**مقاله پژوهشی**

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۹، شماره۳، خرداد ۱۳۹۳(شماره پی در پی۸۶)

# تعیین فراوانی پلی مورفیسمrs2623047 ژن سولفاتاز ۱ انسانی در زنان با سابقه سقط مکرر و مقایسه آن با زنان نرمال از نظر باروری

**اسکندر تقی زاده[۱*]، محمد بخشی گنجه‌ای[۱]، حسن تقی زاده[۲]، فاطمه بنی عامریان[۲]**

[۱]گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی یزد، یزد، ایران، [۲]واحد مبارزه با بیماری‌ها، مرکز بهداشت شهید دامیده، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۲/۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۱۳

**چکیده**

**زمینه و هدف:** سقط مکرر عبارت از تشخیص بالینی وقوع ۳ یا بیش ازآن سقط خود به خودی است که فاکتورهای متعددی از جمله عوامل ژنتیکی و محیطی در آن دخالت دارد. در این میان ژن سولفاتاز۱ انسانی در رشد و نمو جنین نقش دارد. هدف این مطالعه بررسی پلی‌مورفیسم rs2623047 ژن سولفاتاز۱ در زنان با سقط مکرر مراجعه کننده به مرکز ناباروری یزد و مقایسه آن با زنان نرمال از نظر باروری است.

**روش بررسی:** در این مطالعه مورد- شاهدی ٦٥ زن سالم به عنوان گروه شاهد و ۳۵ زن مبتلا به سقط مکرر به عنوان گروه مورد وارد مطالعه شدند. از افراد هر دو گروه نمونه خون گرفته شد و با استفاده از روش دستی کم نمک DNA آنها استخراج شد و تکثیر قطعه دارای پلی مورفیسم rs2623047 از ژن سولفاتاز۱ با روش PCR انجام شده و با استفاده از آنزیم BstNI عمل هضم آنزیمی‌صورت گرفت. داده‌ها با آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** ژنوتیپ GG در افراد گروه مورد ٤٢/٩ درصد و در افراد گروه شاهد ۱۸/۵ درصد بود (p=۰/۰۰۳). در حالی که ژنوتیپ AG در افراد گروه شاهد ٥٦/٩ درصد و در افراد گروه مورد ۳۷/۱ درصد بود(p=۰/۰۰۳).

**نتیجه‌گیری:** تغییرات ژنتیکی در ژن سولفاتاز۱ ممکن است دارای یک نقش در تکامل جنین در زمان حاملگی باشد و مطالعات گسترده‌تر با تعداد نمونه‌های بیشتر همراه با دیگر پلی مورفیسم‌های موجود در این ژن می‌تواند کمک کننده باشد.

**واژه‌های کلیدی:** پلی مورفیسم، سقط مکرر، سولفاتاز۱

[*]**نویسنده مسئول: اسکندر تقی‌زاده**، یزد، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک
**Email:** eskandar.taghizadeh@yahoo.com

