



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Förekomst av B- och T-lymfocyter i hypofysen hos hund

Marcus Blomqvist

*Uppsala
2018*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2018:18*

Förekomst av B- och T-lymfocyter i hypofysen hos hund

Presence of B- and T-lymphocytes in the canine pituitary gland

Marcus Blomqvist

Handledare: Jeanette Hanson, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Cecilia Ley, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Helene Hamlin, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0830

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Delnummer i serie: Examensarbete 2018:18

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: hypofysit, hypofys, hund, lymfocyt, CD3, CD79a

Keywords: hypophysitis, hypophysis, pituitary gland, canine, dog, lymphocyte, CD3, CD79a

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Hypofysen är kroppens hormonella styrcentral och är belägen nedanför hjärnan i anslutning till hypotalamus. Från hypofysen insöndras hormoner i blodet som i sin tur stimulerar hormonproducerande körtlar i kroppen att utsöndra sina hormoner.

Hypofysit, d.v.s. inflammation i hypofysen, är ett ovanligt men väl beskrivet sjukdomskomplex hos människa. Symtom och kliniska sjukdomstecken anses framför allt vara kopplade till expansion av hypofysen och kompression av omgivande strukturer; och hypopituitarism. Fall av hypofysit har beskrivits hos hund som uppvisat tydliga likheter med det misstänkt autoimmuna tillståndet lymfocytär hypofysit (LYH) hos människa.

Lymfocyter anses inte förekomma normalt i hypofysen hos hund, trots att sådana studier saknas. Lymfocytinfiltrat har m.h.a. immunohistokemi (IHC) kunnat påvisas hos hästar utan misstanke om hypofysit. Hos människa är prevalensen okänd men lymfocytinfiltrat har beskrivits och misstänks vara en normalvariation.

I denna studie undersöktes förekomst av lymfocyter i hypofysen hos hund. Provmaterialet bestod av hypofysvävnad från 20 hundar utan misstanke om hypofysit som inkommit för rutinobduktion vid institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF) vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU). Genom IHC med anti-CD3- och anti-CD79a-antikroppar för att detektera T- respektive B-celler kunde enstaka diffust spridda CD3+ celler påvisas hos samtliga hundar. Signifikanta skillnader gällande antal CD3+ celler per areaenhet (CPA) kunde ses mellan olika delar i hypofysen. Antalet CD3+ CPA var som högst i pars tuberalis och som lägst i infundibulum. Avvikande höga antal CD3+ CPA sågs hos två hundar. Sektionsdiagnos hos dessa hundar var multicentriskt malignt lymfom respektive hypofysadenom. I det förstnämnda fallet sågs även en kraftig infiltration av CD79a+ celler. I övrigt påvisades ett mycket litet antal CD79a+ celler hos 6 hundar.

Resultaten från denna studie indikerar att T-lymfocyter förekommer i hypofysen hos hund, även hos hundar utan misstanke om hypofysit. Det låga antalet CD79a+ celler tyder på att förekomsten av B-lymfocyter är låg.

SUMMARY

The pituitary gland, or hypophysis, is often referred to as the "master gland". It controls the production and secretion of hormones by peripheral endocrine glands. The pituitary gland is situated ventral to the hypothalamus in the hypophyseal fossa.

Hypophysitis, i.e. inflammation of the pituitary gland, is an uncommon but well described group of diseases in humans. Clinical signs and symptoms are associated with pituitary dysfunction and compression of surrounding tissues. A few cases of hypophysitis have been reported in dogs and seem to resemble lymphocytic hypophysitis (LYH) in humans, a disease of suspected autoimmune origin.

There is a common assumption that lymphocytes are not normally found in the canine pituitary gland, although there is a paucity of studies to confirm this. In a recent study of pituitary glands in horses without clinical suspicion of hypophysitis, a small number of lymphocytes was detected by immunohistochemistry (IHC). Presence of lymphocytes in the human pituitary gland, with no other findings of pituitary disorder, has been reported.

The purpose of the present study was to investigate presence of lymphocytes in the canine pituitary gland. Pituitary tissue was collected at necropsy from 20 dogs, without clinical suspicion of hypophysitis, at the Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health of Swedish University of Agricultural Sciences in Uppsala. Immunohistochemistry with antibodies specific for the B-cell marker CD79a and the T-cell marker CD3 was performed. Occasional scattered CD3+ cells were found in the pituitary gland of all dogs examined. There were statistically significant differences in number of CD3+ cells per area unit (CPA) between different parts of the gland. The highest CD3+ CPA was found in the pars tuberalis. The lowest CD3+ CPA was found in the infundibulum. Two dogs had a markedly higher CD3+ CPA. One of these dogs also had a heavy infiltration of CD79a+ cells throughout the pituitary gland, and was diagnosed with multicentric malignant lymphoma at necropsy. The other dog showed a pituitary adenoma. A very low number of CD79a+ cells were found in additional 6 dogs.

The results shows that a small number of T-cells is a common finding in the pituitary gland of dogs, and that the presence of B-cells is low.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Hypofysens anatomi och fysiologi	2
<i>Hypofysens anatomiska omgivning</i>	2
<i>Hypofysens anatomi</i>	2
<i>Hypofysens och hypotalamus samspel</i>	3
<i>Hypofyshormoner</i>	4
Histologi	6
Hypofysit	7
<i>Hypopituitarism</i>	7
<i>Kompression till följd av expansion av hypofysen</i>	7
<i>Hypofysit hos människa</i>	8
<i>Hypofysit hos hund</i>	12
Lymfocyter i hypofysen	15
MATERIAL OCH METODER	16
Provmaterial	16
Insamling och hantering av provmaterial	16
Histologi	16
Immunohistokemi	17
Kvantifiering av CD3+ och CD79a+ celler	18
Statistisk analys	18
RESULTAT	21
Histologi	21
Immunohistokemi	22
DISKUSSION	26
Konklusion	29
TILLKÄNNAGIVANDEN	30
REFERENSER	31

FÖRKORTNINGAR

ACTH	Adrenokortikotropt hormon (eng.*, adrenocorticotropic hormone)
AVP	Argininvasopressin
BVF	Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
CPA	Celler per areaenhet
CRH	Kortikotropinfrisättande hormon (eng.*, corticotropin releasing hormone)
CSF	Cerebrospinalvätska (eng.*, cerebrospinal fluid)
DI	Diabetes insipidus
GH	Somatotropin (eng.*, growth hormone)
GRH	Granulomatös hypofysit
H&E	Hematoxylin och eosin
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG4	Immunoglobulin G4
IHC	Immunohistokemi (eng.*, immunohistochemistry)
IL-1	Interleukin-1
LYH	Lymfocytär hypofysit
MRT	Magnetresonanstomografi
PLH	Plasmacytär hypofysit/IgG4-relaterad hypofysit
POD	Peroxidasaktivitet
PU/PD	Polyuri och polydipsi
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
T ₃	Trijodtyronin
T ₄	Tyroxin
Tris-EDTA	Trishydroxymetylaminometan-etylendiamintetraättiksyra
XH	Xantomatös hypofysit

* eng., engelska

INLEDNING

Hypofysen, eller undre hjärnbihanget, är kroppens hormonella styrcentral och är belägen nedanför hjärnan i anslutning till hypotalamus. Från hypofysen insöndras hormoner i blodet som i sin tur stimulerar hormonproducerande körtlar i kroppen att utsöndra sina hormoner. Kortisol från binjurebarken, sköldkörtelhormon från sköldkörteln och könshormon från könskörtlarna är alla exempel på hormoner vars utsöndring regleras genom hypofysen.

Hypofysit, d.v.s. inflammation i hypofysen, är ett väl beskrivet sjukdomskomplex hos människa. Sett till litteraturen är fall av human hypofysit ovanliga, men sjukdomen kan mycket väl vara underdiagnosticerad (Bellastella *et al.*, 2003; Caturegli, 2007). Symtom och kliniska sjukdomstecken anses vara kopplade till två patofysiologiska mekanismer: kompression av omgivande vävnad till följd av expansion av hypofysen, och hypopituitarism. Den komprimerande effekten ger upphov till huvudvärk och synrubbningar. Hypopituitarism kan innefatta ett eller flera hypofyshormoner, där nedsatt produktion av adrenokortikotropt hormon (ACTH) är den vanligaste rubbningen (Caturegli *et al.*, 2005). Diabetes insipidus (DI) är inte en ovanlig följd till inflammationen.

Endast ett fåtal fall av hypofysit finns beskrivna hos hund (McAllister, 1991; Adissu *et al.*, 2010; Cramer *et al.* 2011; Wolfesberger *et al.*, 2011; Meij *et al.*, 2012; Polledo *et al.*, 2017). Flera av dessa har tydliga likheter med det misstänkt autoimmuna tillståndet lymfocytär hypofysit (LYH) hos människa, både vad gäller klinisk manifestation och histopatologi (McAllister, 1991; Adissu *et al.*, 2010; Wolfesberger *et al.*, 2011; Meij *et al.*, 2012). Kliniska sjukdomstecken inkluderar polyuri och polydipsi (PU/PD), neurologiska bortfall och påverkad medvetandegrad. Hypopituitarism har beskrivits i form av sekundär hypotyreoidism, sekundär hypoadrenokorticism, hyposomatotropism och central DI. Histopatologi har påvisat lymfocytinfiltrat i hypofysen, som bedöms motsvara de lymfocytinfiltrat som ses vid LYH hos människa (Caturegli *et al.*, 2005).

Det verkar allmänt vedertaget att lymfocyter inte förekommer normalt i hypofysen hos hund, trots att sådana studier saknas. I en nyligen publicerad studie på häst kunde lymfocyter påvisas hos samtliga undersökta hästar med hjälp av immunohistokemi (IHC) (Grau-Roma *et al.*, 2017). Vävnaden undersöktes först histologiskt av två patologer (European College of Veterinary Pathologists board-certified veterinary pathologists). I hälften av fallen kunde inga uppenbara lymfocyter identifieras genom infärgning med hematoxylin och eosin (H&E).

