

دراسة العلاقة بين تعدد الاشكال الوراثية لجينات (CD28 + IVS3 17T / C) و  
اضطرابات المناعة الذاتية (CTLA-4 +49A/G)

للغدة الدرقية في محافظة ذي قار / العراق

ا.د. حسن ريسان الركابي ا.د.علي نعيم سلمان نور عمران عبدالكريم

قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ذي قار

الخلاصة

تم تصميم هذه الدراسة للتحقق من دور تعدد الاشكال الوراثية لجينات (CD28 + IVS3 17T / C) و (CTLA- +49A/G) واضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية في محافظة ذي قار . تضمنت الدراسة الحالية 240 شخصاً ومن كلا الجنسين و الذين كانوا ضمن ثلاثة مجاميع بواقع 80 شخص في كل مجموعة . المجموعة الاولى (مرضى فرط نشاط الغدة الدرقية ) المجموعة الثانية (مرضى قصور نشاط الدرقية ) اما المجموعة الثالثة فهي ( مجموعة الاصحاء ) و تضم اشخاص غير مصابين بأي مرض من امراض الغدة الدرقية . تم استخلاص الحامض النووي الـ DNA من مجموعتي المرضى ومجموعة الاصحاء ثم ضخمت جينات الدراسة ( CD28 و CTLA-4 ) باستخدام تقنية ( PCR ) وتم استخدام تقنية ( RFLP ) للكشف عن الطرز الجينية لتعدد الاشكال الوراثية ( CD28 + IVS3 17T / C ) و CTLA-4 +49A/G . أظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود ارتباط بين تعدد الاشكال الوراثية ( CD28 + IVS3 17T / C ) واضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية . بالمقابل أظهرت نتائج الدراسة وجود ارتباط بين تعدد الاشكال الوراثية لجين CTLA-4 +49A/G . واضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية لدى المرضى مقارنة بمجموعة الاصحاء اذ ان نسبة الخطورة للإصابة بفرط نشاط الغدة الدرقية تكون بمقدار مرتين عند وجود الطراز الطافر المتباين ( A/G) ( OR= 2.09; 95% CI= 0.946 – 4.624 ) لدى المرضى مقارنة بمجموعة الاصحاء وتكون بمقدار اربع مرات عند وجود الطراز الطافر المتجانس (G/G) ( OR= 4.11 95% CI=1.888 – 8.951 ) . اما نسبة الخطورة للإصابة بقصور نشاط الغدة الدرقية كانت بمقدار مره ونصف عند وجود الطراز الطافر المتباين ( A/G) ( OR= 1.52; 95% CI= 0.701 – 3.329 ) لدى المرضى مقارنة بمجموعة الاصحاء وتكون بمقدار ثلاث مرات عند وجود الطراز الطافر المتجانس (G/G) ( OR= 3.02 ; 95% CI= 1.415 – 6.456) .

**Study the Relationship between the ( CD28 IVS3+17C/T), (CTLA-4  
+49A/G) genes Polymorphisms and Thyroid Autoimmune  
Disorder in Thi-Qar Province/ Iraq**

**Hassan R. AL-Rekaby , Ali Naeem Salman , Noor Omran Abdul-kareem**

Department of Biology, College of Pure Education, University of Thi Qar

**Abstract**

This study has been designed to investigate the role of the (CD28IVS3+17C/T , CTLA-4+49A/G ) genes Polymorphisms and the extent to which they contribution in thyroid autoimmune disorders at Thi- Qar Province. The current study included 240 people and who were among the three groups by 80 people in each group. The first group (patients with hyperthyroidism ), the second group (patients with hypothyroidism) and third group are (healthy group) with no infection of any disease of the thyroid gland . DNA was extracted from the two groups of patients and the healthy group and then amplified genes (CD28, CTLA-4) using PCR technique. The RFLP technique used to detect the CD28IVS3+17C/T , CTLA-4+49A/G genes Polymorphisms . The results of the present study showed that there was no association between gene Polymorphisms (CD28 + IVS3 17T) and thyroid autoimmune disorders.

On the other hand, the results of the study showed a correlation between the CTLA-4+49A/G gene Polymorphisms and autoimmune disorders of the thyroid gland in patients compared to the healthy group. The risk of hyperthyroidism is two time at the heterozygous (A/G ) in patients compared to the healthy group ( OR=2.09;95% CI=0.946 – 4.624) , and four time at the homozygous (G/G ) in patients compared to the healthy group ( OR=4.11;95% CI=1.888 – 8.8.951). The risk of hypothyroidism was one and a half time at the heterozygous (A/G ) in patients compared to the healthy group ( OR=1.52;95% CI=0.701 – 3.329), and It is three times the presence of the heterozygous (G / G) in patients compared to the healthy group( OR=3.03;95% CI=1.415 – 6.456).

