

بررسی حضور آنتی بادی علیه پروتئین تنظیم کننده گلوکز ۷۸ در سرم زنان مبتلا به سقط مکرر جنین

بهروز غارثی فرد^{۱،۳*}، محمدحسین کریمی^۲، لیلا بیدار^۲، محمدعلی حسن زاده^۱

- (۱) گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
(۲) مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
(۳) مرکز تحقیقات ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت:

تاریخ پذیرش:

چکیده

مقدمه: سقط مکرر به عنوان سه یا بیش از سه سقط قبل از هفته بیستم بارداری تعریف می شود و در ۲۰-۱۵ درصد از بارداری ها رخ می دهد. Glucose Regulated Protein78 از پروتئین های شبکه اندوپلاسمی است که بر سطح سلول های تروفوبلاست بیان می شود. هدف از این مطالعه بررسی حضور آنتی بادی ضد GRP78 در زنان مبتلا به سقط های مکرر است.

مواد و روش ها: در یک مطالعه مورد-شاهدی، از میان مراجعین به مرکز ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شیراز از سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵، ۳۸ زن با سابقه سقط مکرر خود به خود با علت نامشخص به عنوان گروه بیمار و ۴۲ زن بدون سابقه سقط مکرر و دارای حداقل دو باروری موفق، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. میزان آنتی بادی علیه GRP78 در هر دو گروه با روش الیزا اندازه گیری شد. هم چنین بیان این پروتئین در دو گروه کنترل و بیمار، در بافت جفت با روش وسترن بلات بررسی شد.

یافته های پژوهش: در این مطالعه، بیان GRP78 بر سطح سلول های تروفوبلاست با استفاده از روش وسترن بلات در هر دو گروه بیمار و کنترل نشان داده شد. هم چنین با استفاده از روش الیزا آنتی بادی علیه GRP78 در سرم افراد بیمار و کنترل مشخص گردید. با وجود این که میزان این آنتی بادی در افراد بیمار کمتر از افراد سالم بود اما این اختلاف از نظر آماری تفاوت معناداری نداشت (P=0.1)

بحث و نتیجه گیری: نتایج به دست آمده در این پژوهش نتوانست ارتباط معناداری بین میزان آنتی بادی در افراد بیمار و افراد سالم را نشان دهد.

واژه های کلیدی: حاملگی، پلاستنا، سقط مکرر، GRP78

* نویسنده مسئول: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران-مرکز تحقیقات ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

Email: gharesifb@sums.ac.ir

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

سقط مکرر خود به خودی به معنای از دست دادن محصولات حاملگی و به عنوان یک رویداد تکرارپذیر از دو یا بیشتر سقط قبل از هفته بیستم بارداری (نسبت به اولین روز از آخرین دوره قاعدگی) و یا تولد جنین با وزن کمتر از ۵۰۰ گرم تعریف می شود (۱). سقط با شیوع ۲۰-۱۵ درصد در میان حاملگی های تشخیص داده شده بالینی حد فاصل هفته چهارم تا بیستم به عنوان شایع ترین عارضه حاملگی محسوب می شود (۲). سقط مکرر جنین به دو گروه اولیه و ثانویه تقسیم می شود. به طوری که در سقط های مکرر اولیه، زنان هیچ گاه بارداری موفقیت آمیزی نداشته اند ولی در سقط های مکرر ثانویه، سقط جنین پس از حداقل یک تولد زنده روی می دهد (۳). علائم سقط عبارت اند از: تهوع، تورم سینه، خونریزی و یا لکه بینی که هر لحظه شدیدتر می شود، خروج لخته های بزرگ و غلیظ خون از بدن و درد و گر گرفتگی قسمت انتهایی و تحتانی شکم. دلایل متنوع و متعددی در بروز سقط جنین نقش دارند که عبارتند از حالات غیرطبیعی شکل رحم، عوامل هورمونی، نواقص آناتومیک و آندومتر، سن مادر، فاکتورهای محیطی، عفونت ها، بیماریه ای مادر و اختلالات کروموزومی و ژنتیکی. بیشترین علت سقط در سه ماهه اول بارداری، اختلالات کروموزومی است (۴). علاوه بر علل ذکر شده، سیستم ایمنی نقش مهمی در یک بارداری طبیعی و مشکلات بارداری نظیر سقط جنین بازی می کند. در زنان مبتلا به سقط مکرر، سیستم ایمنی هومورال علیه اجزای سلولی و بافتی، اتو آنتی بادی های مختلفی را تولید می کند (۵). مطالعات انجام شده نشان می دهد که برخی از پروتئین های بافت پلاستا نیز ممکن است هدف واکنش سیستم ایمنی از طریق تولید اتو آنتی بادی ضد پلاستا قرار گیرند. از جمله پروتئین های که به نظر می رسد هدف سیستم ایمنی هومورال و اتو آنتی بادی ها قرار گیرد GRP78 است (۸-۶).