Archive of SID


SID.ir

**مقدمه**

سقط مکرر عبارت است از تشیخص بـالینی وقوع ۳ یا بیش از آن سقط خود به خودی با یا بدون سابقه حاملگی که قبل از هفته بیستم اتفاق می‌افتـد و به طور کلی بـین ۳ تـا ۵ درصـد زوجـین را گرفتـار می‌کند(۱). در ایجاد سقط‌های مکرر عوامـل ژنتیکـی، اختلالات آندوکرینی، عوامل عفونی، آنتـی‌فسـفولیپید آنتی‌بادی‌ها و سایر عوامل محیطی دخیل بوده وبقیه را به عوامل نامشخص نسـبت مـی‌دهنـد(۲). بعضـی زوجین هیچ علـت مشخصـی ندارنـد و شـواهد قویـاً حاکی از آن اسـت کـه نقـش عوامـل ژنتیکـی در ایـن موارد چشمگیر است. در میان اختلالات تک‌ژنی نقش ژن سولفاتاز ۱ که در انسان به وسیله ژن SULF1 کد می‌شود، در اختلالات رشد جنـین بـه اثبـات رسـیده اسـت. هپـاران سـولفات o-6 اندوسـولفاتازها، نظیـر SULF1 به صورت انتخابی گروه های o-6 سولفات را از هپاران سولفات خارج می‌کنـد(۳). ایـن عملکـرد بـا تغییر جایگاه‌های اتصـال مولکـول‌هـای پیـام دهنـده منجـر بـه تنظـیم و تعـدیل اثـرات هپـاران سـولفات می‌شود. هپـاران سـولفات پروتئوگلیکـان‌هـا نیـز بـه عنـوان یـک رسـپتور کمکـی بـرای تعـداد زیـادی از فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها عمل می‌کنند(٦ـ٤) و این گونه در مسیر های پیام دهی مولکول‌هایی نظیـر Shh, Wnt, BMP, FGF,VEGF, HB-EGF, GDNF نقـش بسزایی را ایفا می‌کنند(۷) و فرآینـدهایی نظیـر رشـد سلولی، تکثیر، تمایز و مهاجرت را تحـت تـأثیر قـرار می‌دهند(۹ و۸).

نقش ژن sulf1 در رشد و تکامل جنین به اثبات رسیده اسـت. فرآینـدهای تکامـل طبیعـی موجـودات بستگی زیادی به ارتباطات سلول‌ها بـا یکـدیگر دارد، که این قبیل برهمکنش‌های سـلولی بـه وسـیله طیـف وسیع و متنوعی از مولکول‌ها و فاکتورهای پروتئینی ترشح شده میانجیگری مـی‌شـود. مطالعـات ژنتیکـی انجام شده برروی تکامل جنینی در موجوداتی نظیـر کرم حلقوی الگانس، دروزوفیلا، ماهی زبـرا و مـوش اهمیت بیولوژیکی پروتئوگلیکـان‌هـایی نظیـر هپـاران سـولفات را در تنظـیم فعالیـت فاکتورهـای رشـد متعـدد و فرآینـد تکـاملی مورفـوژنز آشـکار کـرده است(۱۱ و ۱۰).

هـم‌چنـین ثابـت شـده اسـت کـه بـین پلی‌مورفیسم‌های مختلـف ایـن ژن و اخـتلالات رشـد جنین ارتباط وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم rs2623047، G>A ژن سـولفاتاز ۱ انسانی در زنان با سابقه سـقط مکـرر و مقایسـه آن زنان سالم دارای باروری طبیعی بود.

**روش بررسی**

در این مطالعه با توجه بـه فراوانـی آلـل G بـه میزان ٤١/٥ درصد و آلل A به میزان ٥٨ درصد حداقل تعداد نمونه ۳۵ مورد به وسیله مطالعات آماری تعیـین شده است. بنابراین تعداد ۳۵ زن مبتلا به سـقط مکـرر که ۳ یا بیشتر مورد سقط با علت ناشناخته داشـته‌انـد

Archive of SID



www.SID.ir

به عنوان گروه مورد و ٦٥ زن سالم به عنوان شاهد که دارای حداقل یک فرزند سالم بودند وارد مطالعه شدند.