I denna studie undersöktes förekomst av lymfocyter i hypofysen hos hund. Dessutom jämfördes skillnader i förekomst av CD3+ T-celler mellan olika delar i hypofysen. Provmaterialet bestod av hypofysvävnad från 20 hundar som rutinobducerats vid institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF) vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) i Uppsala, och där ingen frågeställning gällande hypofysen gjorts av remitterande veterinär. Detta för att bättre kunna tolka fynd, eller misstänkta fall, av hypofysit hos detta djurslag. Förekomst av lymfocyter undersöktes histologiskt med ljusmikroskopi och med hjälp av IHC.

LITTERATURÖVERSIKT

Hypofysens anatomi och fysiologi

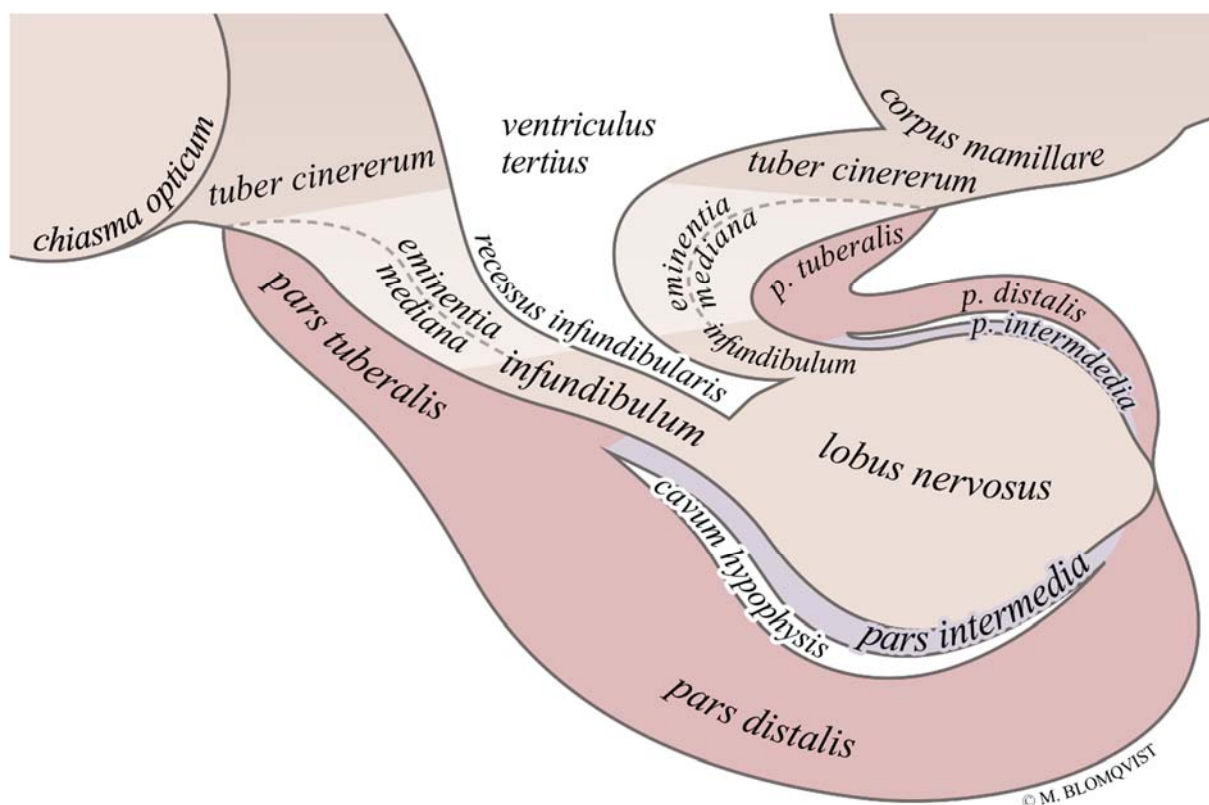
Hypofysens lokalisering med ett flertal känsliga strukturer i nära anslutning är av central betydelse för förståelse av patofysiologin vid såväl hypofysit som andra hypofysära patologier. Likaså är dess fysiologiska roll som hormonproducent och hormonell styrcentral avgörande i patogenesen. Hypofysen bildar en humoral förbindelse mellan det centralnervösa systemet och perifera endokrina körtlar. Till följd av de många mekanismer som kan påverkas i samband med patologiska tillstånd i hypofysen ses en skiftande klinisk bild.

Hypofysens anatomiska omgivning

Hypofysen, *hypophysis cerebri* (även *glandula pituitaria*), är belägen ventralt om diencephalon och ryms i en grund nedsänkning, *fossa hypophysialis*, dorsalt på *os basisphenoidale*. *Fossa hypophysialis* begränsas rostralt av en benkam, *tuberculum sellae*, och kaudalt av ett benutskott, *dorsum sellae*, vilka tydligt framhävs av lateralt sittande utskott, *processus clinoideus rostralis* resp. *caudalis*. Detta ger ett sadelliknande utseende och benämns därmed *sella turcica* (turkiska sadeln) (Evans & DeLahunta, 2013). Venösa hålrum, *sinus cavernosus* lateralt och *sinus intercavernosus* kaudalt (hos vissa hundar även rostralt), omger hypofysen och upptar utrymmet mellan inre och yttre lagret av *dura mater*, vilken delar sig där den passerar över *fossa hypophysialis* (Schwartz, 1936). Det yttre lagret följer väggarna ner i fossan medan det inre lagret fortsätter som ett tak, *diaphragma sellae*, över fossan fram till hypofysens stjälk för att sedan följa hypofysen som en tunn kapsel ner i fossan. *Diaphragma sellae* utgör viss teknisk utmaning för att avlägsna hypofysen intakt vid obduktion. *Sinus cavernosus* har en betydande roll i det venösa dränaget av hypofysen och hjärnan ventralt. Dessutom löper artärer såsom *a. carotis interna*, som försörjer hypofysen arteriellt, genom *sinus cavernosus*. Flera kranialnerv: *n. oculomotorius*, *n. trochlearis*, *n. abducens* och *n. ophthalmicus* (gren av *n. trigeminus*), har sitt förlopp i nära anslutning till hypofysen och *sinus cavernosus*. Rostralt om hypofysen finns *chiasma opticum*.

Hypofysens anatomi

Hypofysen har två embryonala ursprung vilket ger upphov till funktionellt och makroskopiskt skiljaktiga strukturer (Kingsbury & Roemer, 1940). Neurohypofysen utvecklas ur neuroektodermal vävnad som en förlängning av hypotalamus från *tuber cinereum*. Den proximala stjärken, *infundibulum*, övergår distalt i en något bredare struktur, *lobus nervosus*. Adenohypofysen har i stället oralt ektoderm från Rathkes ficka som ursprung. Efter att Rathkes ficka kommit i kontakt med primordiala neurohypofysen frigörs den från munhålan som en vesikel, *saccus adenohypophysis*, för att omge merparten av neurohypofysen och differentiera till de tre histoanatomiska delar som bildar adenohypofysen. *Pars intermedia adenohypophysis* (pars intermedia) är ursprungen ur det ektoderm som under embryogenesen adhererat till neurohypofysen. En kvarstående rest från vesikeln i form av ett hålrum, *cavum hypophysis*, separerar merparten av pars intermedia från *pars distalis adenohypophysis* (pars distalis). Pars distalis utgör adenohypofysens största del och övergår proximalt i *pars tuberalis adenohypophysis* (pars tuberalis) som omger *infundibulum* och delar av *tuber cinereum*. Hypofysens anatomi illustreras i figur 1.



Figur 1. Hypofysens anatomi hos hund. Benämningar enligt Nomina Anatomica Veterinaria 2012 med tillägg från Akmayev (1969; 1971).

Hypofysens och hypotalamus samspel

Tillsammans bildar hypofysen och hypotalamus en komplex funktionell enhet (Rijnberk & Kooistra, 2010). Hypofysens funktion som hormonproducent och hormonell styrcentral är starkt reglerad och avhängig hypotalamus, för upprätthållande av homeostas under olika fysiologiska förhållanden.

Neurohypofysens endokrina funktion erhålls genom neurosekretoriska celler vars perikaryon återfinns i främre hypotalamus, framför allt i *nucleus supraopticus* och *nucleus paraventricularis* (Akmayev, 1969). Axoner från dessa hormonproducerande neuron löper genom infundibulum och terminerar i lobus nervosus där de neurohypofysära hormonerna lagras i granula för att, efter neurondepolarisering, frisättas genom exocytos i systemiska cirkulationen (Van Den Pol *et al.*, 1990; Rijnberk & Kooistra, 2010).

Hypotalamus och adenohypofysen är sammankopplade genom ett portasystem. Axoner från neurosekretoriska celler i ventrala hypotalamus terminerar i anslutning till primära kapillärnätverket, *rete hemocapillare primarium*, som omger infundibulum och inkluderar kapillärer i pars tuberalis (Monroe, 1967; Akmayev, 1971; Watkins, 1975). I detta område är blod-hjärnbarriären inte intakt (Fink, 1986). De neurosekretoriska cellerna producerar neurohormoner vars huvudsakliga målceller, vilka i sin tur är hormonproducerande, är lokaliserade i adenohypofysen. Frisatta neurohormoner från axonerna diffunderar till primära kapillärnätverket för vidare transport via hypofysens portavener, *venulae portis hypophysis*, till sekundära kapillärnätverket, *rete hemocapillare secundus* (Akmayev, 1971). Det sekundära kapillärnätverket består av adenohypofysens talrika sinusoider som försörjer parenkymet och

därmed neurohormonernas målceller. Hypotalamus reglerar på så sätt adenohypofysens produktion och frisättning av hormoner, som efter insöndring i systemiska cirkulationen når sina respektive målorgan, i form av ett neurosekretoriskt eller neuroendokrint system.

Pars intermedia är per definition en del av adenohypofysen men kan betraktas som en egen fungerande enhet (Rijnberk & Kooistra, 2010). Reglering av pars intermedia sker som för övriga hypofysen genom hypotalamus, i detta fall genom direkt innervation av de endokrina cellerna. Företrädesvis är detta en inhiberande tonisk dopaminerg innervation.