GRP78 برای اولین بار به عنوان یک پروتئین ۷۸ کیلودالتونی که سنتز آن در کشت سلولی محروم از گلوکز تقویت می شود کشف شد. این پروتئین از شناخته شده ترین چاپرون های شبکه اندوپلاسمی و از

خانواده پروتئین های شوک حرارتی ۷۰ کیلو دالتونی است (۹). GRP78 بر روی سلول های سرطانی و سایر سلول ها تحت تاثیر شرایط استرس محیطی و هیپوکسی القاء می شود و این مولکول با اختلال در عملکرد و هموستاز شبکه اندوپلاسمیک مانع از آپوپتوز سلولی می شود (۱۴-۱۰). مطالعات انجام شده حاکی از نقش GRP78 در تهاجم سلول های تروفوبلاست جفت می باشد. در مطالعه انجام شده توسط Gonzalez Gronow در سال ۲۰۰۶ نشان داده شد که آنتی بادی علیه این پروتئین در سرطان پروستات باعث متاستاز سلول های سرطانی می شود (۱۵). علاوه بر سرطان پروستات، نقش این پروتئین و آنتی بادی علیه آن در سرطان های معده و تخمدان و هپاتوسلولار کارسینوما و میزان متاستاز آن ها نیز نشان داده شده است (۱۲). در برخی از مشکلات بارداری نظیر بیماری پره اکلامپسی اخیرا نقش مولکول GRP78 به عنوان فاکتور تشخیصی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه انجام شده بر روی خانم های مبتلا به پره اکلامپسی تفاوت معناداری در میزان آنتی بادی علیه این پروتئین در سرم افراد مبتلا به نوع شدید بیماری نسبت به افراد کنترل مشاهده شده است (۶). از جمله مکانیسم هایی که می تواند سقط مکرر جنین را توجیه نماید عدم تشکیل صحیح بافت پلاستا می باشد. در تایید این مطلب عدم شکل گیری صحیح بافت جفت در اختلالات بارداری نظیر پره اکلامپسی و سقط جنین گزارش شده است (۱۶). پروتئین GRP78 بر روی سلول های تروفوبلاست بیان شده و آنتی بادی ضد آن می تواند در تهاجم سلول های تروفوبلاست نقش داشته باشد (۱۷). برخی از مطالعات انجام گرفته امکان اختلال در بیان این پروتئین و آنتی بادی ضد آن را در اختلالات بارداری نشان داده اند. با این وجود تاکنون مطالعه ای در رابطه با آنتی بادی های ضد این پروتئین در بافت پلاستا و سقط های مکرر انجام نشده است، این مطالعه به بررسی حضور آنتی بادی ضد مولکول GRP78 در سرم افراد مبتلا به سقط های مکرر پرداخته است.

مواد و روش ها

در یک مطالعه مورد-شاهدی، ۳۸ خانم مبتلا به سقط مکرر با علت نامشخص، به عنوان گروه بیماران و ۴۲ خانم سالم و بدون سابقه سقط به عنوان گروه شاهد از میان مراجعه کنندگان به مرکز ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شیراز از سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ با توجه به پرونده پزشکی بیماران و نظر متخصص زنان انتخاب شدند. معیارهای خروج از مطالعه شامل سایر عوامل موثر در سقط از جمله وجود ناهنجاری های کروموزومی در جنین، مشکلات آناتومیکی در رحم، اختلالات هورمونی و عفونت های مرتبط با سقط بود. جمع آوری گردید. جهت ورود به مطالعه و انجام خون گیری از تمامی افراد مورد مطالعه رضایت نامه آگاهانه (تایید شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز) گرفته شد.