## المقدمة

يقصد باضطرابات الغدة الدرقية هي اي مرض يصيب الغدة الدرقية يؤدي الى حدوث خلل في وظائف الغدة الدرقية Yadav (2013, et al.) وهذه الامراض تتراوح بين امراض بسيطة مثل الخلل الوظيفي البسيط في عمل الغدة نتيجة نقص او زيادة اليود او الامراض المعقدة مثل سرطان الغدة الدرقية (Al Shahrani et al., 2015; Huang and Jap, 2015) و اضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية التي تمثل نسبة 90% من جميع امراض الغدة الدرقية (Xiaoheng et al. 2017). اضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية *Autoimmune Thyroid Disorders* هي الامراض التي تحدث نتيجة فشل في عملية التسامح المناعي الذاتي (self-tolerance) لمستضدات الغدة الدرقية اذ يقوم الجهاز المناعي بتكوين اعداد ذاتية نوعية تهاجم الغدة الدرقية وتحدث خللاً في وظائف الغدة الدرقية (Chen et al., 2015). وتصنف اضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية الى فرط نشاط الغدة الدرقية *Hyperthyroidism* وقصور نشاط الغدة الدرقية *Hypothyroidism* (Effraimidis and Wiersinga, 2014). ان فرط نشاط الغدة الدرقية هو انتاج الغدة الدرقية لهرموني T3 و T4 بمستويات مرتفعة تفوق حاجة الجسم بالإضافة الى انخفاض مستوى الهرمون المحفز للدرقية (Idros, 2015) اما قصور نشاط الدرقية فهو فشل الغدة الدرقية في انتاج ما يكفي لحاجة الجسم من هرموني T3 و T4 يرافقه ارتفاع مستوى الهرمون المحفز للدرقية (Gaitonde et TSH, 2014; Sehgal et al., 2012).

من الجينات التي لها دور في تنظيم الاستجابات المناعية ومنع حدوث الاستجابات الذاتية هما الجينان (CD28) Cluster of Differentiation 28 و CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte- antigen – 4) اللذان يقعان على الذراع الطويل للكروموسوم الثاني عند الحزمة (1q33-34) (Liu and Zhang, 2013) اذ ان الجين CD28 يشفر لمستقبلات CD28 التي يتم التعبير عنها بشكل اساسي على سطح الخلايا التائية في الحالة النشطة وغير النشطة لهذه الخلايا (Beier et al., 2007) اما الجين CTLA-4 فإنه يشفر لمستقبلات CTLA-4 التي يتم التعبير عنها على سطح الخلايا التائية النشطة فقط (Beier et al., 2014; AlFadhli and Nizam, 2007; Beier 2007) ان مستقبلات CD28 و CTLA-4 ينتميان الى (Ig superfamily) التي ترتبط ببروتينات B7 التي يتم التعبير عنها على الخلايا العارضة للمستضد لذا لهما دور مهم في تنظيم الاستجابة المناعية (Farbod et al., 2015; Lenschow et al., 1996; Liu and Zhang, 2013). اذ ان تفعيل الاستجابة المناعية المناسبة والصحيحة هو قائم على التوازن بين الإشارات التحفيزية للخلايا التائية بواسطة CD28 والإشارات التثبيطية بواسطة CTLA-4 لذا أي خلل في هذا التوازن قد يؤدي الى استجابات مناعية خاطئة وبالتالي حدوث العديد من الامراض مثل امراض المناعة الذاتية والاورام (Rudd et al., 2009; Kuehn et al., 2014; Yoo et al., 2016).

ارتبط تعدد الاشكال الوراثية لجين (CD28 + IVS3 17T / C) وجين CTLA-4 +49A/G بأعراض المناعة الذاتية للغدة الدرقية (Galarza et al., 2010). اذ ان تعدد الأشكال الوراثية لهذه الجينات قد يساهم في زيادة التعبير عن CD28 او نقصان التعبير عن CTLA-4 مما يؤدي الى حدوث استجابات مناعية مفرطة وبالتالي حدوث امراض المناعة الذاتية (Wolff 2015; Pawlak-Adamska et al., 2015).

ان تعدد الاشكال الوراثية لجين (CD28 + IVS3 17T / C) يحدث في انترون رقم 3 نتيجة استبدال القاعدة النايتروجينية T بالقاعدة النايتروجينية C (T → C) في الموقع 17 (Nakao et al., 2000). اما تعدد الاشكال الوراثية لجين +49A/G (CTLA-4) فيحدث في اكسون رقم 1 نتيجة استبدال القاعدة النايتروجينية A بالقاعدة النايتروجينية G (A → G) عند

النيوكليوتيدة 49 وبذلك يؤدي الى إحلال الحامض الاميني threonine محل الحامض الاميني alanine في الكودون رقم 17 (Brzoza *et al.*, 2014; Minhas *et al.*, 2014).

كذلك ارتبط تعدد الاشكال الوراثية لجين (CD28 + IVS3 17T / C) وجين CTLA-4 +49A/G بأمراض مناعية ذاتية أخرى مثل التهاب المفاصل الرثياني (Elshazli *et al.*, 2015 ; Ledezma-Lozano *et al.*, 2011).