Hypofyshormoner

Hypofysen beskrivs ofta som "the master gland" eftersom ett flertal hypofyshormoner stimulerar endokrina körtlar i kroppen att utsöndra sina hormoner. Hypofyshormonerna och deras huvudfunktion är sammanfattade i tabell 1.

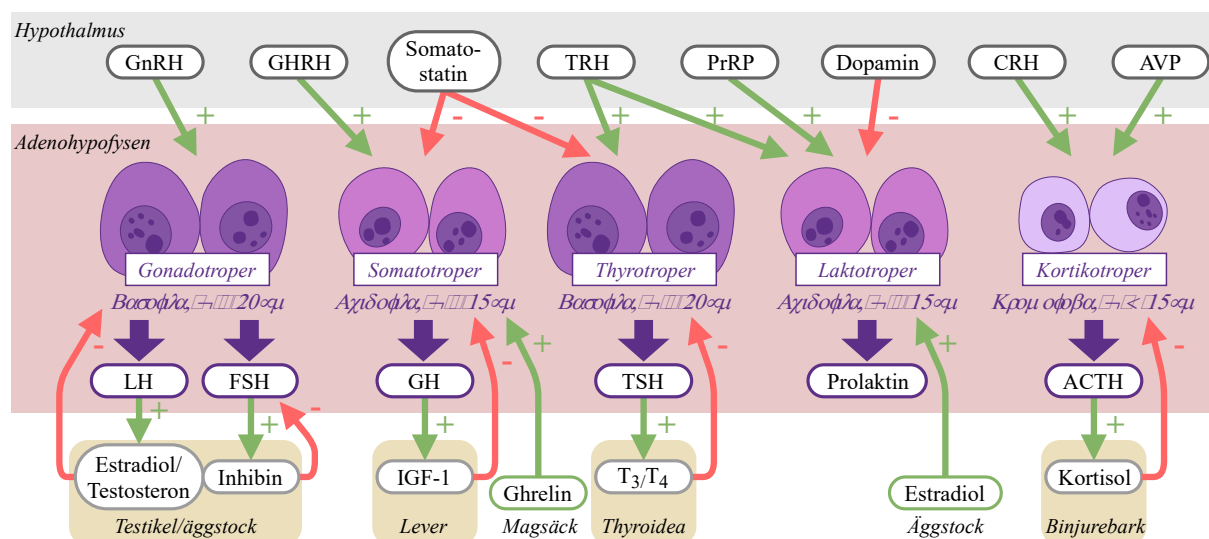
Tabell 1. *Hypofyshormoner och deras huvudfunktioner*

Hormon	Förkortn.	Huvudfunktion
Neurohypofysen		
Argininvasopressin	AVP	Stimulerar till ökad reabsorption av vatten i njurens samlingsrör genom translokation av intracellulära aquaporiner till apikala cellmembranet.
Oxytocin		Stimulerar mjölknedsläpp. Stimulerar myometriskontraktioner vid utdrivning av fostret. Stimulerar modersbeteende och välbefinnande.
Adenohypofysen		
Somatotropin (Growth hormone)	GH	Direkt (akut) katabol effekt: insulinantagonism inducerar lipolys och minskad glukotransport över cellmembranet. Indirekt (långsam) anabol effekt: stimulerar tillväxt genom Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) från levern.
Prolaktin	PRL	Essentiell luteotrop faktor hos hund för upprätthållande av progesteronsekretion under lutealfasen. Stimulerar mammogenes, laktogenes och galaktopoes.
Tyreoideastimulerande hormon	TSH	Stimulerar frisättning av trijodtyronin (T ₃) och tyroxin (T ₄) från sköldkörteln.
Adrenokortikotropt hormon	ACTH	Stimulerar produktion och frisättning av glukokortikoider och androgener från binjurebarken.
Luteiniserande hormon	LH	Stimulerar frisättning av testosteron från Leydigceller i testikeln (♂). Stimulerar frisättning av testosteron från thecaceller i äggstocken (♀). Inducerar ovulation och luteinisering samt upprätthåller gulekroppens aktivitet och stimulerar därmed sekretion av progesteron (♀).
Follikelstimulerande hormon	FSH	Stimulerar spermatogenes och frisättning av inhibin från sertoliceller i testikeln (♂). Stimulerar follikeltillväxt, frisättning av inhibin och konvertering av testosteron till estradiol i granulosaaceller i äggstocken (♀).

Tabell 1. Hypofyshormoner och deras huvudfunktioner (forts.)

Hormon	Förkortn.	Huvudfunktion
Pars intermedia		
α -Melanocyt-stimulerande hormon	α -MSH	Reglerar tyrosinasaktivitet hos melanocyter och därmed bildandet av hårpigmenten eumelanin och pheomelanin.
Adrenokortikotropt hormon	ACTH	Stimulerar produktion och frisättning av glukokortikoider och androgener från binjurebarken.

Reglering av hypofyshormonernas produktion och sekretion sker genom hypothalamus. De hormonproducerande cellerna i adenohypofysen regleras genom frisättnings- eller hämningsfaktorer från hypothalamus, s.k. neurohormoner, vars samspel på hypofysnivå är beskrivet i figur 2. Den adenohypofysära hormonproduktionen regleras även genom negativ återkoppling av sina respektive endokrina målorgans hormoner (long-loop feedback), både direkt i hypofysen och indirekt i hypothalamus där målorganens hormoner reglerar neurohormonernas sekretion. Till exempel stimulerar kortikotropinfrisättande hormon (CRH) från hypothalamus frisättning av ACTH från adenohypofysen. ACTH stimulerar i sin tur frisättning av glukokortikoider från binjurebarken. Negativ återkoppling sker genom att glukokortikoider inhiberar frisättning av både CRH och ACTH i hypothalamus respektive hypofysen. I fallet med hypothalamus-hypofys-binjurebark-axeln sker ytterligare reglering genom frisättning av argininvasopressin (AVP) från CRH-producerande hypothalamiska neuron i *nucleus paraventricularis* till adenohypofysens portasystem (Rijnberk & Kooistra, 2010). AVP stimulerar frisättning av ACTH. Proinflammatoriska cytokiner, i synnerhet interleukin-1 (IL-1), aktiverar hypothalamus-hypofys-binjurebark-axeln på hypothalamusnivå. ACTH-producerande celler finns också i pars intermedia men är hos hund i stort sett konstant inhiberade av dopamin. Vissa adenohypofysära hormoner, såsom prolaktin, har förmåga att reglera sin egen sekretion genom återkoppling till hypothalamus (short-loop feedback).



Figur 2. Adenohypofysens huvudtyper av endokrina celler och reglering av deras hormonproduktion på hypofysnivå (Rijnberk & Kooistra, 2010; Rosol & Gröne, 2015). Observera att negativ återkoppling sker genom målorganens hormoner på både hypofys- och hypothalamusnivå, där den senare ej är utritad i figuren.

Histologi

Neurohypofysen består av neurosekretoriska axoner, vars cellkroppar återfinns i hypotalamus. Majoriteten av dessa axoner är omyeliniserade (Monroe, 1967; Akmayev, 1969). Den i övrigt dominerande celltypen i neurohypofysen utgörs av stödjande gliaceller, även kallade pituicyter (Evans & DeLahunta, 2013).

Adenohypofysen är en välvaskulariserad vävnad, pars intermedia undantaget, bestående av hormonproducerande epitelioida celler vilka delas in i fem huvudtyper baserat på det hormon cellen producerar, se figur 2 (Yeung *et al.*, 2006). Vissa celler uttrycker mer än en uppsättning neurohormonreceptorer och producerar mer än ett hormon vilket ger hypofysen viss plasticitet för att kunna ställa om hormonproduktionen under särskilt krävande förhållanden såsom laktation och ovulation.

Vid standardinfärgning, med till exempel H&E, färgas adenohypofysens celler in olika beroende på innehåll i cytoplasmatiska granula (Rosol & Gröne, 2015). Acidofila celler har affinitet för färg med lågt pH, till exempel eosin. Till denna grupp hör laktotroper (luteotroper) och somatotroper. Basofila celler har affinitet för färg med högt pH, till exempel hematoxylin. Till denna grupp hör gonadotroper och tyrotroper. Cytoplasma hos kromofoba celler färgar in sämre eller inte alls. Till denna grupp hör kortikotroper, α -MSH-producerande celler, follikulostellära celler (eng., folliculostellate cells), degranulerade kromofila celler och odifferentierade embryonala stamceller.

Pars distalis består av epitelioida celler ordnade i små oregelbundna kluster omgivna av sinusoider tillhörande det sekundära kapillärnätverket. Hur cellerna är organiserade i förhållande till varandra påverkar mängden hormon som frisätts vid stimulering (Le Tissier *et al.*, 2012). Cytoplasmatiska utskott från keratinpositiva follikulostellära celler fungerar stödjande åt de epitelioida cellerna (Yeung *et al.*, 2006). Dessa stödjande celler är icke-hormonproducerande och har föreslagits som hypofysära stamceller (Rijn *et al.*, 2013). De skulle även kunna besitta fagocyterande och antigenpresenterande egenskaper (Rosol & Gröne, 2015).

Pars tuberalis fungerar som en byggnadsstomme till hypofysens primära kapillärnätverk, där sinusoiderna är separerade från varandra genom strängar och kluster av, i huvudsak kromofoba eller svagt basofila, epitelioida cylinderceller (Bacha & Bacha, 2012; Evans & DeLahunta, 2013). Här finns även follikulostellära celler vilka tros ansvara för bildandet av de kolloidfyllda folliklar som förekommer i pars tuberalis (Rosol & Gröne, 2015).

Pars intermedia saknar vanligtvis sinusoider och försörjs av piala kärl som utlinjerar neurohypofysens utsida. Parenkymet består av ett pseudostratifierat cylinderepitel med basofila celler samt follikulostellära celler (Rosol & Gröne, 2015). Kolloidfyllda folliklar är vanligt förekommande.

