



**دانشگاه علوم پزشکی  
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل**

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری حرفه ای پزشکی

عنوان:

بررسی میزان بیان ژن V-domain Ig suppressor of T cell activation (VISTA) در سلول های تک هسته ای خون محیطی جدا شده از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس تحت درمان با داروهای اینترفرون بتا، فینگولیمود، DMF و Glatiramer acetate و مقایسه با افراد بیمار درمان نشده

نگارش:

صبا پویا

اساتید راهنما:

خانم دکتر الهام صفرزاده

آقای دکتر بهزاد برادران

فروردین ۱۴۰۲

شماره پایان نامه:

۰۱۰۷۳

تقدیم به پدر و مادر مهربان و فداکارم

به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند...

## تشکر و قدردانی

شکر و سپاس خدا را که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیست، سپاس خدای را که هر چه دارم از اوست و به امید آنکه توفیق یابم جز خدمت به خلق او نکوشم. برخورد لازم می‌دانم تا انجام وظیفه کنم و از خانواده‌ی عزیزم به خاطر حمایت‌های صمیمانه‌شان در تمام مراحل زندگیم تشکر کنم.

از استاد بزرگواریم جناب آقای دکتر بهزاد برادران رئیس محترم مرکز تحقیقات ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که مسئولیت راهنمایی این پایان‌نامه را بر عهده گرفتند و در تمامی مراحل تحقیق مرا مرهون راهنمایی‌های عالمانه و لطف صبورانه‌ی خود قرار دادند، تشکر می‌کنم و از صمیم قلب برای ایشان آرزوی سلامتی، موفقیت و بهروزی روزافزون دارم.

از استاد راهنمای ارجمندم خانم دکتر الهام صفرزاده که در این پایان‌نامه افتخار بزرگ شاگردی در محضرشان را داشته‌ام و کمک‌های علمی و معنوی خود را لحظه‌ای دریغ نکردند نهایت تقدیر و تشکر را دارم و صمیمانه از خدای مهربان برای ایشان آرزوی سلامتی و موفقیت هر چه بیشتر را خواستارم.

از کارشناسان و همکاران محترم مرکز تحقیقاتی ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز همچنین آقای وحید اصغری آذر که کمال همکاری را در اجرای این پایان‌نامه داشتند نهایت تقدیر و تشکر را دارم.

1. Derakhshani A, Asadzadeh Z, Baradaran B, Safarpour H, Rahmani S, Leone P, Shadbad MA, Hosseinkhani N, Ghasemigol M, Ayromlou H, Ahmadi H, **Pouya Saba**, Shojaee Maryam. The expression pattern of VISTA in the PBMCs of relapsing-remitting multiple sclerosis patients: A single-cell RNA sequencing-based study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Apr 1;148:112725.

## فهرست مطالب

فصل اول	۱
مقدمه	۱
۱-۱- اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق	۴
۲-۱- اهداف و فرضیات طرح	۹
۱-۲-۱- هدف کلی	۹
۲-۲-۱- اهداف اختصاصی	۹
۳-۲-۱- فرضیات	۱۰
۳-۱- تعریف واژه های اختصاصی	۱۰
فصل دوم	۱۲
بررسی متون	۱۲
۱-۲- مولتیپل اسکروزیس	۱۲
۱-۱-۲- تشخیص بیماری	۱۳
۲-۱-۲- علت شناسی	۱۸
۲-۱-۲-۱- عوامل محیطی	۱۸
۲-۱-۲-۲- عوامل ژنتیکی	۲۰
۲-۱-۳- آسیب شناسی و ایمونولوژی	۲۳
۲-۱-۳-۱- ارتباط سیستم بازرسی ایمنی و بیماری مولتیپل اسکروزیس	۲۴
۴-۱-۲- درمان	۲۵
۲-۱-۴-۲- ایمونوتراپی	۲۷
فصل سوم	۳۱
مواد و روش کار	۳۱
۱-۳- جمعیت مورد مطالعه و حجم نمونه	۳۲
۲-۳- وسایل و مواد مورد نیاز	۳۲
جدول ۳-۱. مواد لازم جهت آزمایش	۳۲
جدول ۳-۲. دستگاه های مورد نیاز	۳۳
۳-۳- مراحل کار	۳۳

۳۳	..... مطالعات بیوانفورماتیکی
۳۴	..... ۱-۳-۳-۱ تجزیه و تحلیل رونوشت تک سلولی
۳۴	..... ۲-۳-۳ مطالعه تجربی
۳۴	..... ۱-۳-۳-۲ جمعیت مورد مطالعه
۳۵	..... ۲-۳-۲-۲ جداسازی PBMCs
۳۶	..... ۳-۲-۳-۳ استخراج RNA
۳۷	..... ۴-۲-۳-۳ بررسی کمی RNA استخراج شده
۳۸	..... ۵-۲-۳-۳ سنتز cDNA
۳۹	..... ۶-۲-۳-۳ Real-time PCR
۴۲	..... ۴-۳ روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری
۴۲	..... ۵-۳ ملاحظات اخلاقی
۴۳	..... فصل چهارم
۴۳	..... نتایج
۴۴	..... ۱-۴ تجزیه و تحلیل رونوشت تک سلولی
۴۴	..... ۱-۴-۱ تجزیه و تحلیل نسبت نوع سلولی افتراقی
۴۵	..... ۲-۴-۱-۲ تجسم بیان ژن Vsir در PBMCs بیماران MS و کنترل
۴۶	..... ۲-۴ مطالعات آزمایشگاهی
۴۶	..... ۴-۲-۱ بیان Vsir در PBMCs بیماران RRMS و افراد سالم
۴۸	..... فصل پنجم
۴۸	..... بحث و نتیجه گیری
۴۹	..... ۱-۵ بحث
۵۶	..... ۳-۵ نتیجه گیری
۵۷	..... ۵-۵ پیشنهادات
۵۹	..... منابع