#### المواد وطرائق العمل

#### 1 - جمع العينات

جمعت عينات الدم بمقدار ( 5 مل ) من الدم الوريدي وضعت في انابيب حاوية على مادة ( EDTA ) Ethylene diamine Tetra Acetate المانعة للتخثر لغرض استخلاص الحامض النووي DNA مباشرة او يتم تخزينها في درجة حرارة ( - 20 م ) لحين استخدام الدم في عملية الاستخلاص . تم اخذ العينات من 240 شخصاً من كلا الجنسين و الذين كانوا ضمن ثلاثة مجاميع بواقع 80 شخص في كل مجموعة . **المجموعة الاولى** (مرضى فرط نشاط الغدة الدرقية ) 10 من الذكور و 70 من الاناث و **المجموعة الثانية** (مرضى قصور نشاط الدرقية ) : تضم هذه المجموعة 11 من الذكور و 69 من الاناث ( تم الحصول على عينات المرضى في المجموعتين من مركز السكري والغدد الصم في محافظة ذي قار ) وتم التأكد من الإصابة من خلال قياس مستويات هرمونات الغدة الدرقية و مستويات الاضداد الذاتية للغدة الدرقية . اما **المجموعة الثالثة** فهي ( مجموعة الاصحاء ) و تضم 25 من الذكور و 55 من الاناث من غير المصابين بأي مرض من امراض الغدة الدرقية . اما اعمار الافراد ضمن المجاميع الثلاثة فكانت من ( 20 – 70 ) سنة

#### 2 - استخلاص الحامض النووي الـ DNA

تم استخلاص الحامض النووي DNA من مجموعتي المرضى ومجموعة الأصحاء باستخدام عدة الاستخلاص gSYNC™ DNA Extraction Kit المجهزة من قبل شركة Geneaid .

#### 3 - الترحيل الكهربائي لنواتج عملية الاستخلاص

استخدمت طريقة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز Agarose Gel للكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين حسب طريقة ( Sambrook *et al.*, 1989 ) .

#### 4 - طريقة عمل تقنية ( PCR ) Polymerase Chain Reaction

استخدمت تقنية ( PCR ) لتضخيم جين ( CD28 ) طبقاً لطريقة ( Ledezma-Lozano *et al.*, 2011 ) اما تضخيم جين ( CTLA-4 ) فكان طبقاً لطريقة ( Marron *et al.*, 1997 ) وقد استعملت البادئات المصنعة من قبل شركة ( Bioneer ) وكان تسلسلها كما في جدول رقم ( 1 ) .

جدول ( 1 ) : يوضح تسلسل البادئات المستخدمة في تقنية PCR

Genes	Primer sequences	Length	Tm
CD28	F 5'-TTT TCT GGG TAA GAG AAG CAG CGC-3'	24	61
	R 5'-GAA CCT ACT CAA GCA TGG GG-3'	20	53
CTLA-4	F 5'-AAG GCT CAG CTG AAC CTG GT-3'	20	55
	R 5'-CTG CTG AAA CAA ATG AAA CCC-3'	21	53

- أجريت طريقة العمل بخليط تفاعل بحجم 20 مايكروليتر لكل جين على حده وكما هو موضح في جدول رقم (2).

جدول ( 2 ) : يمثل مواد خليط التفاعل وأحجامها

Chemicals	Volume
Master Mix	5 µl
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
DNA	8 µl
Distill Water D.W.	5 µl
Total volume	20 µl

- بعد اتمام جميع الإضافات مزجت العينات بجهاز Microfuge لمدة نصف دقيقة ثم وضعت العينات بجهاز Thermal Cycler) وشغل الجهاز حسب البرنامج الخاص بكل جين وكما موضح في الجدول رقم (3) وجدول (4).

جدول ( 3 ) : يمثل برنامج تقنية PCR لجين CD28

CD28				
No. of Steps	Steps	Temperature	Time	No. of Cycle
1	Denaturation 1	94°C	3min	1 Cycle
2	Denaturation 2	94°C	30s	30 Cycles
3	Annealing	62°C	30s	
4	Extension 1	72°C	30s	
5	Final Extension 2	72°C	5min	1 Cycle

جدول ( 4 ) : يمثل برنامج تقنية PCR لجين CTLA-4

CTLA-4				
No. of Steps	Steps	Temperature	Time	No. of Cycle
1	Denaturation 1	94 °C	5 min	1 Cycle
2	Denaturation 2	94 °C	30 Sec.	35 Cycles
3	Annealing	57°C	1min	
4	Extension 1	72°C	1min	
5	Final Extension 2	72°C	7 min	1 Cycle

5 - الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية PCR

تم الكشف عن نواتج PCR لجين (CD28) باستخدام طريقة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 2% وكانت ايضاً حسب طريقة (Sambrook *et al.*, (1989) . اذ ان ظهور الحزمة بحجم 147bp يعني وجود جين CD28 (Ledezman-Lozano *et al.*, 2011) . كذلك استخدمت نفس الطريقة للكشف عن جين CTLA-4 اذ ان ظهور الحزمة بحجم 152bp يدل على وجود هذا الجين (Marron *et al.*, 1997) .