Hypofysit

Hypofysit, d.v.s. inflammation i hypofysen, är ett väl beskrivet sjukdomskomplex hos människa även om fallen är sällsynta. Incidensen har skattats till 1 nytt fall per 7-9 miljoner personer och år (Faje, 2016). Tillståndets kliniska manifestationer är framför allt kopplade till kompression av omgivande strukturer, orsakad av expansion av hypofysen, och hypopituitarism (Caturegli *et al.*, 2005). Den något ospecifika sjukdomsbilden förekommer även vid andra patologiska tillstånd, vilka i regel är placerade högre upp på differential-diagnoslistan.

Enstaka sporadiska fall av hypofysit finns beskrivna i den veterinärmedicinska litteraturen. Definition och klassificering från humansidan har då tillämpats. Förutom hos hund har fall av hypofysit även rapporterats hos katt och häst (Rudinsky *et al.*, 2015; Grau-Roma *et al.*, 2017).

Hypopituitarism

I början av förra seklet beskrev Reford & Cushing (1909) hur hundar som genomgått experimentell total hypofysektomi inom två dygn utvecklade letargi, för att sedan hamna i ett komatöst tillstånd med låg andningsfrekvens, svag puls och hypotermi. Kort därefter avled hundarna. Två år tidigare hade Palescu gjort liknande observationer där samtliga 22 hundar och 12 katter dött inom tre dygn efter total hypofysektomi (Medvei, 2012). Reford & Cushing (1909) kom därmed till slutsatsen: "a total hypophysectomy is incompatible with the continuance of life".

Hypopituitarism beskriver ett tillstånd med delvis eller fullständigt nedsatt produktion av hypofyshormoner (Studdert *et al.*, 2012). Insufficiensen kan vara isolerad till ett hormon, eller innefatta flera. Nedsatt produktion av samtliga hypofyshormoner, inklusive neurohypofysära hormoner, benämns panhypopituitarism.

Hypofysär dvärgväxt, vilket ges av en kongenitalt nedsatt produktion av somatotropin (GH), är kanske den mest välbekanta formen av hypopituitarism hos hund (Rijnberk & Kooistra, 2010). Spontant uppkommen hypopituitarism har rapporterats i samband med bl.a. hypofysära adenom, lymfom och kraniofaryngiom; vilka genom kompression orsakar atrofi av hypofysen (Barr, 1985; Goossens *et al.*, 1995; Platt *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2008; Bolfa *et al.*, 2014). Insufficiensen har yttrat sig som central DI och sekundär hypoadrenokorticism. Hypopituitarism associerad med skalltrauma finns beskrivet med involvering av flera hypofyshormoner (Foley *et al.*, 2009).

Kompression till följd av expansion av hypofysen

Expansion av hypofysen, till exempel vid neoplasi, infiltration av inflammatoriska celler, blödning och cystabildning, kan dels ge kompression av hypofysen med eventuell hypopituitarism som följd, dels ge kompression av intilliggande strukturer. En suprasellär, dorsal, expansion kan orsaka tryck på *diaphragma sellae* och hypotalamus, medan en parasellär, lateral, expansion kan involvera *sinus cavernosus* och komprimera de intill löpande kranialnerverna (Rijnberk & Kooistra, 2010). Vid en mer rostral utbredning kan massan ge kompression av *chiasma opticum*. Sträckning av *dura mater* och involvering av *sinus cavernosus* anses vara den patofysiologiska förklaringen till den kraftiga huvudvärk som ofta beskrivs i samband med hypofystumörer hos människa. Levy *et al.* (2004) kunde dock inte

påvisa något samband mellan hypofysens storlek och huvudvärkens svårighetsgrad. Ingen korrelation sågs heller mellan involvering av *sinus cavernosus* och huvudvärk.

Blindhet är ett av de sjukdomstecken som ses till följd av hypofysär massa hos både hund och människa, vilket förmodas bero på kompression av *chiasma opticum* (Rijnberk & Kooistra, 2010). I en studie med 70 hundar med hypofysberoende hyperadrenokorticism uppvisade 17 hundar tecken på blindhet, varav endast två hade en radiologiskt påvisbar kompression av *chiasma opticum* (Cabrera Blatter *et al.*, 2012). Detta kan indikera att en annan patofysiologisk mekanism än direkt kompression av synnervskorsningen orsakar blindhet hos denna patientgrupp.

En parasellär expansion med involvering av *sinus cavernosus* kan ge bortfall av *n. oculomotorius*, *n. trochlearis*, *n. abducens* och *n. ophthalmicus* vilka löper i, eller i direkt anslutning, till de venösa hålrummen lateralt om hypofysen (Theisen *et al.*, 1996). Om bortfallet omfattar fler än en av dessa kranialnerv benämns detta sinus cavernosussyndrom. Kliniskt yttrar sig detta som oftalmopares eller oftalmoplegi, mydriasis, nedsatt pupillreflex, ptosis och nedsatt korneasensibilitet.

Differentialdiagnoser till hypofysär expansion innefattar allt från andra neurologiska till metabola sjukdomar såsom förhöjt intrakraniellt tryck och hepatisk encefalopati (Rijnberk & Kooistra, 2010).

Hypofysit hos människa

Hypofysit kan vara en svår diagnos att ställa då kliniska och radiologiska fynd överlappar med de som ses vid hypofysära och andra sellära tumörer (Bellastella *et al.*, 2003). Incidensen av hypofysit med 1 nytt fall per 7-9 miljoner personer och år kan jämföras med den i en studie uppskattade prevalensen för hypofysära adenom på 16,7% (Ezzat *et al.*, 2004; Faje, 2016). I och med svårigheter att diagnosticera, eller överhuvudtaget erinra om hypofysit som möjlig differentialdiagnos, kan det vara en underdiagnosticerad sjukdom (Bellastella *et al.*, 2003; Caturegli, 2007). Likaså saknas data om eventuella subkliniska fall. Detta till trots finns ett stort antal publikationer inom ämnet. Övergripande konsensus gällande klassificering av hypofysit verkar finnas och innefattar etiologi, anatomisk lokalisation samt histopatologisk utseende (Bellastella *et al.*, 2003; Caturegli *et al.*, 2005; Leporati *et al.*, 2011; Allix & Rohmer, 2015; Faje, 2016).

Indelning avseende etiologi

Hypofysit delas in i primär och sekundär form. Primär hypofysit beskriver en kronisk inflammation begränsad till hypofysen utan koppling till behandling med läkemedel, systemisk inflammation, infektion eller andra sjukdomar (Faje, 2016). Denna grupp av sjukdomar beskrivs vidare nedan under separat rubrik. Begreppet sekundär hypofysit introducerades av Sautner *et al.* (1995) som benämning på inflammation i hypofysen som spridits från omgivande vävnad. Till denna grupp hör inflammation orsakad av andra hypofysära patologier, såsom adenom och rupturerad Rathkes cysta; och andra sellära patologiska tillstånd, såsom meningiom och rupturerat kraniofaryngiom. Inflammationen är ofta fokal och lokaliserad i anslutning till den primära skadan. Senare har begreppet sekundär hypofysit även kommit att

innefatta hypofysit associerad med behandling med vissa farmaka samt hypofysit associerad med systemisk sjukdom (Bellastella *et al.*, 2003; Caturegli *et al.*, 2005).

Indelning avseende anatomisk lokalisation

Hypofysär inflammation lokaliserad till enbart adenohypofysen benämns adenohypofysit. Vid enbart inflammation i neurohypofysen och infundibulum benämns denna infundibuloneurohypofysit. Panhypofysit beskriver en inflammation som involverar både adeno- och neurohypofysen.

Indelning avseende histopatologiskt utseende

Den histopatologiska indelningen är framför allt baserad på observationer gjorda från fall av primär hypofysit. Fram till dags dato finns fyra vedertagna underklasser vilka innefattar LYH, granulomatös hypofysit (GRH), xantomatös hypofysit (XH) och plasmacytär hypofysit (PLH) (Leporati *et al.*, 2011; Faje, 2016). Den sistnämnda beskrevs så sent som 2007 (Wong *et al.*, 2007). Histopatologisk beskrivning av respektive underklass anges i tabell 2. Ytterligare en underklass i form av nekrotiserande hypofysit har föreslagits men finns än så länge bara beskriven i fyra fall (Caturegli & Iwama, 2013). Nekrotiserande hypofysit skulle kunna vara en manifestation av ett slutstadium av de övriga underklasserna (Caturegli *et al.*, 2005). Utöver de nämnda underklasserna förekommer även blandformer såsom lymfogranulomatös och xantogranulomatös hypofysit.

Tabell 2. Histopatologisk beskrivning av underklasser av human hypofysit

Primär hypofysit	Förkortn.	Histopatologisk beskrivning
Lymfocytär hypofysit	LYH	Lymfocytär infiltration med förekomst av plasmaceller och ev. myeloida celler. Utbredd fibros är vanligt förekommande. Lymfoida folliklar förekommer.
Granulomatös hypofysit	GRH	Infiltration av multinukleära jätteceller och makrofager vilka inte sällan bildar granulom, ibland av nekrotisk karaktär. Lymfocyter är vanligt förekommande och ibland ses plasmaceller. Fibros förekommer.
Xantomatös hypofysit	XH	Cystaliknande förändringar tillsammans med infiltration av lipidfyllda histiocyter (skumceller) och lymfocyter.
Plasmacytär hypofysit (IgG4-relaterad hypofysit)	PLH	Lymfoplasmacytär infiltration med >10 IgG4+ celler/high-power field (HPF).
Nekrotiserande hypofysit	NH	Diffus nekrotiserande destruktion av normalt parenkym omgivet av lymfocyter, plasmaceller och enstaka eosinofiler.