پس از انتخاب زنان دارای سقط مکرر و شرح موضوع تحقیق و کسب رضایت‌نامه از میان افراد مراجعه کننده به مر کز ناباروری یزد، از میان کسانی که به علت سقط مکرر مراجعه کرده بودند، ٥ سی‌سی خون محیطی گرفته شد. و درون لوله‌های حاوی حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شد. در مرحله بعد از ٦٥ زن سالم که دارای باروری طبیعی بودند با کسب رضایت‌نامه ٥ سی‌سی خون گرفته شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها با استفاده از روش دستی کم نمک[1]، DNA نمونه بیماران و افراد شاهد استخراج گردید و از یک جفت پرایمر به صورت فوروارد و ریورس استفاده شده و توالی پلی مورفیسم rs2623047 واقع در ناحیه پروموتور ژن سولفاتاز۱ تکثیر شد. سپس محصول تکثیر شده PCR به مدت ١٦ ساعت در مجاورت با آنزیم محدود کننده BstNI که دارای جایگاه برش برای باز G بود، قرار داده شد. محصول حاصل از عمل هضم آنزیمی روی ژل آگاروز الکتروفورز شده و با باندهای تشکیل شده به وسیله اتیدیوم بروماید قابل مشاهده گردید و با استفاده از نشانگرها طول قطعات ایجاد شده اندازه‌گیری شد که در صورت وجود سه قطعه برای هر چاهک ژنوتیپGA بود، ژنوتیپAA دارای یک قطعه و ژنوتیپGG دارای دو قطعه می‌باشند.

در این مطالعه، DNA نمونه خون‌های جمع‌آوری شده افراد مورد مطالعه با استفاده از روش کم نمک استخراج شدند. ابتدا مقدار ۲سی‌سی از خون جمع‌آوری شده افراد درون لوله‌های فالکون ١٥ سی‌سی ریخته شده و با افزودن بافر لیز سلولی و سانتریفوز گلبول‌های قرمز لیز شده و گلبول‌های سفید جدا می‌شدند. به رسوب شفاف که دارای سلول‌های سفید[2] می‌باشد، ١٠٠٠ میکرولیتر لیز کننده هسته سلول اضافه شد. در مرحله بعد با استفاده از پروتئینازK پروتئن‌ها هضم شده و پروتئین‌ها با استفاده از نمک سدیم دود سیل سولفات و کلریدسدیم رسوب داده شده و به وسیله اتانول مطلق کلاف DNA گرفته شد. در نهایت DNA در میکروتیوب ١/٥ جهت مراحل بعدی جمع‌آوری شدند.

برای ارزیابی کیفی DNA نمونه‌ها پس از استخراج از خون با روش اسپکتوفتومتری موردآزمایش قرارگرفتند. ارزیابی DNA در طول موج ٢٦٠ تا ٢٨٠ نانومتر انجام شد. جذب نوری در ٢٦٠ نانومتر غلظت DNA را نشان می‌دهد و با اندازه‌گیری نسبت OD در طول موج‌های ٢٦٠ و ٢٨٠ (نسبت $A_{260}/A_{280}$ ) نانومتر می‌توان درجه خلوص DNA را محاسبه کرد که اگر عددی بین ١/٦ تا ٢ باشد میزان خلوص DNA استخراج شده مطلوب خواهد بود. آلودگی با پروتئین موجب کاهش چشمگیر در این نسبت می‌شود که میزان صحیح اسیدنوکلئیک را مشخص نمی‌کند، بلکه نشان‌دهندهٔ کیفیت پایین **DNA**

1- Salting Out
2-White Blood Cell

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج شده است. در صورت پایین بودن کیفیت دوباره کار استخراج انجام می‌شود.

واکنش PCR با استفاده از محلول master mix حاوی کلرید منیزیم mgcl2، taq DNA polymerase و هریک از dATP،dCTP،dGTP و dTTP و پرایمرهای فوروارد و ریورس اختصاصی با دمای آنیلینگ ۵۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

تنظیم دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر توالی پلی مورفیسم rs2623047 از ناحیه پروموتورژن سولفاتاز ۱ به این ترتیب انجام گرفت؛ در مرحله اول دناتوراسیون اولیه با دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و سپس جهت انجام مراحل بعد دناتوراسیون با دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و آنیلینگ با دمای ۵۵ سانتی گراد، برای تکثیر توالی پلی مورفیسم rs2623047 ناحیه پروموتورژن سولفاتاز ۱ به مدت ۱ دقیقه انجام شد و سپس مرحله طویل‌سازی با دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل‌سازی نهایی با دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید.