6 - تقنية (RFLP) Restriction fragment length polymorphism

استخدمت هذه التقنية للكشف عن الطرز الجينية لتعدد الاشكال الوراثية لجين (CD28 + IVS3 17T / C) وذلك بواسطة استخدام انزيم القطع AfeI Enzyme المجهز من قبل شركة BioLab وحسب النشرة المرفقة مع الانزيم اذ تحضن نواتج تقنية PCR مع انزيم القطع لمدة ساعة وبدرجة 37C. اذ ان العينات الحاوية على الطراز البري تقطع من قبل الانزيم الى 125bp اما العينات الحاوية على الطراز الطافر المتباين تقطع الى حزمتين 147bp و 125bp اما العينات الحاوية على الطراز الطافر المتجانس لا تقطع وتظهر بشكل حزمة عند الزوج القاعدي 147bp. اما الكشف عن الطرز الجينية لتعدد الاشكال الوراثية لجين (CTLA-4 +49A/G) فقد تم بواسطة استخدام انزيم القطع BstEII Enzyme المجهز من قبل شركة BioLab وحسب النشرة المرفقة مع الانزيم اذ تحضن نواتج تقنية PCR مع انزيم القطع لمدة 15 دقيقة وبدرجة 60C. اذ ان العينات الحاوية على الطراز البري لا تقطع من قبل الانزيم وتظهر حزمة عند الزوج القاعدي 152bp اما العينات الحاوية على الطراز الطافر المتباين تقطع الى حزمتين 152bp و 130bp اما العينات الحاوية على الطراز الطافر المتجانس تقطع وتظهر بشكل حزمة عند الزوج القاعدي 130bp . وكان خليط التفاعل لكل جين كلا على حده بحجم 30 µl وكما في جدول رقم (5)

جدول ( 5 ): مواد التفاعل لانزيم القطع

Chemicals	Volume
PCR product	10µl
Restriction enzyme	1 µl
10X Buffer	2 µl
D.W.	17 µl
Total volume	30 µl

7 - الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية RFLP

تم الكشف عن نواتج RFLP باستخدام طريقة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 3% وكانت ايضاً حسب طريقة (Sambrook *et al.*, (1989) . بالنسبة (CD28 + IVS3 17T / C) ظهور الحزمة 125 bp يعني وجود الطراز البري (T/T) وظهور الحزمة بحجم 147bp يعني وجود الطراز الطافر المتجانس (C/C) . وظهور حزمتين الأولى بحجم 147bp والثانية بحجم 125 bp يعني وجود الطراز الطافر المتباين (T/C) (Ledezman-Lozano *et al.*, 2011) . اما الكشف عن (CTLA-4+49A/G) ظهور الحزمة 152bp يدل على وجود الطراز البري (A/A) وظهور حزمة بحجم 130bp يعني وجود الطراز الطافر المتجانس (G/G) وظهور حزمتين الأولى بحجم 152bp والثانية بحجم 130 bp يعني وجود الطراز الطافر المتباين (A/G) (Marron *et al.*, 1997) .

8 - التحليل الاحصائي

استخدم اختبار , Odds Ratio (OR) وبفترة ثقة 95% CI باستعمال البرنامج الاحصائي ( SPSS ver. 23 ) للمقارنة بين الطرز الجينية لعينات المرضى والأصحاء ولدراسة تأثير تعدد الاشكال الوراثية ( CD28 + IVS3 17T / C ) و ( +49A/G ) CTLA-4 في حدوث اضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية .

النتائج

الطرز الجينية لجين ( CD28 + IVS3 17T / C ) و CTLA-4 +49A/G لدى مرضى اضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية و مجموعة الاصحاء

1 -الطرز الجينية لجين ( CD28 + IVS3 17T / C ) لدى مجموعتي المرضى و مجموعة الاصحاء .

A - فرط نشاط الغدة الدرقية

اظهرت النتائج في جدول ( 6 ) ان نسبة تردد الطراز البري ( T/T ) لدى مجموعة المرضى (33.75%) اما مجموعة الاصحاء فكانت (38.75%) ولم يلاحظ وجود اي ارتباط بين الطراز الطافر المتباين ( T/C ) و خطر الاصابة بمرض فرط نشاط الغدة الدرقية ( OR=1.28 ; 95% CI= 0.610 – 2.712 ) وكذلك بينت النتائج عدم وجود علاقة بين خطر الاصابة بالمرض و الطراز الطافر المتجانس ( C/C ) ( OR=1.9 ; 95% CI=0.751 – 1.585 ) .