(Caturegli *et al.*, 2005; Hunn *et al.*, 2014; Hanna *et al.*, 2015; Leporati *et al.*, 2011)

Primär hypofysit

LYH är den vanligaste formen av primär hypofysit med totalt 390 kända fall mellan åren 1962-2013 (Caturegli & Iwama, 2013). LYH har blivit synonymt med autoimmun hypofysit trots att ett uppenbart autoantigen ännu inte kunnat påvisas (Caturegli *et al.*, 2008; Faje, 2016). Förekomst av isolerad lymfocytär adenohypofysit hos vissa individer, och isolerad lymfocytär infundibuloneurohypofysit hos andra, har dessutom väckt frågan om skilda autoantigen. Antagandet om en autoimmun etiologi bygger på indirekta bevis från djurmodeller med experimentellt inducerad hypofysit genom injektion av bl.a. emulsifierad hypofysvävnad hos

råtta och kanin (Caturegli *et al.*, 2005). Ytterligare indicier om autoimmunitet består av en ofta god behandlingseffekt med immunsuppressiva läkemedel och den stora andelen individer med samexisterande autoimmuna sjukdomar. Samtidig autoimmun sjukdom beskrivs i en femtedel av fallen med LYH och innefattar bl.a. kronisk lymfocytär tyreoidit (Hashimotos tyreoidit), autoimmunt polyendokrint syndrom typ 2 (Schmidts syndrom), toxisk diffus struma (Graves sjukdom) och systemisk lupus erythematosus (SLE). Hypofysära autoantikroppar har identifierats men ingen visat på avgörande roll i sjukdomsförloppet (Rao *et al.*, 2016).

GRH har beskrivits som både primär, även kallad idiopatisk GRH, och sekundär, till följd av bl.a. tuberkulos, syfilis, granulomatös polyangit och rupturerad Rathkes cysta. (Husain *et al.*, 2008; McLaughlin *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2013; Hunn *et al.*, 2014; Bricaire *et al.*, 2015). Idiopatisk GRH är den näst vanligaste formen av primär hypofysit (Caturegli & Iwama, 2013). Etiologin är ej klarlagd men autoimmunitet har föreslagits (Hunn *et al.*, 2014). Spekulationer har förekommit huruvida LYH och GRH är skilda patologiska tillstånd eller olika manifestationer av en och samma sjukdom (McKeel, 1984: se Caturegli *et al.*, 2005). Detta har föräntlets av fall där båda formerna histologiskt påvisats samtidigt (Madsen & Karluk, 2000; Gundurthi *et al.*, 2012). Tidigare sågs även epidemiologiska skillnader mellan LYH och GRH, men i takt med att nya fall tillkommit har dessa skillnader i stort sett utsuddats (Caturegli *et al.*, 2005; Hunn *et al.*, 2014).

XH karaktäriseras av infiltration av lipidfyllda histiocyter (xanthoma cells) och lymfocyter (Hanna *et al.*, 2015). Teorier kring etiologin innefattar infektion och autoimmunitet. Det förstnämnda på grund av dess likhet med xantomatösa förändringar i andra organ där en infektiös etiologi föreligger. Samexisterande autoimmuna sjukdomar i ett flertal fall kan vara en indikation på att patogenesen involverar autoimmuna mekanismer (Lin *et al.*, 2017).

PLH, eller IgG4-relaterad hypofysit, ingår som en del i samlingsbegreppet IgG4-relaterad sjukdom vilket är en multifokal systemisk sjukdom (Leporati *et al.*, 2011; Deshpande *et al.*, 2012). Vid PLH sker en infiltration av lymfocyter och plasmaceller som producerar immunoglobulin G4 (IgG4) i hypofysen, likt den som sker i andra organ drabbade av IgG4-relaterad sjukdom. Det är oklart vilken roll IgG4 har i patogenesen. Då detta anses vara en systemisk sjukdom, där hypofysen bara är ett av alla organ som kan affekteras, råder viss tveksamhet till klassificeringen av PLH som primär hypofysit (Faje, 2016).

Klinisk manifestation

Huvudvärk och synförändringar är de vanligaste rapporterade symtomen och kliniska sjukdomstecknen. Caturegli *et al.*, 2005; Hunn *et al.*, 2014). Klinisk debut sker vanligtvis genom dessa. Diplopi, eller dubbelseende, och kranialnervsbortfall på grund av parasellär kompression med involvering av *sinus cavernosus* är mindre vanligt.

Näst vanligast är förändringar i form av hypopituitarism gällande adenohypofysens hormoner (Caturegli *et al.*, 2005; Hunn *et al.*, 2014). Både vid LYH och GRH är sekundär hypoadrenokorticism den vanligaste rubbningen, följt av nedsatt produktion av TSH, gonadotropiner, GH och prolaktin. Liknande förändringar ses vid XH och PLH (Hanna *et al.*, 2015; Shikuma *et al.*, 2017).

Central DI förekommer vid samtliga former av primär hypofysit (Caturegli *et al.*, 2005; Hunn *et al.*, 2014; Hanna *et al.*, 2015; Shikuma *et al.*, 2017). Den kliniska yttringen PU/PD uppträder nästintill ovillkorligen vid isolerad lymfocytär infundibuloneurohypofysit och i merparten av fallen av lymfocytär panhypofysit, men är däremot mindre vanligt vid isolerad lymfocytär adenohypofysit. Det bör dock nämnas att samtidig hypokortisolism, vilket är vanligt förekommande vid lymfocytär adenohypofysit, har visat sig kunna maskera DI (Ohta *et al.*, 1991).

Epidemiologi

För LYH, GRH och XH gäller en könsfördelning där kvinnor utgör ungefär 75% av de rapporterade fallen (Caturegli *et al.*, 2005; Leporati *et al.*, 2011; Hunn *et al.*, 2014; Hanna *et al.*, 2015). LYH är dessutom starkt associerad med graviditet, ett samband som inte kunnat påvisas för GRH och XH. Medelåldern är 38 (± 15) år för LYH och XH, och 44,4 (± 15) år för GRH. Statistiken bygger på konstaterade fall genom histopatologi.

I en sammanställning av kända fall av PLH framgår att män utgör drygt 70% av fallen (Shikuma *et al.*, 2017). Medelåldern är 64,3 ($\pm 13,9$) år. Studien tillämpar diagnostiska kriterier framtagna av Leporati *et al.* (2011) för att diagnosticera PLH. Både köns- och ålderspredisposition särskiljer PLH från de övriga formerna av primär hypofysit.

Diagnostik

Histopatologisk analys krävs för definitiv diagnos även om det numer går att diagnosticera primär hypofysit med viss grad av säkerhet baserat på signalement, klinisk manifestation och bilddiagnostiska förändringar (Faje, 2016). Leporati *et al.* (2011) har definierat diagnostiska kriterier för PLH där histopatologisk undersökning inte nödvändigtvis måste ingå för ställande av diagnos.

Den kliniska manifestationen är långt från patognomon för hypofysit men en kombination av förändringar kan ge viss indikation om typ av sellär patologi (Howlett *et al.*, 2009). Till exempel förekommer hypopituitarism vid både hypofystumörer och hypofysit men innefattar oftare GH samt gonadotropiner vid tumörer, och ACTH samt TSH vid hypofysit.

Fynd vid magnetresonanstomografi (MRT) inkluderar symmetrisk förstoring av hypofysen, frånvaro av hyperintensitet i neurohypofysen på T1-bilder, homogen kontrastförstärkning och så kallad "empty sella" om sent i sjukdomsförloppet (Wisner & Zwingenberger, 2015).

Behandling

Behandling har historiskt bestått i att kirurgiskt reducera vävnaden genom hypofysektomi, för att minska kompression på omgivande strukturer, och/eller farmakologisk behandling med glukokortikoider (Caturegli *et al.*, 2005). Glukokortikoider fyller i detta avseende två funktioner: dels som antiinflammatorisk behandling, dels som substitutionsbehandling vid hypokortisolism till följd av ACTH-brist. Khare *et al.* (2015) anger att behandling med glukokortikoider kan ha en positiv effekt gällande remission av hypopituitarism. Framgångsrik behandling med andra immunsuppressiva preparat, såsom azatioprin, har beskrivits (Honegger *et al.*, 2015). Spontan resolution av förstoring av hypofysen med enbart understödjande behandling förekommer i ett flertal fall (Khare *et al.*, 2015; Honegger *et al.*, 2015).

Hypofysit hos hund

Endast ett fåtal konstaterade fall av hypofysit finns beskrivna hos hund, se tabell 3 (McAllister, 1991; Adissu *et al.*, 2010; Cramer *et al.* 2011; Wolfesberger *et al.*, 2011; Meij *et al.*, 2012; Polledo *et al.*, 2017). Ytterligare ett fall har rapporterats där en hund med misstänkt hypofysit blivit fullt kliniskt återställd efter insatt behandling med glukokortikoider, se tabell 3 (Rzechorzek *et al.*, 2017). Inga histopatologiska data finns tillgängliga från denna hund, varför en definitiv diagnos inte kunnat ställas enligt författaren.

Tabell 3. Fall av hypofysit hos hund

#	Ras	Ålder	Kön	Diagnos
Konstaterade fall				
1	Samojedhund	9,0 år	Hankastrat	Lymfoplasmacytär adenohypofysit och sebakös adenit
2	Pyrenéerhund	4,5 år	Honkastrat	Lymfocytär adenohypofysit och adrenalit med polyendokrint syndrom
3	Storpudel	7,0 år	Hane	Sellärt xantogranulom alt. xantogranulomatös hypofysit
4	Blandras	10,0 år	Honkastrat	Lymfoplasmacytär adenohypofysit med binjurebarksinsufficiens och giardiasis
5	Långhårig vorsteh	8,0 år	Hane	Lymfocytär hypofysit med central DI
6	Skotsk terrier	6,0 år	Hankastrat	Lymfocytär panhypofysit med spridning till hypotalamus och polyendokrint syndrom
Misstänkta fall				
7	Storpudel	1,5 år	Hankastrat	Misstänkt hypofysit med anopsi, hyposomatotropism och central diabetes insipidus som följd

(McAllister, 1991; Adissu *et al.*, 2010; Cramer *et al.* 2011; Wolfesberger *et al.*, 2011; Meij *et al.*, 2012; Rzechorzek *et al.*, 2017; Polledo *et al.*, 2017)

Lymfocytär infiltration, likt den som beskrivs vid human LYH, har kunnat påvisas i fem av totalt sex fall. En sellär inflammation av xantogranulomatös typ beskrivs i det sjätte fallet (Cramer *et al.* 2011). Xantogranulomatös hypofysit definieras som en blandform av XH och GRH (Leporati *et al.*, 2011). Hos denna hund kunde normal hypofysvävnad varken identifieras makroskopiskt eller mikroskopiskt. Det går därför inte avgöra huruvida den sellära inflammationen återger en primär eller sekundär hypofysit.