نمونه گیری از جفت: نمونه های جفت سالم از افراد داوطلب سزارین پس از اخذ رضایت نامه آگاهانه (تایید شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز) به عنوان منبع پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. به طوری که بعد از برداشتن قطعات کوچک (تقریباً ۵۰۰ میلی گرم) از جفت، با سرم فیزیولوژی سرد شستشو داده و با کاغذ صافی خشک شده و نمونه ها در کرایوتیوب و در نیتروژن مایع تا هنگام استخراج پروتئین نگهداری شدند.

استخراج پروتئین از بافت جفت: به منظور استخراج پروتئین یک میلی لیتر از بافر لیز کننده (اوره ۸ مولار، دی تیوتریتول ۲ درصد، CHAPS ۲ درصد در Tris-HCl 5mm با PH:7.2) به ۱۰۰ میلی گرم از نمونه بافتی جفت اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه آنکوباسیون بر روی یخ صورت گرفت. در ادامه نمونه با دور $\times g$ ۱۵۰۰۰ در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس مایع رویی جمع آوری و بر روی یخ نگهداری شد. و در انتها نمونه های جمع آوری شده در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در میکروتیوب و در $-70^{\circ}C$ تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

اندازه گیری غلظت پروتئین های استخراج شده: جهت اندازه گیری غلظت پروتئین از دستگاه پیکو دراپ بر اساس جذب نوری استفاده گردید. به طور متوسط

غلظت پروتئین های استخراج شده حدود دو میکروگرم به ازای هر میکرولیتر به دست آمد.

جمع آوری نمونه های سرم: جهت انجام الیزا و وسترن بلات نقطه ای، میزان ۵ میلی لیتر خون از ۳۸ خانم مبتلا به سقط مکرر و ۴۲ خانم سالم به صورت غیر ناشتا و در زمان صبح به صورت داوطلبانه و پس از اخذ رضایت نامه آگاهانه (تایید شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز) جمع آوری گردید. نمونه سرم از خون های جمع آوری شده با انجام سانتریفیوژ در $\times g$ ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه جدا و در $-70^{\circ}C$ تا انجام آزمایشات نگهداری شد. افراد بیمار شرکت کننده در این مطالعه دارای حداقل دو سقط مکرر و فاقد مشکل ژنتیکی، هورمونی، آناتومیکی، عفونت های ویروسی و مشکلات تیروئیدی بودند و افراد سالم فاقد سابقه سقط و بیماری های خودایمنی و دارای حداقل ۲ بارداری موفق قبلی بودند.

الکتروفورز دو بعدی: با استفاده از این تکنیک ابتدا پروتئین ها در بعد اول بر اساس PH ایزوالکتریک جدا گردید که از سیستم IPGphor2 و استریپ های ۱۸ سانتی متری خطی با PH:5-8 و PH:4-7 جهت ایزوالکتروفوکوسینگ استفاده شد. در مرحله بعد و در بعد دوم پروتئین ها بر اساس وزن ملکولی جدا شدند. که بعد از متعادل سازی بر روی استریپ ها، الکتروفورز عمودی با قرار دادن استریپ ها بر روی ژل ۱۵ درصد SDS-PAGE انجام شد.

وسترن بلات: جهت بررسی و تایید حضور آنتی بادی بر علیه ملکول GRP78 پس از انتقال پروتئین های بافت پلاستنا بر روی کاغذ PVDF، با استفاده از سرم بیماران و افراد کنترل، وسترن بلات انجام شد. از رقت سرم ۱/۱۰ و تکنیک DAB (diaminobenzidine) و نمونه های مخلوط شده سرم جهت وسترن بلات استفاده شد.

رنگ آمیزی ژل: بعد از انجام الکتروفورز دو بعدی، ژل های به دست آمده با روش نیترات نقره رنگ آمیزی شدند.

الیزا: به علت نبود کیت الیزا به صورت تجاری برای سنجش میزان آنتی بادی علیه پروتئین GRP78 از پروتئین نوترکیب (ab79139)، جهت طراحی کیت به

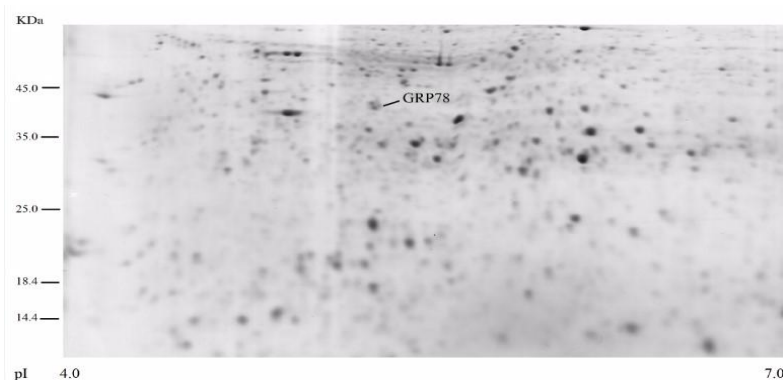
گرفته شدند.