جدول ( 6 ) : الطرز الجينية لجين ( CD28 + IVS3 17T / C ) لمرضى فرط نشاط الدرقية

ومجموعة الاصحاء و لكلا الجنسين .

*95% CI	*OR	المرضى	الاصحاء	الطرز الوراثية
————	1.0	27(33.75%)	31(38.75%)	T/T
0.610 – 2.712	1.28	28(35%)	25(31.25%)	T/C
0.751 – 1.585	1.19	25(31.25%)	24(30%)	C/C

\* OR ( Odds Ratio )

\*95% CI ( Confidence Interval)

B - قصور نشاط الغدة الدرقية

اما في حالة قصور نشاط الغدة الدرقية فقد لوحظ من نتائج جدول ( 7 ) ان نسبة تردد الطراز البري لدى مجموعة المرضى هي (41.25%) ومن خلال نتائج التحليل الاحصائي لم يلاحظ وجود ارتباط بين ( CD28 + IVS3 17T / C ) و خطر الاصابة بقصور نشاط الغدة الدرقية لدى المرضى مقارنة بمجموعة الاصحاء عند وجود الطراز الطافر المتباين ( T/C ) ( OR= 0.7; ( C/C ) ( 95% CI=0.369 – 1.687 ) وكذلك لم يلاحظ وجود خطورة للإصابة بالمرض ووجود الطراز الطافر المتجانس ( C/C ) ( OR= 1.01; 95% CI=0.485 – 2.134) .

جدول ( 7 ): الطرز الجينية لجين ( CD28 + IVS3 17T / C ) لمرضى قصور نشاط الدرقية ومجموعة الاصحاء و لكلا الجنسين .

الطرز الوراثية	الاصحاء	المرضى	OR	95% CI
T/T	31(38.75)	33(41.25%)	1.0	————
T/C	25(31.25)	21(26.25%)	0.78	0.369 – 1.687
C/C	24(30%)	26(32.5%)	1.01	0.485 – 2.134

\* OR ( Odds Ratio ) \*95% CI ( Confidence Interval)

2 - الطرز الجينية لجين CTLA-4 +49A/G لدى مجموعتي المرضى ومجموعة الاصحاء .  
A - فرط نشاط الغدة الدرقية

بينت النتائج لجين ( CTLA-4+49A/G ) في الجدول ( 8 ) ان نسب تردد الطراز البري ( A/A ) لدى مجموعة الاصحاء و مرضى فرط نشاط الغدة الدرقية هي ( 50% ) و ( 25% ) على التوالي ولوحظ وجود ارتباط بين ( CTLA-4+49A/G ) و حدوث الإصابة اذ ان خطر الإصابة يزداد بمقدار مرتين لدى المرضى مقارنة بمجموعة الاصحاء ( OR= 2.9 ; 95% CI= 0.946 – 4.624 ) عند وجود الطراز الطافر المتباين ( A/G )، و كذلك تزداد نسبة الخطورة بمقدار اربع مرات لدى المرضى مقارنة بمجموعة الاصحاء عند وجود الطراز الطافر المتجانس ( G/G ) ( OR= 4.11; 95% CI= 1.888 – 8.951 )

جدول ( 8 ) : الطرز الجينية لجين CTLA-4 ( +49A/G ) لمرضى فرط نشاط الدرقية ومجموعة الاصحاء و لكلا الجنسين .

الطرز الوراثية	الاصحاء	المرضى	*OR	*95% CI
A/A	40(50%)	20(25%)	1.0	————
A/G	22(27.5%)	23(28.75%)	2.09	0.946 – 4.624
G/G	18(22.5%)	37(46.25)	4.11	1.888 – 8.951

\* OR ( Odd Ratio ) \*95% CI ( Confidence Interval)

A - قصور نشاط الغدة الدرقية

و اظهرت النتائج جدول ( 9 ) ان نسبة تردد الطراز البري ( A/A ) لدى مرضى قصور الغدة الدرقية هي ( 31.25% ) و ان خطر الإصابة يزداد بمقدار ثلاث مرات لدى المرضى مقارنة بمجموعة الاصحاء عند وجود الطراز الطافر المتجانس ( G/G )

( 95% CI= 1.415 – 6.456 ) و بالمقابل لوحظ ان خطر الاصابة بقصور نشاط الغدة الدرقية يزداد مرة ونصف عند وجود الطراز الطافر المتباين ( A/G ) ( OR=1.52 )

جدول ( 9 ) : الطرز الجينية لجين ( +49A/G ) CTLA-4 لمرضى قصور نشاط الدرقية ومجموعة الاصحاء و لكلا الجنسين .

الطرز الوراثية	الاصحاء	المرضى	OR	95% CI
A/A	40(50%)	25(31.25%)	1.0	—
A/G	22(27.5%)	21(26.25%)	1.52	0.701 – 3.329
G/G	18(22.5%)	34(42.5%)	3.02	1.415 – 6.456

\* OR ( Odds Ratio )

\*95% CI ( Confidence Interval)

#### المناقشة

بيّنت نتائج الدراسة الحالية جدول ( 6 ) و جدول ( 7 ) عدم وجود ارتباط بين تعدد الاشكال الوراثي لجين CD28 IVS3+17C/T والإصابة باضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية في كلتا الحالتين فرط نشاط الغدة الدرقية وقصور نشاط الغدة الدرقية .