طبق دستور کار حدود ۲۰ میکرولیتر از آنزیم BstNI روی ۲۰ تا ۴۰ میکرولیتر محصول واکنش PCR ریخته شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت عمل کردن آنزیم قرارداده شدند. ده میکرولیتر از محصولات PCR هضم شده نمونه‌ها به وسیله آنزیم محدودالاثرBstNI ، با ۱ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری مخلوط شده و پس از مخلوط کردن به وسیله پیپت در چاهک‌های ژل آگارز۲ درصد ریخته شد وتحت الکتروفورز قرار داده شدند و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت مورد عکس‌برداری قرار گرفتند.

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

**یافته‌ها**

بر اساس نتایج ژنوتیپ AG در افراد گروه شاهد بیشترین فراوانی (۵۶/۹ درصد) را داشت، در حالی که در افراد گروه مورد در ۳۷/۱ درصد موارد مشاهده شد که این اختلاف معنی‌دار بود(p=۰/۰۳). هم‌چنین در افراد گروه مورد بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپGG(۴۲/۹ درصد) بود و در افراد گروه شاهد این ژنوتیپ فقط در ۱۸/۵ از موارد دیده شد که این تفاوت نیز معنی‌دار بود(p=۰/۰۰۳). هم چنین نتایج حاصله نشان داد که در افراد گروه شاهد ژنوتیپ نوع AG بیشترین فراوانی را داشت(۵۶/۹ درصد)، در حالی که در افراد گروه مورد ژنوتیپ نوع GG درصد بالایی را نسبت به دو نوع دیگر داشت(۴۲/۹ درصد)(جدول ۱).

**جدول ۱: مقایسه فراوانی نسبی (تعداد و درصد) ژنوتیپ های مشاهده شده در گروه‌های مورد مطالعه**

| ژنوتیپ / گروه | AG | AA | GG | جمع |
|---|---|---|---|---|
| مورد | ۱۳ (۳۷/۱) | ۷(۲۰) | ۱۵(۴۲/۹) | ۳۵(۱۰۰) |
| شاهد | ۳۷(۵۶/۹) | ۱۶(۲۴/۶) | ۱۲(۱۸/۵) | ۶۵(۱۰۰) |
| سطح معنی داری | | ۰/۰۳ | | |

Archive of SID



www.SID.ir

**بحث**

سقط مکرر یکی از عوامل شایع در زنان دچار اختلال در باروری است که عوامل ژنتیکی بیش از نیمی‌از موارد سقط را شامل می‌شوند(۱۲ و۱۱). این مطالعه با هدف بررسی پلی مورفیسم شماره rs2623047 ژن سولفاتاز ۱ انسانی در زنان با سابقه سقط مکرر انجام شد.

ژن مذکور که در غشای سلولی مستقر است به عنوان یک پردازشگر پس از رونویسی عمل می‌کند و با حذف گروه‌های 6-o از پروتئوگلیکان‌هایی نظیر هپاران سولفات نقش مهمی‌را در تغییر جایگاه اتصال مولکولی‌هایی نظیر FGF,VEGF,BMP,WNT,SHH ایفا می‌کند و به این ترتیب در طیف وسیعی از فرآیندهای سلولی نظیر آنژیوژنز، رشد و تکثیر سلولی، ترمیم و بهبود زخم‌ها و تکامل جنین دخیل می‌باشد(۳ و ۱۳). نتیجه این بررسی نشان داد، فراوانی آلل G در زنان گروه مورد آزمایش به نسبت معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد می‌باشد و اکثر مطالعات صورت گرفته بر روی این ژن در زمینه بیان آن در سرطان‌هایی مانند تخمدان، سینه، معده و هپاتوسلولار بوده‌اند که نتایج همه این مطالعات نشان دهنده کاهش بیان این ژن در بافت‌های سرطانی است که علت آن به نقش در تنظیم رگ‌زایی بر می‌گردد(۱٤). در ارتباط با نقش ژن سولفاتاز ۱ در تکامل جنین می‌توان به مطالعه هولست و همکاران(۲۰۰۷) اشاره کرد که مشاهده کردند ناک اوت کردن ژن سولفاتاز ۱و۲ در جنین موش باعث کاهش بقای آن می‌شود(۱۵). هم‌چنین بررسی‌های دیگری نشان داد که نبود یا کاهش محصول ژن سولفاتاز ۱ و ۲ باعث اختلالات عصبی، اسکلتی و عضلانی می‌گردد(۱٦).