یافته های پژوهش

بررسی حضور پروتئین GRP78 با روش ایمونوالکتروفورز ۲ بعدی: تصویر شماره ۱، عکس یک ژل دو بعدی بافت جفت رنگ آمیزی شده با نیترات نقره در محدوده PH:4-7 را نشان می دهد. در تصویر محل قرارگیری لکه پروتئینی مربوط به پروتئین GRP78 بر اساس الگوی پروتئین های بافت جفت که در مطالعات قبلی این مرکز نشان داده شده است (۷) مشخص شده است. بنا بر این بیان این پروتئین در سطح سلول های جفت مورد تایید قرار گرفت.

روش دستی استفاده شد ابتدا بهترین غلظت پروتئین و بهترین رقت سرم و رقت آنتی بادی ثانویه به دست آمد. از آنتی بادی مونوکلونال به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. الیزا به صورت دوتایی انجام شد، علاوه بر این از دو کنترل منفی در تست استفاده گردید.

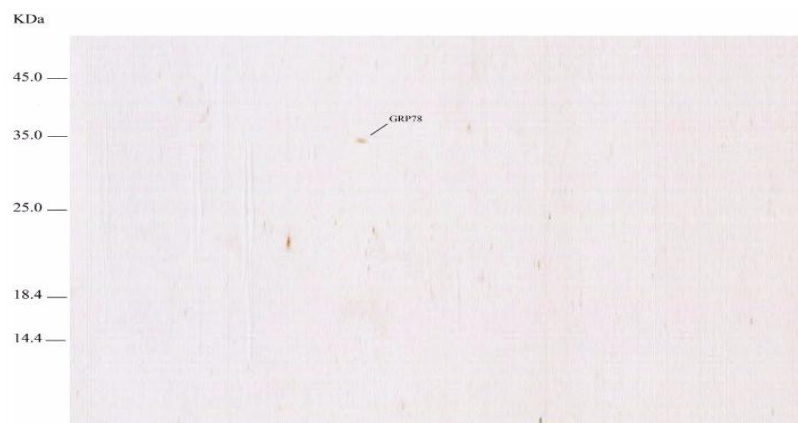
آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶ برای ویندوز، SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. برای مقایسه میانگین مقادیر آنتی بادی ضد GRP78 بین گروه های مورد مطالعه از آزمون Student t-test استفاده شد. علاوه بر این، مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر



تصویر شماره ۱. ژل رنگ آمیزی شده توسط نیترات نقره در محدوده PH:4-7

انجام شد. همان طور که در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است نتایج نشان می دهد که افراد دچار سقط های مکرر، آنتی بادی بر علیه ملکول GRP78 را در سرم خود دارا می باشند.

وسترن بلات: جهت بررسی و تایید حضور آنتی بادی بر علیه ملکول GRP78 پس از انتقال پروتئین های بافت پلاستانتا روی کاغذ PVDF، با استفاده از سرم بیماران و افراد کنترل، وسترن بلات



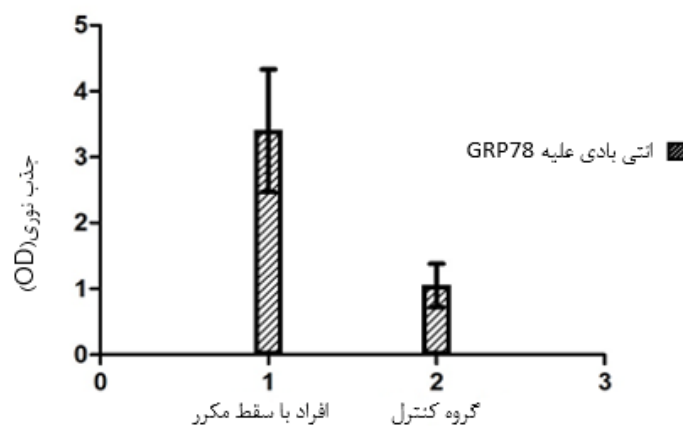
تصویر شماره ۲. آنتی بادی علیه GRP78 بر روی کاغذ PVDF

بررسی حضور آنتی بادی علیه پروتئین GRP78 در سرم افراد سالم و افراد دچار سقط مکرر: نتایج الیزا بر اساس میزان جذب نوری ارائه شده است. همان طور که در جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۱ نشان داده شده

است نتایج نشان داد که میزان آنتی بادی علیه پروتئین GRP78 در افراد سالم بیشتر از افراد دچار سقط مکرر است. با این وجود این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود ($P=0.1$).