اما نتائج جدول (8) و جدول ( 9 ) فقد بينت وجود علاقة بين تعدد الاشكال الوراثي ( CTLA-4 +49A/G ) وخطر الإصابة باضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية في حالة فرط نشاط الغدة الدرقية عند وجود الطراز الطافر المتباين ( A/G ) وكذلك عند وجود الطراز الطافر المتجانس ( G/G ) . وكذلك قصور نشاط الغدة الدرقية عند وجود الطراز الطافر المتباين ( A/G ) وكذلك عند وجود الطراز الطافر المتجانس ( G/G ) .

نتائج الدراسة الحالية اتفقت مع نتائج دراسة ( Ban et al., ( 2003 ) الذي أيضاً لم يلاحظ وجود ارتباط بين تعدد الاشكال الوراثية لجين CD28 IVS3+17C/T وخطر الإصابة باضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية وكذلك وجد من خلال نتائج دراسته وجود ارتباط بين تعدد الاشكال الوراثية لجين CTLA-4 +49A/G وخطر الإصابة باضطرابات المناعة الذاتية للغدة الدرقية . اما ( Pawlak-Adamska et al., ( 2017 ) فقد وجد ان تعدد الاشكال الوراثية لجين ( CD28 + IVS3 17T / C ) ولجين CTLA-4 +49A/G ارتبط بالإصابة بفرط نشاط الغدة الدرقية

قد تفسر نتائج الدراسة الحالية ان جين CTLA-4 له دور أساسي في التنظيم السلبي للاستجابة المناعية ( Sameem et al., 2015 ; Sepahi Paterson et al., 2015 ) . وربما في حالة نقص التعبير عن CTLA-4 قد تؤثر على عملية التسامح المناعي المحيطي والمركزي ( Klocke et al., 2016 ) . كذلك تسبب استجابات مناعية مفرطة ( Grosso and Jure- 2013 ) . اذ بينت الدراسات المختبرية على الفئران ان تعطيل دور CTLA-4 في الفئران جعلها تصاب بأمراض مناعية قاتلة اذ انها تموت في مرحلة عمرية مبكرة نتيجة تكاثر الخلايا اللمفاوية المفرط ( Schubert et al., 2014 ; Threlfall et al., 2015 ) . و ان من اهم العوامل التي تؤثر على عمل CTLA-4 هو تعدد الاشكال الوراثية ( +49A/G ) CTLA-4 ( Sameem et al., 2015 ) . اذ انه عند وجود الطراز الطافر المتجانس G / G يكون خطر للإصابة بأمراض المناعة الذاتية للغدة الدرقية اكبر مقارنة بوجود الطراز البري A / A ( Brzoza et al., 2014 ) . كما وجد ( et al., 2013 )

Pastuszek-Lewandoska في دراسته التي شملت مرضى قصور نشاط الغدة الدرقية ان تعدد الاشكال الوراثية لجين CTLA-4 (+49A/G) قد ارتبط بإنتاج مستويات مرتفعة من الاضداد الذاتية للغدة الدرقية . كذلك لاحظ ( 2016 ) *et al.*, Wojciechowska-Durczynska في دراسته ان مستوى تراكيز CTLA-4 في المصل كانت منخفضة لدى مرضى قصور نشاط الغدة الدرقية . وكذلك دراسة Shen *et al.*, ( 2016 ) الذي وجد ارتباط بين تعدد الاشكال الوراثية CTLA-4 +49A/G والاصابة بفقر نشاط الغدة الدرقية . و على العكس مما تقدم فإن ( 2017 ) *Narooie-Nejad et al.* لم يجد ارتباطاً بين تعدد الاشكال الوراثية +49A/G CTLA-4 والإصابة بقصور نشاط الغدة الدرقية لدى المرضى. وكذلك دراسة ( 2012 ) *AlFadhli et al.* التي لم تجد علاقة بين CTLA-4 +49A/G ومرض قصور نشاط الدرقية.