تا کنون مشابه مطالعه حاضر بر روی زنان با سابقه سقط مکرر صورت نگرفته است و در مطالعه حاضر فراوانی ژنوتیپی در بعضی موارد حاکی از وجود اختلافات معنی‌داری بین دو گروه شاهد و زنان با سابقه سقط مکرر است. نتایج به دست آمده نشان داد که نسبت تعداد درصد فراوانی‌های ژنوتیپ در دو گروه شاهد و آزمون با هم تفاوت معنی‌داری دارد.

**نتیجه‌گیری**

با توجه به این که پلی‌مورفیسم ژن سولفاتاز ۱ به عنوان یک پلی مورفیسم عمل کردی درناحیه پروموتر این ژن واقع شده است که تنظیم کننده فعالیت‌های این ژن در سطح رونویسی می‌باشد بنابراین به نظر می‌رسد که جایگزینی A با G می‌تواند باعث تغییر در سطح فعالیت ژن سولفاتاز ۱ شود که جهت تکامل اندام‌های جنینی لازم است و می‌تواند باعث سقط جنین گردد.

با توجه به وجود محدویت‌هایی هزینه‌ای و زمان، موارد زیر جهت اطمینان بیشتر پیشنهاد می‌شود؛ ۱ـ انجام یک بررسی جامع با در نظر گرفتن

Archive of SID

www.SID.ir

دیگـر پلـی‌مورفیسـم‌هـای کلینیکـی ژن سـولفاتاز ۱، ۲ـ بیان این ژن در مراحـل لانـه گزینـی و بعـد از لانـه گزینی با دقت بررسی گردد. ۳ـ ایـن مطالعـه بـا تعـداد بیشتری نمونه انجام گردد.

**تقدیر و تشکر**

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامـه مقطـع کارشناسی ارشـد رشـته ژنتیـک پزشـکی بـود کـه بـا حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یـزد و مرکز ناباروری یزد انجام شد.