Klinisk manifestation

De kliniska sjukdomstecken som observerats är i första hand inappetens/anorexi, svaghet och letargi. Ökad törst och urinering sågs hos två hundar med konstaterad hypofysit, samt i det misstänkta fallet. Hos en av hundarna med konstaterad LYH var denna akut insättande medan hunden med sellärt xantogranulom hade en långvarig anamnes med PU/PD. Hur länge hunden i det misstänkta fallet hade haft PU/PD före primärbesöket hos veterinär framgår inte. Isostenuri respektive hypostenuri påvisades vid undersökning av urindensiteten hos hundarna med PU/PD.

Två av hundarna uppvisade neurologiska bortfall varav den ena utvecklade kramper och aggressivt beteende. Hos den andra hunden involverade inflammationen även hypotalamus.

Ingen av hundarna med konstaterad hypofysit utvecklade synrubbningar, vilket däremot hunden med misstänkt hypofysit gjorde. I det fallet var oftalmologisk undersökning samt elektoretinografi utan anmärkning, och MRT påvisade en kompression av *chiasma opticum*.

Hos en hund med konstaterad hypofysit beskrivs en långvarig anamnes med dermatit och blefarit som ej svarat på konventionell behandling. Hos denna hund var kliniska fynd koncentrerade till huden och en lymfoplasmacytär infiltration i adenohypofysen upptäcktes vid obduktion. Inga biokemiska eller endokrina analysdata finns tillgängliga från denna hund.

Endokrina avvikelser påvisades hos merparten av hundarna där analyser utförts, och kan i åtminstone två fall härledas till hypopituitarism. I övriga fall där hormonell underproduktion konstaterats, och hypofys-målorgan-axeln analyserats, kunde ingen uppenbar avvikelse på hypofysnivå påvisas. Dessutom förekom inflammatoriska processer i det underproducerande målorganet hos några av hundarna. Hos de två hundar med hypopituitarism yttrade sig denna som sekundär hypotyroidism, sekundär hypoadrenokorticism, hyposomatotropism och central DI. Hyposomatotropism sågs hos hunden med misstänkt hypofysit. En hund hade förhöjda ACTH-nivåer vilket misstänks vara till följd av akut systemisk inflammationsfas relaterad till sjukdomsförloppet (Meij *et al.*, 2012).

Suprasellär expansion på grund av hypofysär massa, orsakar i första hand kompression av hypotalamus där de supraoptiska och paraventrikulära kärnorna finns (Meij *et al.*, 2012). Kompression av neuron i dessa hypotalamiska kärnor där AVP syntetiseras kan därför ge upphov till central DI. Således kan en isolerad adenohypofysit, utan involvering av neurohypofysen, orsaka central DI om denna utövar kompression på hypotalamus.

Epidemiologi

Åldern hos hundarna med konstaterad hypofysit är 4,5-10 år. I det icke-bekräftade fallet var hunden bara 1,5 år gammal. Rzechorzek *et al.* (2017) föreslår att en okänd utlösande faktor under fosterperioden kan förklara individens unga ålder. Båda könen finns representerade, men en liten övervikt av hanhundar (67%) ses i det mycket begränsade materialet. Hundarna är av olika hundraser, se tabell 3.

Hos hälften av hundarna kunde samtidig inflammation i andra organ än hypofysen påvisas (McAllister, 1991; Adissu *et al.*, 2010; Cramer *et al.* 2011). Detta i form av sebakös adenit, adrenalit och tyreoidit vilka är starkt associerade med autoimmunitet. Hos hunden med sebakös adenit, och där lymfocytära infiltrat omgav hårfolliklarna, skulle ett gemensamt ytantigen som hypofysen och talgkörtlarna uttrycker kunna vara en förklaringsmodell till autoimmun patogenes (McAllister, 1991). Addisu *et al.* (2010) beskriver att deras fall, med samtidig adrenalit och sköldkörtelatrofi, motsvarar autoimmunt polyendokrint syndrom typ 2 (Schmidts syndrom) hos människa. Vid detta tillstånd föreligger 2 av de 3 endokrina huvudsjukdomarna: hypoadrenokorticism, hypotyroidism och/eller diabetes mellitus typ 1. Obduktionsdata saknas från en av hundarna (Meij *et al.*, 2012). Hypofysit påvisades i vävnad insamlad vid hypofysektomi i detta fall.

Diagnostik

För fastställande av definitiv diagnos och klassificering av hypofysär inflammation krävs histopatologisk undersökning genom hypofysektomi (Rzechorzek *et al.*, 2017). Eftersom behandling skiljer mellan olika sellära patologiska tillstånd rekommenderar både Meij *et al.* (2012) och Rzechorzek *et al.* (2017) att biopsi tas inför behandling. Post mortal undersökning av hypofysen rekommenderas även på alla hundar med oklar dödsorsak (Wolfesberger *et al.*, 2011).

Den relativt ospecifika och heterogena kliniska bilden har hos flera hundar föranlett analys av plasmanivåer av hypofyshormoner och/eller deras respektive målorganhormoner. Förändrade nivåer är dessvärre inte specifika för hypofysit men av betydelse för val av insatt behandling (Polledo *et al.*, 2017).

Bilddiagnostik i form av datortomografi och MRT har kunnat påvisa en sellär eller suprasellär massa hos de hundar där sådan undersökning utförts. Det går dock inte att genom bilddiagnostik särskilja ett icke-funktionellt adenom från hypofysit, varav det förstnämnda är betydligt vanligare förekommande (Meij *et al.*, 2012). Eventuellt kan en inhomogen kontrastförstärkt massa vid MRT styrka misstanken om inflammation (Polledo *et al.*, 2017).

Cerebrospinalvätska (CSF) provtogs i det misstänka fallet av hypofysit. Detta påvisade lymfocytär pleocytos vilket enligt författaren styrker en sannolikhetsdiagnos med lymfocytär hypofysit (Rzechorzek *et al.*, 2017).

Behandling

Framgångsrik behandling finns bara beskriven i ett fall (Rzechorzek *et al.*, 2017). Denna hund blev helt kliniskt återställd efter tolv dagar på insatt behandling med prednisolon (0,91 mg/kg, q24h, p.o.). Uppföljande bilddiagnostisk undersökning visade på total tillbakagång av förändringar. Glukokortikoidbehandling har bara initierats i ett fall för övriga hundar, och påbörjades då först två månader efter att kliniska sjukdomstecken debuterat (Adissu *et al.*, 2010). I övriga fall där misstanke om hypofysär expansion förelegat har behandling med glukokortikoider avståtts på grund av tumörmisstanke. Det är viktigt att känna igen primär hypofysit hos hund eftersom tillståndet kan vara självbegränsande och svara bra på medicinsk behandling (Meij *et al.*, 2012).

Som för övriga tillstånd med hypopituitarism består behandlingen av komplettering av hormonunderskottet (Rijnberk & Kooistra, 2010). Behandling med desmopressin och levotyroxin, för DI respektive hypotyroidism, finns beskriven hos de sju hundar som redovisats här.

Lymfocyter i hypofysen

Det verkar allmänt vedertaget att lymfocyter inte förekommer normalt i hypofysen, men här finns en lucka i litteraturen. Inga publicerade studier har kunnat hittas som undersöker förekomst av lymfocyter i hypofysen hos hund i större omfattning. Adissu *et al.* (2010) anger att hypofysvävnad från friska hundar användes som kontroll och att inga CD3+ eller CD79a+ celler kunde påvisas. Det framgår dock inte hur många hundar det handlar om. I en nyligen publicerad studie med 24 hästar kunde lymfocyter påvisas hos samtliga (Grau-Roma *et al.*, 2017). Hypofysen undersöktes histologiskt av två patologer (European College of Veterinary Pathologists board-certified veterinary pathologists). I hälften av fallen kunde inga uppenbara lymfocyter identifieras genom H&E-färgning, men genom IHC kunde ett mindre antal T-celler påvisas hos samtliga hästar. I en humanstudie påvisade Shanklin (1948; 1951) lymfocyter i hypofysen genom histologisk undersökning av H&E-färgade snitt hos 43 av 100 individer vid obduktion, där dödsorsaken ej kunde kopplas till patologi i hypofysen. Lymfocyttaggregaten var framför allt lokaliserade till pars intermedia. Ytterligare humanstudier indikerar att lymfocyter förekommer i hypofysen orelaterat till klinisk sjukdom men uppfattning gällande prevalens saknas än så länge (Caturegli *et al.*, 2005).

Samtliga former av primär hypofysit hos människa innehåller mer eller mindre inslag av lymfocytinfiltrat vars sammansättning divergerar något mellan studier. I ett flertal studier har T-celler förekommit i större proportion än B-celler vid både LYH och GRH (Hashimoto *et al.*, 1991; Fehn *et al.*, 1998; Gutenberg *et al.*, 2005; Mirocha *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2016). Tashiro *et al.* (2002) fann däremot lika andel T- och B-celler vid dessa tillstånd. CD4-CD8-kvoten skiljer också mellan studier. Gutenberg *et al.* (2005) anger CD4+ och CD8+ T-celler i lika förhållande oavsett histopatologisk underklass och att en ökad andel aktiva CD8+ T-celler ses vid kortare anamnes. En annan studie beskriver att vid LYH är $CD4+/CD8+ > 1$ och vid GRH är $CD4+/CD8+ < 1$ (Rao *et al.*, 2016).