#### المصادر

- Al Shahrani, A. S., El-Metwally, A., Al-Surimi, K., Salih, S. B., Saleh, Y., Al-Shehri, A., & Ali, A. (2016).** The epidemiology of thyroid diseases in the Arab world: A systematic review. *Journal of Public Health and Epidemiology*, 8(2), 17-26.
- AlFadhli, S., & Nizam, R. (2014).** Differential expression of alternative splice variants of CTLA4 in Kuwaiti autoimmune disease patients. *Gene*, 534(2), 307-312.
- AlFadhli, S., AlMutawa, Q., Abbas, J. M., & Doi, S. A. (2012).** Association of Hashimoto's thyroiditis with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) and inducible co-stimulator (ICOS) genes in a Kuwaiti population. *Endocrine*, 43(3), 666-677.
- Ban, Y., Davies, T. F., Greenberg, D. A., Kissin, A., Marder, B., Murphy, B., ... & Tomer, Y. (2003).** Analysis of the CTLA-4, CD28, and inducible costimulator (ICOS) genes in autoimmune thyroid disease. *Genes and immunity*, 4(8), 586-593.
- Beier, K. C., Kallinich, T., & Hamelmann, E. (2007).** Master switches of T-cell activation and differentiation. *European Respiratory Journal*, 29(4), 804-812.
- Brzoza, Z., Grzeszczak, W., Rogala, B., Trautsolt, W., & Moczulski, D. (2014).** CTLA-4 polymorphism in the pathogenesis of chronic spontaneous autoreactive urticaria. *Allergologia et immunopathologia*, 42(3), 241-244.
- Chen, X. J., Gong, X. H., Yan, N., Meng, S., Qin, Q., Jiang, Y. F., ... & Zhang, J. A. (2015).** RNASET2 tag SNP but not CCR6 polymorphisms is associated with autoimmune thyroid diseases in the Chinese Han population. *BMC medical genetics*, 16(11), 1-8 .
- Effraimidis, G., & Wiersinga, W. M. (2014).** Mechanisms in endocrinology: autoimmune thyroid disease: old and new players. *European Journal of Endocrinology*, 170(6), R241-R252.

- Elshazli, R., Settin, A., & Salama, A. (2015).** Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4)+ 49 A> G gene polymorphism in Egyptian cases with rheumatoid arthritis. *Gene*, 558(1), 103-107.
- Farbod, M., Shiryazdi, S. M., Harazi, H., Nazari, T., & Sheikha, M. H. (2015).** Association between the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 polymorphisms and breast cancer risk and prognosis. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, Volume, 1(1), 16-20.
- Gaitonde, D. Y., Rowley, K. D., & Sweeney, L. B. (2012).** Hypothyroidism: an update. *South African Family Practice*, 54(5), 384-390.
- Galarza, P., Canitano, F., Botta, S., Domínguez, M. E., Roveto, S., Perusco, A., & Rimoldi, D. (2010).** Asociación de polimorfismos de simple nucleótido (SNP) de CD28 (IVS3+ 17T/C) Y CTLA-4 (+ 49A/G) con autoinmunidad tiroidea (AIT). *Revista argentina de endocrinología y metabolismo*, 47(2), 21-26.
- Grosso, J. F., & Jure-Kunkel, M. N. (2013).** CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immunity Archive*, 13(1), 1-14.
- Huang, C. J., & Jap, T. S. (2015).** A systematic review of genetic studies of thyroid disorders in Taiwan. *Journal of the Chinese Medical Association*, 78(3), 145-153.
- Idrose, A. M. (2015).** Acute and emergency care for thyrotoxicosis and thyroid storm. *Acute Medicine & Surgery*, 2(3), 147-157.
- Klocke, K., Sakaguchi, S., Holmdahl, R., & Wing, K. (2016).** Induction of autoimmune disease by deletion of CTLA-4 in mice in adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201603892.
- Kuehn, H. S., Ouyang, W., Lo, B., Deenick, E. K., Niemela, J. E., Avery, D. T., ... & Frucht, D. M. (2014).** Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science*, 345(6204), 1623-1627.
- Ledezma-Lozano, I. Y., Padilla-Martinez, J. J., Leyva-Torres, S. D., Parra-Rojas, I., Ramirez-Duenas, M. G., Pereira-Suárez, A. L., ... & Muñoz-Valle, J. F. (2011).** Association of CD28 IVS3. *Disease markers*, 30(1), 25-29.
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., & Bluestone, J. A. (1996).** CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual review of immunology*, 14(1), 233-258.
- Liu, J., & Zhang, H. X. (2013).** CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a comprehensive meta-analysis. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 17(3), 226-231.