Archive of SID



www.SID.ir

# REFERENCES

1.Carrington BGو Sacks L. Regan, *Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome.* Curr Opin Obstet Gynecol 2005; 17(6): 591-7.
2.Gracia CR., et al. *Risk factors for spontaneous abortion in early symptomatic first-trimester pregnancies* .Obstet Gynecol 2005; 106(5 Pt 1): 993-9.
3.Han CH, Han CH[1], Huang YJ, Lu KH, Liu Z, Mills GB, Wei Q, Wang LE,*Polymorphisms in the SULF1 gene are associated with early age of onset and survival of ovarian cancer.* J Exp Clin Cancer Res 2011; 30: 5.
4.Nybakken KN. Perrimon, *Heparan sulfate proteoglycan modulation of developmental signaling in Drosophila.* Biochim Biophys Acta 2002; 1573(3): 280-91.
5.Rapraeger AC. *Heparan sulfate-growth factor interactions.* Methods Cell Biol 2002; 69: 83-109.
6.Sasisekharan RG. Venkataraman, *Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function.* Curr Opin Chem Biol 2000; 4(6): 626-31.
7.Lai JP, Sandhu DS, Shire AM, Roberts LR. *The tumor suppressor function of human sulfatase 1 (SULF1) in carcinogenesis.* J Gastrointest Cancer 2008; 39(1-4):149-58.
8.Saoncella S, Echtermeyer F, Denhez F, Nowlen JK, Mosher DF, Robinson SD, Hynes RO, Goetinck PF. *Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers.* Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(6): 2805-10.
9.Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J. *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans.* Annu Rev Biochem 1999; 68: 729-77.
10.Folkman J. *Angiogenesis-dependent diseases.* Semin Oncol 2001; 28(6): 536-42.
11.Polverini PJ. *How the extracellular matrix and macrophages contribute to angiogenesis-dependent diseases.* Eur J Cancer 1996; 32A(14): 2430-7.
12.Zahraei M, shiekhha M,kalantar SM. *The association of arylendosulfatase 1 (SULF1) gene polymorphism with recurrent miscarriage.* J Assist Reprod Genet 2014 Feb;31(2):157-61. doi: 10.1007/s10815-013-0150-7. Epub 2013 Dec 10.
13.Ai X, Do A-T, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Lu K, Emerson CP. *Substrate specificity and domain functions of extracellular heparan sulfate 6-O-endosulfatases, QSulf1 and QSulf2.* Journal of Biological Chemistry, 2006;. 281(8): 4969-76.
14. Jin-Ping Lai, Dalbir S. Sandhu, Abdirashid M. Shire, Lewis R. Roberts *The tumor suppressor function of human sulfatase 1 (SULF1) in carcinogenesis.* Journal of Gastrointestinal Cancer 2008; 39(1-4): 149-58.
15.Holst CR, Bou-Reslan H, Gore BB, Wong K, Grant D, Chalasani S. *Secreted sulfatases Sulf1 and Sulf2 have overlapping yet essential roles in mouse neonatal survival.* PLoS One 2007; 2(6): e575.
16.Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Werb Z, Hemmerich S, Rosen SD. *Sulf-2, a proangiogenic heparan sulfate endosulfatase, is upregulated in breast cancer.* Neoplasia 2005; 7(11): 1001.

Archive of SID

www.SID.ir

**Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)**

**Original Article**

# Evaluation of gene rs2623047 polymorphism of human sulfatase1 in women with recurrent abortion compared with women with normal fertility

**Taghizadeh E[1*], Bakhshiganjae M[2], Taghizadeh H[2], Baniamerian F[2]**

[1]Genetics group, Yazd university of Medical Sciences,Yazd,Iran, [2]Damideh Health Centre, Yasuj university of Medical Sciences,Yasuj,Iran

Received: 03 Aug 2013 Accepted: 04 Jan 2014

Archive of SID

## Abstract

**Background & aim:** recurrent miscarriage is defined as accruing of at least 3 clinical spontaneous abortions or more. Several factors including genetic and environmental factors are involved in it. Among them, sulftase1 gene *rs*2623047 has a role in the human embryonic development. The purpose of this study was to evaluate sulftase1 gene *rs*2623047 polymorphism in women with recurrent abortions referred to the infertility center of Yazd, Iran.

**Methods:** In the present case-control study, sixty-five healthy women were selected as controls and thirty-five women with recurrent miscarriage were included as cases. **B**lood samples were taken from both groups manually, using a low-salt DNA extraction and amplified fragment polymorphism rs2623047 1 sulfatase gene made by PCR and enzymic digestion conducted using BstNI enzyme. Results were analyzed using the chi-square test.

**Results:** GG genotype in cases were 42±9% and in control group 5/18% respectively (p=0.003). While the AG genotype in the control group was 9.56% and in the cases 1.37% (p=0.003).

**Conclusions:** Genetic variation in sulfatase 1 gene may have a role in embryonic development during pregnancy and larger studies with more samples along with other polymorphisms in this gene may be helpful.

**Key words:** Polymorphism, Recurrent miscarriage, Sulftase1

***Corresponding author:** **Taghi Zadeh E,** Department of Genetics, Yazd University of Medical Sciences, Yazd, Iran
**Email:** eskandar.taghizadeh@yahoo.com



D.ir