## فهرست جداول

- جدول ۱-۲. رویکردی به تشخیص مولتیپل اسکروزیس ..... ۱۶
- جدول ۲-۲. دسته بندی های درمان های ایمنی در مولتیپل اسکروزیس ..... ۲۷
- جدول ۱-۳. برنامه ریل تایم ..... ۴۱
- جدول ۱-۴. طبقه بندی بر اساس سن، جنس و دارو ..... ۴۶

## فهرست اشکال

- شکل ۱-۲. تصاویر مربوط به ضایعات بیماری مولتیپل اسکروز ..... ۱۶
- شکل ۲-۲. مکانیسم هایی که از طریق آن ویروس و باکتری ممکن است باعث مولتیپل اسکروزیس یا تشدید آن شوند ..... ۲۳
- شکل ۱-۴. خوشه بندی Louvain و حاشیه نویسی سلولی برای توصیف ۲۱ خوشه سلولی ..... ۴۴
- شکل ۲-۴. بیان Vsir در جمعیت های مختلف سلولی ..... ۴۶
- شکل ۳-۴. بیان mRNA ژن Vsir ..... ۴۷

## اختصارات

CTLA-4; cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CSF; Cerebrospinal fluid

cDNA; complementary DNA

CNS; central nervous system

DMF; dimethyl fumarate

DE; differential expression

DMTs; disease-modifying treatments

EAE; experimental autoimmune encephalomyelitis

EBV; Epstein–Barr virus

FDA; The Food and Drug Administration

GA; glatiramer acetate

GAPDH; Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GEO; Gene Expression Omnibus

HVG; highly variable genes

IM; infectious mononucleosis

IL-9; interleukin 9

IFN $\beta$ -1 $\alpha$ ; interferon-beta 1-alpha

MS; Multiple sclerosis

NCR; Negative checkpoint regulators

PBMCs; peripheral blood mononuclear cells



PD-1; Programmed cell death protein 1

PCA; principal component analysis

RRMS; relapsing-remitting multiple sclerosis

RT-PCR; Real-time polymerase chain reaction

SLE; systemic lupus erythematosus

t-SNE; t-distributed stochastic neighbor embedding

TIM-3; T cell immunoglobulin and mucin-domain expression containing-3

UMAP; uniform manifold approximation

VISTA; V-domain Ig suppressor of T-cell activation

VSIR; V-Set Immunoregulatory Receptor

## چکیده

بررسی میزان بیان ژن V-domain Ig suppressor of T cell activation (VISTA) در سلول های تک هسته ای خون محیطی جدا شده از بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس تحت درمان با داروهای اینترفرون بتا، فینگولیمود، DMF و Glatiramer acetate و مقایسه با افراد بیمار درمان نشده

زمینه: مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی (CNS) محسوب می شود. V-domain Ig suppressor of T cell activation (VISTA) یک مولکول جدید ایمون چک پوینت مهاری می باشد که می تواند پاسخ های ایمنی را سرکوب کند.

هدف: در این مطالعه، میزان بیان Vsir در PBMCs بیماران RRMS ارزیابی شد و الگوی بیان Vsir در PBMCs بیماران MS مشخص گردید. علاوه بر این، اثر فینگولیمود،  $IFN\beta-1\alpha$ ، گلاتیرامر استات (GA) و دی متیل فومارات (DMF) بر میزان بیان Vsir در PBMCs بیماران RRMS بررسی شد.

مواد و روش ها: ابتدا PBMC از بیماران مبتلا به بیماری مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم جدا شد. سپس RNA از سلول ها جدا شده و سنتز cDNA صورت گرفت. همچنین از Real time PCR جهت بررسی بیان VISTA استفاده شد. همچنین، توالی RNA تک سلولی در سلول های خون و مایع مغزی نخاعی بیماران مولتیپل اسکلروزیس و گروه کنترل، با استفاده از داده های خام توالی یابی RNA تک سلولی در GEO بررسی شد.

نتایج: نتایج حاصل نشان داد که بیان Vsir به طور قابل توجهی در PBMC های بیماران مبتلا به RRMS کاهش می یابد. علاوه بر این، نتایج Single-cell transcriptomics نشان داده است که بیان

Vsir در مونسیت‌های کلاسیک، مونسیت‌های میانی، مونسیت‌های غیر کلاسیک، سلول‌های دندریتیک میلوئید (mDC)، سلول‌های دندریتیک پلاسما سیتوئید (pDCs) و سلول‌های B بکر PBMC های بیماران مبتلا به MS کاهش می‌یابد. همچنین، DMF،  $IFN\beta-1\alpha$  و GA به طور قابل توجهی بیان Vsir را در PBMC های بیماران RRMS در مقایسه با گروه شاهد افزایش داده اند.

نتیجه گیری: در مجموع، مطالعه حاضر بیان Vsir را در PBMC های بیماران مبتلا به MS مشخص کرده است. با این حال، مطالعات بیشتری برای آشکار شدن اهمیت VISTA در سلول های ایمنی ذکر شده مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، VISTA، PBMC، Single-cell transcriptomics