Corresponding author: Akbari MT, Department of Medical Genetics, Tarbiat Modares University
Email: akbarimt@gmail.com