جدول شماره ۱. مقایسه نتایج آزمایش الیزا بر روی نمونه های افراد بیمار و سالم با استفاده از آزمون تی تست

گروه	آنتی بادی علیه مولکول GRP78 OD mean±SD	P
سالم		۰/۱
طبیعی (۴۲)		



نمودار شماره ۱. مقایسه میزان آنتی بادی در افراد گروه کنترل و گروه بیمار با استفاده از آزمون تی تست

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه نشان داده شد که آنتی بادی علیه پروتئین GRP78 توسط خانم های مبتلا به سقط مکرر و زنان سالم باردار در زمان حاملگی تولید می شود. بررسی آماری نشان داد که با وجود این که میزان این آنتی بادی در افراد دچار سقط مکرر کمتر از خانم های با بارداری طبیعی است، اما این تفاوت از نظر آماری معنادار نیست. از جمله مکانیسم هایی که می تواند سقط مکرر جنین را توجیه نماید عدم تشکیل صحیح بافت پلاستما می باشد. در تایید این مطلب، عدم شکل گیری صحیح بافت جفت در اختلالات بارداری نظیر پره اکلامپسی و سقط جنین گزارش شده است (۱۶). نتایج مطالعات گذشته نشان می دهد که پروتئین GRP78 به میزان بالایی بر سطح سلول های

تروفوبلاست بیان می شود (۱۵، ۱۶). در این مطالعه نیز بیان پروتئین GRP78 بر سطح سلول های تروفوبلاست جفت بررسی و بیان آن نشان داده شد هم چنین مطالعات نشان داده اند که پروتئین GRP78 و آنتی بادی علیه آن در پلاسمای زنان باردار وجود دارد. که در این مطالعه نیز آنتی بادی علیه پروتئین GRP78 در سرم زنان دچار سقط مکرر نیز اندازه گیری و نشان داده شد. و آنتی بادی ضد آن می تواند در تهاجم سلول های تروفوبلاست نقش داشته باشد. GRP78 هم چنین بر روی سطوح سلولی بسیاری از سلول های تومور بیان می شود و به نظر می رسد رابطه ای میان بیان بیش از حد GRP78 روی سطوح سلولی و متاستاز سلول های سرطانی وجود دارد (۱۸، ۱۳-۱۱). اگر چه دلیلی دقیق برای بیان سطح

گرفت نشان داده شد که در ۳۰-۱۰ درصد سرم خانم های مبتلا به پره اکلامپسی آنتی بادی علیه این دو پروتئین وجود دارد(۶).

در مطالعه انجام شده دیگری نیز در ابتدا ارتباط معناداری میان میزان آنتی بادی و بیماری پره اکلامپسی مشاهده نشد اما وقتی بیماران بر اساس شدت بیماری مورد بررسی قرار گرفتند میزان آنتی بادی در افراد با نوع خفیف بیماری(فشارخون بالاتر مساوی ۹۰/۱۴۰ و دفع حداقل ۳۰۰ میلی گرم پروتئین) با افراد سالم تفاوت قابل ملاحظه ای نداشت ولی در نوع شدید بیماری شامل افراد با فشار بیشتر از ۱۶۰/۱۰۰ و دفع بیشتر از ۵ گرم پروتئین به شکل قابل توجهی میزان آنتی بادی کمتر بود(۶). با توجه به شباهت های بسیار بین مشکلات جفت در سقط های مکرر و بیماری پره اکلامپسی به نظر می رسد پروتئین GRP78 یا آنتی بادی ضد آن می تواند باعث بروز اختلال در تشکیل جفت و در نتیجه سقط جنین شود. با وجود این که مطالعه حاضر از نظر آماری معنی دار نبوده است اما نتایج نشان دادند که ممکن است افراد دچار سقط مکرر در تولید آنتی بادی ضد پروتئین GRP78 نقص داشته باشند و در نتیجه جفت به طور صحیح تشکیل نشود. از طرفی نتایج به دست آمده از نظر میزان آنتی بادی در خانم های سالم در مطالعه قبلی صورت گرفته بسیار شبیه افراد طبیعی در این مطالعه است. با توجه به این که این مطالعه تنها مطالعه انجام شده در مورد آنتی بادی ضد پروتئین GRP78 در بیماری سقط مکرر است و این احتمال وجود دارد که اندازه گیری آنتی بادی Anti-GRP78 ممکن است به عنوان یک نشانگر جدید برای پیش بینی سقط مورد استفاده قرار بگیرد با این حال، انجام مطالعات بعدی در مورد وجود و نقش این آنتی بادی در بیماری سقط مکرر ضروری به نظر می رسد.