- Marron, M. P., Raffel, L. J., Garchon, H. J., Jacob, C. O., Serrano-Rios, M., Larrad, M. T. M., ... & Tao, Y. W. (1997).** Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Human molecular genetics*, 6(8), 1275-1282.
- Minhas, S., Bhalla, S., Shokeen, Y., Jauhri, M., Saxena, R., Verma, I. C., & Aggarwal, S. (2014).** Lack of any association of the CTLA-4+ 49 G/A polymorphism with breast cancer risk in a North Indian population. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 15(5), 2035-2038.
- Nakao, F., Ihara, K., Ahmed, S., Sasaki, Y., Kusuhara, K., Takabayashi, A., ... & Hara, T. (2000).** Lack of association between CD28/CTLA-4 gene polymorphisms and atopic asthma in the Japanese population. *Experimental and clinical immunogenetics*, 17(4), 179-184.
- Narooie-Nejad, M., Taji, O., TAMANDANI, D. M. K., & Kaykhaei, M. A. (2017).** Association of CTLA-4 gene polymorphisms-318C/T and+ 49A/G and Hashimoto's thyroiditis in Zahedan, Iran. *Biomedical Reports*, 6(1), 108-112.
- Pastuszek-Lewandoska, D., Domańska, D., Rudzińska, M., Bossowski, A., Kucharska, A., Sewerynek, E., ... & Czarnocka, B. (2013).** CTLA-4 polymorphisms (+ 49 A/G and-318 C/T) are important genetic determinants of AITD susceptibility and predisposition to high levels of thyroid autoantibodies in Polish children-preliminary study. *Acta Biochim Pol*, 60(4), 641-646.
- Paterson, A. M., Lovitch, S. B., Sage, P. T., Juneja, V. R., Lee, Y., Trombley, J. D., ... & Freeman, G. J. (2015).** Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 212(10), 1603-1621.
- Pawlak-Adamska, E., ... & Jasek, M. (2015).** Polymorphisms in CD28, CTLA-4, CD80 and CD86 genes may influence the risk of multiple sclerosis and its age of onset. *Journal of neuroimmunology*, 288, 79-86.
- Pawlak-Adamska, E., Frydecka, I., Bolanowski, M., Tomkiewicz, A., Jonkisz, A., Karabon, L., ... & Daroszewski, J. (2017).** CD28/CTLA-4/ICOS haplotypes confers susceptibility to Graves' disease and modulates clinical phenotype of disease. *Endocrine*, 55(1), 186-199.
- Rudd, C. E., Taylor, A., & Schneider, H. (2009).** CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews*, 229(1), 12-26.
- Sambrook, k.; Fritsh, E. and maniatitis, T. (1989).** *molecular cloning laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed., cold spring Harbor laboratory prees .U.S.A.
- Sameem, M., Rani, A., Bashir, R., Riaz, N., Batool, S. A., Irfan, S., ... & Nawaz, S. K. (2015).** CTLA-4+ 49 Polymorphism and Susceptibility to Rheumatoid Arthritis in Pakistani Population. *Pakistan J. Zool*, 47(6), 1731-1737.

**Sehgal, V., Bajwa, S. J. S., Sehgal, R., & Bajaj, A. (2014).** Clinical conundrums in management of hypothyroidism in critically ill geriatric patients. *International journal of endocrinology and metabolism*, 12(1),1-7.

**Schubert, D., Bode, C., Kenefeck, R., Hou, T. Z., Wing, J. B., Kennedy, A., ... & Unger, S. (2014).** Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nature medicine*, 20(12), 1410-1416.

**Shen, G. S., Zhao, J. D., Liu, Z., Cheng, S. S., & Wu, Q. (2016).** Autoimmune thyroid disease and PTPN22 gene polymorphisms of the correlation analysis. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE*, 9(7), 14754-14757.

**Sepahi, S., Pasdar, A., Gerayli, S., Rostami, S., Gholoobi, A., & Meshkat, Z. (2017).** CTLA-4 Gene Haplotypes and the Risk of Chronic Hepatitis C Infection; a Case Control Study. *Addiction*, 31(47.69), 0-05.

**Threlfall, A. J., Boag, A. M., Soutter, F., Glanemann, B., Syme, H. M., & Catchpole, B. (2015).** Analysis of DLA-DQB1 and polymorphisms in CTLA4 in Cocker spaniels affected with immune-mediated haemolytic anaemia. *Canine Genetics and Epidemiology*, 2(1), 8.

**Wojciechowska-Durczynska, K., Krawczyk-Rusiecka, K., Zygmunt, A., Stawerska, R., & Lewinski, A. (2016).** In children with autoimmune thyroiditis CTLA4 and FCRL3 genes-but not PTPN22-are overexpressed when compared to adults. *Neuro endocrinology letters*, 37(1), 65-69.

**Wolff, A. S. B., Mitchell, A. L., Cordell, H. J., Short, A., Skinningsrud, B., Ollier, W., ... & Undlien, D. (2015).** CTLA-4 as a genetic determinant in autoimmune Addison's disease. *Genes and immunity*, 16(6), 430-436.

**Xiaoheng, C., Yizhou, M., Bei, H., Huilong, L., Xin, W., Rui, H., ... & Zhiguo, D.(2017).** Cytokine-related Genes and Polymorphism in Autoimmune Thyroid Diseases.

**Yadav, N. K., Thanpari, C., Shrewastwa, M. K., Sathian, B., & Mittal, R. K. (2013).** Socio demographic wise risk assessment of thyroid function abnormalities in far western region of Nepal: A hospital based descriptive study. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(2), 150-154.

**Yoo, H. Y., Kim, P., Kim, W. S., Lee, S. H., Kim, S., Kang, S. Y., ... & Ko, Y. H. (2016).** Frequent CTLA4-CD28 gene fusion in diverse types of T cell lymphoma. *haematologica*, haematol-2015.