Immunohistokemisk fenotypning av lymfocytinfiltratet vid hypofysit hos hund har gjorts i två fall. Adissu *et al.* (2010) påvisade B-celler (70%) i majoritet över T-celler (30%) celler, vilket står i kontrast till Meij *et al.* (2012) där infiltratet uteslutande bestod av T-celler.

För att bättre kunna tolka fynd av lymfocytinfiltrat, syftade denna studie till att undersöka förekomst av lymfocyter och i förekommande fall deras distribution, i hypofysen hos hund.

MATERIAL OCH METODER

Provmaterial

Provmaterialet bestod av hypofysvävnad från hundar som inkom för rutinobduktion till BVF vid SLU i Uppsala under tidsperioderna:

1. 28 november 2013 till 18 februari 2014
2. 13 april 2017 till 26 september 2017

Insamling skedde utan hänsyn till anamnes eller patologisk frågeställning. Undantag gällde hundar med frågeställning om intrakraniell patologi där hypofysen ej kunde reserveras åt denna studie. Ett inklusionskriterie, bestående av lägstaåldern tolv månader, tillämpades i efterhand på det insamlade materialet. Dessutom uteslöts tidigt insamlade preparat eftersom en viss inlärningssträcka, gällande anatomi och vävnadshantering, bidrog till att dessa var histologiskt svårbedömda.

Insamling och hantering av provmaterial

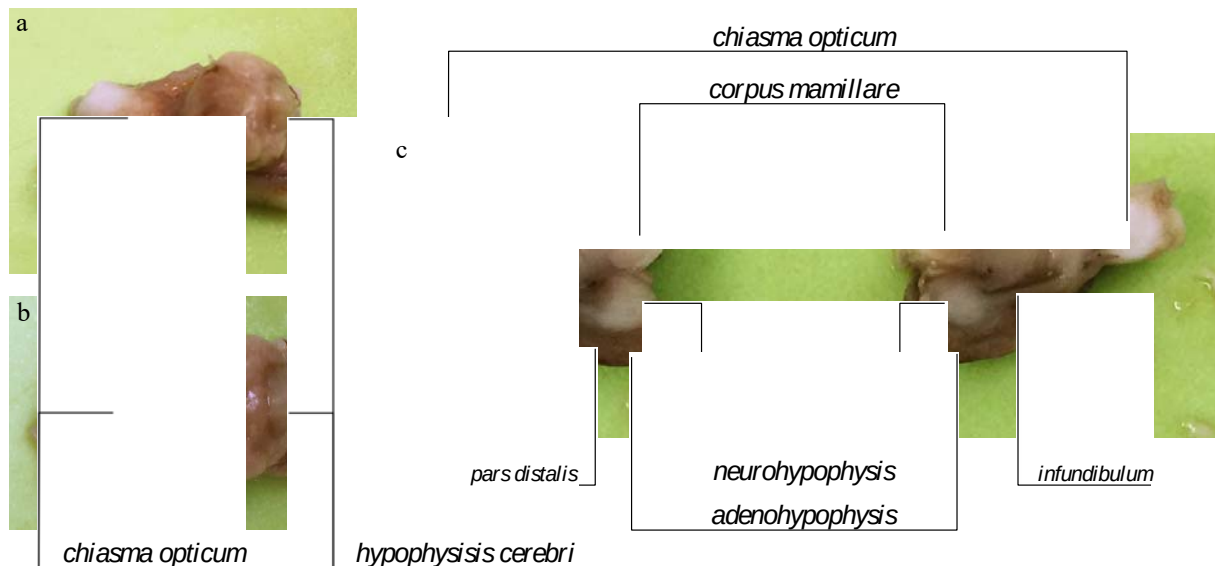
För att minimera graden av autolys i vävnaden så skedde insamling inom ett dygn efter avlivning. I två fall saknades exakt datering för insamling. Insamling kan då ha dröjt upp till tre dygn efter avlivning.

Genom att öppna upp skalltaget kaudodorsalt kunde hjärnan tas ut intakt ur kraniet. Eftersom *diaphragma sellae* innesluter hypofysen i *sella turcica* och anslutande kärl utövar en fasthållande verkan, dissekerades dessa försiktigt loss så hypofysen blev frilagd. Annars finns en övervägande risk att adenohypofysen blir kvar i *sella turcica*, medan neurohypofysen följer med hjärnan, vid urtagningen. Öppning av skalltak utfördes av obduktionstekniker

Efter urtagning gjordes en rektangulär incision runt hypofysen genom hypotalamus och synnerv, strax rostralt om synnervskorsningen, så att hypofysen separerades tillsammans med detta block. Synnervskorsningen användes senare som riktmärke för att lokalisera ventrala mittlinjen. Det rektangulära vävnadsblocket skars av dorsalt. Vävnaden lades sedan i 10% formalinlösning för fixering. Efter 1-2 dygn i formalinlösning gjordes ett midsagittalsnitt genom hypofysen, med synnervskorsningen som riktmärke. En formalinfixerad hypofys ses i figur 3. Vävnaden lades sedan åter i formalinlösning i avvaktan på vidare paraffininbäddning. Inbäddning av de formalinfixerade preparaten och därefter snittning till 4 µm tjocka vävnadssnitt utfördes av BVF vid SLU i Uppsala. Total tid i formalinlösning, från urtagning till inbäddning, var 1-4 dygn.

Histologi

De formalinfixerade paraffininbäddade vävnadssnitten färgades med H&E av BVF vid SLU i Uppsala för histologisk undersökning. De H&E-färgade preparaten bedömdes med avseende på förekomst av lymfocyter och tecken på andra förändringar.



Figur 3. Formalinfixerad hypofys med närliggande hypothalamus i a) lateroventral och b) ventral vy. c) samma provmaterial efter midsagittalsnitt, medial vy.

Immunohistokemi

IHC utfördes på de formalinfixerade paraffinbäddade preparaten som ytterligare analysmetod för påvisande av lymfocyter samt vidare fenotypning av lymfocytinfiltratet. Preparaten deparaffinerades i xylen och rehydrerades i sjunkande koncentrationer av alkohol enligt protokoll för IHC, se figur 4. Upphettning (92°C) med trishydroxymetylamino-metan-etylendiamintetraättiksyra (Tris-EDTA) i 20 min användes som ”antigen retrieval”. Blockering av endogen peroxidasaktivitet (POD) skedde genom inkubation i mörker med väteperoxid 3% i 5 min. Monoklonala mus-anti-human-CD3- och mus-anti-human-CD79a-antikroppar från Dako Denmark A/S, vilka är specificerade i figur 4^{D-E}, valdes för påvisande av T- respektive B-celler. Lymfknuta från hund 3 i tabell 4 utgjorde positiv kontroll. Hypofysvävnad från hundar som ingick i studien, där den primära antikroppen utelämnades, fungerade som negativ kontroll. Glas med vävnadssnitt som genomgår inkubering kan ses i figur 5. Avidin-biotin-peroxidas (VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit) och diamino-benzidine (ImmPACT DAB Peroxidase Substrate) från Vector Laboratories användes för infärgning, se figur 4^C. Spädning gjordes enligt anvisning från tillverkaren med undantag för den sekundära antikroppen. På grund av problem med bakgrundsfärgning späddes den sekundära antikroppen 1:800 (rekommenderad spädning 1:200). Dessutom tillsattes 1% normalserum från hund, se figur 4^F, till den sekundära antikroppen enligt förslag i tillverkarens felsökningsguide. Motfärgning gjordes med hematoxylin. Preparaten genomgick dehydrering i stigande koncentrationer av alkohol och klarning i xylen innan montering med pertex.

Preparaten bedömdes genom ljusmikroskopi. För att undvika risk för falskt positivt infärgade celler tillämpades följande kriterier, som samtliga var tvungna att vara uppfyllda, för att en infärgad cell skulle tolkas som lymfocyt:

1. Cellmorfologi av infärgad cell överensstämde med en lymfocyt, d.v.s. liten cell med rund till lätt indenterad cellkärna och sparsam mängd cytoplasma.
2. Infärgning av cytoplasma.
3. Infärgningen omgav en identifierbar cellkärna.

Uppenbara intravaskulära och intrasinusoidala CD3+ och CD79a+ celler exkluderades.

Kvantifiering av CD3+ och CD79a+ celler

För kvantifiering av CD3+ celler definierades 14 områden i hypofysen där antal CD3+ celler per areaenhet (CPA), med areaenheten kvadratmillimeter (mm^2), bestämdes på ett systematiskt och konsekvent sätt för respektive område, se figur 6. Arean beräknades genom ett okular med rutnät, 10×10 liksidiga rutor, där hela rutnätet mätte $0,0625 \text{ mm}^2$ ($0,000625 \text{ mm}^2/\text{ruta}$) vid $400\times$ förstoring. Arean för respektive område i figur 6 var mellan $0,065\text{--}0,5 \text{ mm}^2$ beroende på tillgänglig mängd material i preparatet.

För CD79a+ celler räknades det totala antalet celler per preparat.

Statistisk analys

Statistisk analys utfördes med R (v. 3.4.3, The R Foundation). Icke-parametriska test tillämpades. Skillings-Macks test användes för att undersöka skillnader i antal CD3+ CPA mellan hypofysens fem huvudsakliga histoanatomiska delar och där varje hund/preparat motsvarade ett block. Post-hoc-analys utfördes genom upprepade parvisa jämförelser mellan de olika delarna i hypofysen med Wilcoxons teckenrangtest och korrektion för multipla tester med Holm-Bonferronimetod. Mann-Whitneys test användes för att undersöka skillnader i antal CD3+ CPA mellan hundar med multicentriskt malignt lymfom och övriga hundar, samt mellan kastrerade och intakta hundar. Korrektion för multipla tester utfördes med Bonferronimetod genom multiplikation med 5.