سپاسگزاری

این مقاله از نتایج پایان نامه خانم لیلا بیدار با حمایت معاونت پژوهشی و حمایت مرکز تحقیقات پیوند دانشگاه علوم پزشکی شیراز و طرح پژوهشی به شماره ۲۱۴-۹۲ نگارش شده است.

سلولی GRP78 هنوز شناخته نشده است، به نظر می رسد که بیان GRP78 موجب حمایت از پویایی سلول های سرطان، تهاجم سلول های توموری می شود(۶). به همین دلیل ممکن است بیان GRP78 بر سطح سلول های تروفوبلاست مخصوصاً در سه ماهه اول بارداری موجب تهاجم این سلول ها و تشکیل مناسب جفت بیانجامد. برخی از مطالعات انجام گرفته امکان اختلال در بیان این پروتئین و آنتی بادی ضد آن را در اختلالات بارداری نشان داده اند. در مطالعه صورت گرفته توسط Fradet و همکاران نشان داده شد که بیان پروتئین GRP78 بر سطح سلول های سیتوتروفوبلاست زنان مبتلا به پره اکلامپسی کاهش یافته است(۱۷). در مطالعه ای که توسط A.Lavarroere و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مورد نقش GRP78 به عنوان نشانه ای از مسومیت بارداری انجام شد، میزان آنتی بادی علیه این پروتئین، کمپلکس GRP78-آنتی بادی و GRP78 (قسمت N ترمینال، قسمت C ترمینال و طول کامل پروتئین GRP78) در خانم های مبتلا به پره اکلامپسی و خانم های سالم باردار در سه ماه اول و آخر بارداری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تفاوتی در میزان آنتی بادی علیه کمپلکس GRP78-آنتی بادی و GRP78 در دو گروه مورد مطالعه وجود ندارد اما میزان آنتی بادی علیه قسمت C ترمینال پروتئین GRP78 در خون خانم های مبتلا به پره اکلامپسی در مقایسه با خانم های باردار سالم به میزان قابل توجهی بالاتر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که می توان از این آنتی بادی های در گردش(آنتی بادی علیه قسمت C ترمینال GRP78) خون که منعکس کننده خصوصیت تهاجمی سلول های سیتوتروفوبلاست هستند به عنوان مارکری جهت تشخیص و پیشگویی اولیه ایجاد پره اکلامپسی در بارداری استفاده کرد(۱۶). هم چنین در مطالعه دیگری که توسط غارثی فرد و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مورد وجود آنتی بادی علیه ۲ پروتئین جفتی Annexin A1 و پروتئین اتصالی به ویتامین D (Vit D binding protein) که در سرم خانم های مبتلا به پره اکلامپسی و خانم های باردار سالم صورت

References

1. Baek KH, Lee EJ, Kim YS. Recurrent pregnancy loss the key potential mechanisms. *Trends Mol Med*2007;13:310-7. doi: 10.1016/j.molmed.2007.05.005
2. Cunningham F, Leveno K, Bloom S, Spong CY, Dashe J. *Williams Obstetrics*. 24th ed. Mcgraw Hill Publication. 2014.
3. Ansari A, Kirkpatrick B. Recurrent pregnancy loss. An update. *J Reprod Med*1998;43(9):806-14.
4. Naseri AF, Morovati S. A survey on relationship between progesterone receptor gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortions. 2016.
5. Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet*2005;272:95-108. doi: 10.1007/s00404-004-0706-y
6. Rezanezhad L, Zolghadri J, Gharesifard B. Importance of anti-GRP78 antibody in pre eclampsia. *Iran J Immunol*2013;10:238. doi: IJIV10i4A5
7. Gharesifard B, Jafarzadeh L, Ghaderishabankareh F, Zolghadri J, Kamalisarvestani E. Presence of autoantibody against two placental proteins, peroxiredoxin 3 and peroxiredoxin 4, in sera of recurrent pregnancy loss patients. *Am J Rep Immunol*2013;69:248-55. doi: 10.1111/aji.12042
8. Behrouz GF, Farzaneh GS, Leila J, Jaleh Z, Eskandar KS. Presence of auto antibody against two placental proteins, annexin A1 and vitamin D binding protein in sera of women with pre eclampsia. *J Rep Immunol*2013;99:10-6. doi: 10.1016/j.jri.2013.04.007
9. Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Muller L, et al. Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci*2009;66:1556-69. doi: 10.1007/s00018-009-8745-y
10. Stagnarogreen A. Thyroid antibodies and miscarriage where are we at a generation later? *J Thyroid Res*2011;2011. doi: 10.4061/2011/841949
11. Delie F, Petignat P, Cohen M. GRP78 protein expression in ovarian cancer patients and perspectives for a drug-targeting approach. *J Oncol*2012;2012. doi: 10.1155/2012/468615
12. Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther*2006;5:741-4. doi: abs/10.4161/cbt.5.7.2970
13. Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med*2006;6:45-54. doi: 10.2174/156652406775574523
14. Quinones QJ, de Ridder GG, Pizzo SV. GRP78: a chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum. *Histol Histopathol*2008;23:1409-16. doi: 10.14670/HH-23.1409
15. Gonzalezgronow M, Cuchacovich M, Llanos C, Urzua C, Gawdi G, Pizzo SV. Prostate cancer cell proliferation in vitro is modulated by antibodies against glucose regulated protein 78 isolated from patient serum. *Cancer Res*2006;66:11424-31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1721
16. Laverriere A, Landau R, Charvet I, Irion O, Bischof P, Morales M, et al. GRP78 as a marker of pre-eclampsia: an exploratory study. *Mol Hum Reprod*2009;15:569-74. doi: 10.1093/molehr/gap037
17. Fradet S, Pierredon S, Ribaux P, Epiney M, Ya KS, Irion O, et al. Involvement of membrane GRP78 in trophoblastic cell fusion. *PLoS One*. 2012;7:40596. doi: 10.1371/journal.pone.0040596
18. Shin BK, Wang H, Yim AM, Le Naour F, Brichory F, Jang JH, et al. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J Biol Chem*2003;278:7607-16. doi: 10.1074/jbc.M210455200

Presence of anti-glucose regulated protein78 autoantibodies in the sera of women with recurrent pregnancy loss

Ghahresi-Fard B¹, Karimi MH², Bidar L³, Ali-Hasanzadeh M⁴

(Received:

Accepted:)

Abstract

Introduction: Recurrent pregnancy loss (RPL) is defined as three or more miscarriages prior to the 20th week of gestation. This condition occurs in 15-20% of all pregnancies. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) is an endoplasmic reticulum (ER) protein that is expressed on the trophoblast cells. The purpose of this study was to evaluate the presence of anti-GRP78 antibodies in the sera of women with RPL.

Materials & Methods: This case-control study was conducted 80 women referring to the Infertility Center of Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, during 2014-2016. The study population was assigned into two groups of case entailing 38 women with unexplained RPL and control including 42 healthy pregnant women with no history of miscarriage and a minimum of two successful pregnancies. The measurement of the anti-GRP78 antibody in the sera of the two groups was

performed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Furthermore, western blot technique was used to assess the expression of GRP78 in placenta tissue for both groups.

Findings: The results of the western blot demonstrated the expression of GRP78 on the trophoblast cells in both groups. Furthermore, anti-GRP78 antibodies were detected in both case and control groups through ELISA. The case group had a lower level of anti-GRP78 antibodies; however, this difference was not statistically significant (P=0.1).

Discussion & Conclusions: The findings of the current study revealed no significant relationship between anti-GRP78 antibody level in RPL patients and healthy pregnant subjects.

Keywords: Pregnancy, RPL, Placenta, GRP78

1. Dept of Immunology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

2. Organ Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

3. Infertility Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

* Corresponding author Email: Ghahresifb@sums.ac.ir