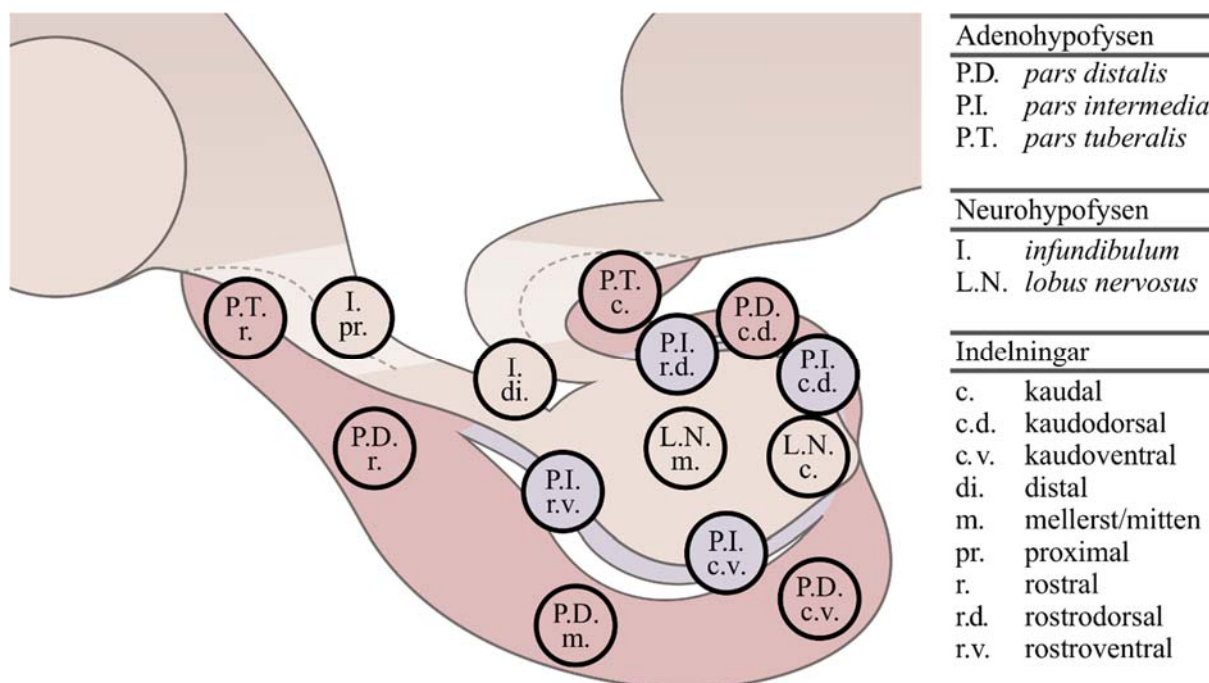
1.	Deparaffinering	Xylen, 3×5 min.
2.	Rehydrering	Alkohol 100%, 2×1 min ➔ Alkohol 95%, 2×1 min ➔ Alkohol 70%, 2×1 min ➔ Destillerat vatten, 5×1 min.
3.	Tvätt	TBST ^A 1X, 3×5 min.
4.	Antigen retrieval	Tris-EDTA ^B pH 9,0, i vattenbad 92°C, 20 min ➔ Låt svalna i Tris-EDTA-lösningen, rumstemperatur, 20 min.
5.	Tvätt	TBST ^A 1X, 3×5 min.
6.	Inringning	Ringa in snitten med penna.
7.	Blockering, endogen POD	Inkubera med H ₂ O ₂ 3% för blockering av endogen POD, i mörker, rumstemperatur, 5 min.
8.	Tvätt	TBST ^A 1X, 3×5 min.
9.	Blockering, ospecifik infärgning	Inkubera med blockeringsserum ^C , rumstemperatur, 20 min ➔ Avlägsna överflödigt serum efter inkubation.
10.	Primär antikropp	Inkubera med primär antikropp, CD3 ^D alt. CD79a ^E , rumstemperatur, 60 min. Negativ kontroll: inkubera med TBST i stället för primär antikropp!
11.	Tvätt	TBST ^A 1X, 3×5 min.
12.	Sekundär antikropp	Inkubera med sekundär antikropp ^{C,F} , kylskåp, 30 min.
13.	Tvätt	TBST ^A 1X, 3×5 min.
14.	ABC	Inkubera med ABC-reagent ^C , rumstemperatur, 30 min.
15.	Tvätt	TBST ^A 1X, 3×5 min.
16.	Infärgning ABC	Inkubera med kromogen, DAB ^G , rumstemperatur, 90 s.
17.	Sköljning	Rinnande kranvatten, 15 min.
18.	Kärnfärgning	Mayers Hematoxylin, 80 s.
19.	Sköljning	Rinnande kranvatten, 15 min.
20.	Dehydrering	Alkohol 70%, 2×10 s ➔ Alkohol 95%, 2×10 s ➔ Alkohol 100%, 1×10 s + 1×30 s.
21.	Klarning	Xylen, 2×10 s + 1×5 min.
22.	Montering	Montera täckglas med pertex.

A	Tris buffered saline/0,1% Tween-20 (TBST) 1X. Tillredning TBS 10X: Tris-HCl 24,23 g, NaCl 80,06 g, destillerat vatten 1000 ml, justera pH till 7,6 med HCl/NaOH.
B	Tris-EDTA 1X. Tillredning: Tris Base 1,21 g, EDTA 0,37 g, destillerat vatten 1000 ml, Tween 500 µl (0,05%), justera pH till 9,0 med HCl/NaOH.
C	VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit (Peroxidase, Mouse IgG), PK-6102 (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, California, USA). Innehåller blockeringsserum, sekundär antikropp och ABC-reagent. Spädes enligt medföljande anvisning med TBST 1X. OBS: sekundär antikropp spädes 1:800.
D	Monoclonal Mouse Anti-Human CD3, Clone F7.2.38, M7254, 138 mg/l (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). Spädes 1:400 med TBST 1X. Bedömning av hypofys från hund nr 2, 5 och 7 i tabell 4 vid spädning 1:800 p.g.a. kraftig bakgrundsfärgning vid spädning 1:400.
E	Monoclonal Mouse Anti-Human CD79αcy, Clone HM57, M7051, 250 mg/ml (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). Spädes 1:200 med TBST 1X.
F	Normalserum från hund (Klinisk kemiska laboriet, SLU, Uppsala, Sverige). 1% serum tillsätts spädningen med sekundär antikropp.
G	ImmPACT DAB Peroxidase (HRP) Substrate, SK-4105 (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, California, USA). Spädes enligt medföljande instruktion.

Figur 4. Protokoll för immunohistokemi.



Figur 5. Glas med vävnadssnitt som genomgår inkubering.



Figur 6. Valda områden i hypofysen där antal CD3+ celler per areaenhet bestämdes. Förkortningar förklarade till höger i figuren.

RESULTAT

Provmaterialiet bestod av hypofysvävnad från totalt 20 hundar ($N = 20$), vilka är listade i tabell 4. Medelåldern var 8,3 år ($SD = 2,8$ år). Urvalsgruppen bestod av 17 tikar (85%), varav 5 kastrerade (29,4%), och 3 hanar (15%), varav 1 kastrerad (33,3%). Fyra av hundarna (20%) hade multicentriskt malignt lymfom. Sektionsdiagnos för övriga hundar ses i tabell 4.

Tabell 4. *Hundar som ingick i studien*

#	Ras	Ålder	Kön	Sektionsdiagnos
1	Hamiltonstövare	9,8 år	Tik	Myxomatös mitralisklaffdegeneration med ruptur av chorda tendinea
2	Blandras	8,7 år	Honkastrat	Unilateral korsbandsruptur och osteoartrit (multipla leder)
3	Eng. springer spaniel	11,5 år	Tik	Bilateral nefrolitiasis
4	Strävhårig vorsteh	10,3 år	Tik	Extraadrenalt paragangliom
5	Rottweiler	9,1 år	Honkastrat	Multicentriskt hemangiosarkom
6	Papillon	14,2 år	Honkastrat	Osteoartrit (knäled bilat.)
7	Labrador retriever	7,2 år	Tik	Glomerulonefrit och nefrotiskt syndrom
8	Golden retriever	8,9 år	Tik	Akut myeloid leukemi
9	Beagle	13,3 år	Honkastrat	Fibrosarkom och osteosarkom juver
10	Golden retriever	6,7 år	Tik	Multicentriskt malignt lymfom och ovariellt papillärt cystadenokarcinom
11	Eng. springer spaniel	9,5 år	Tik	Duktulärt karcinom i benign blandtumör (multipla juverdelar)
12	Rottweiler	7,0 år	Hane	Bilateral korsbandsruptur, osteoartrit (multipla leder) och spondylos (flertal ryggavsnitt)
13	Bullmastiff	4,5 år	Tik	Rupturerat hemangiosarkom höger förmak och hemoperikard
14	Samojed	6,1 år	Honkastrat	Fokal inkarceration jejunum och sebakös adenit
15	Beagle	7,8 år	Tik	Mastocytom med metastasering
16	Blandras	7,2 år	Tik	Metastaserande juverkarcinom
17	Storpuddel	2,1 år	Tik	Multicentriskt malignt lymfom
18	Engelsk bulldog	6,4 år	Hane	Multicentriskt malignt lymfom
19	Cav. king charles sp.	8,9 år	Hankastrat	Multicentriskt malignt lymfom
20	Irländsk varghund	7,7 år	Tik	Dilaterad kardiomyopati och purulent bronkopneumoni

Histologi

En uppenbar lymfocytinfiltration kunde påvisas i ett fall (hund 18, tabell 4) genom H&E-färgning. Sektionsdiagnos hos denna hund var multicentriskt malignt lymfom. Hos hund 9 sågs en avgränsad proliferation av polygonala celler, morfologiskt snarlika adenoypofysära epitelioida celler. Cellerna uppvisade mild anisocytos, mild anisokaryos och låg mitosaktivitet. Förändringen, som bedömdes motsvara ett adenom, hade orsakat kompression av omgivande

parenkym. Hos 3 hundar kunde kolloidfyllda dilaterade folliklar i pars distalis påvisas (hund 15, 16 och 19).

Immunohistokemi

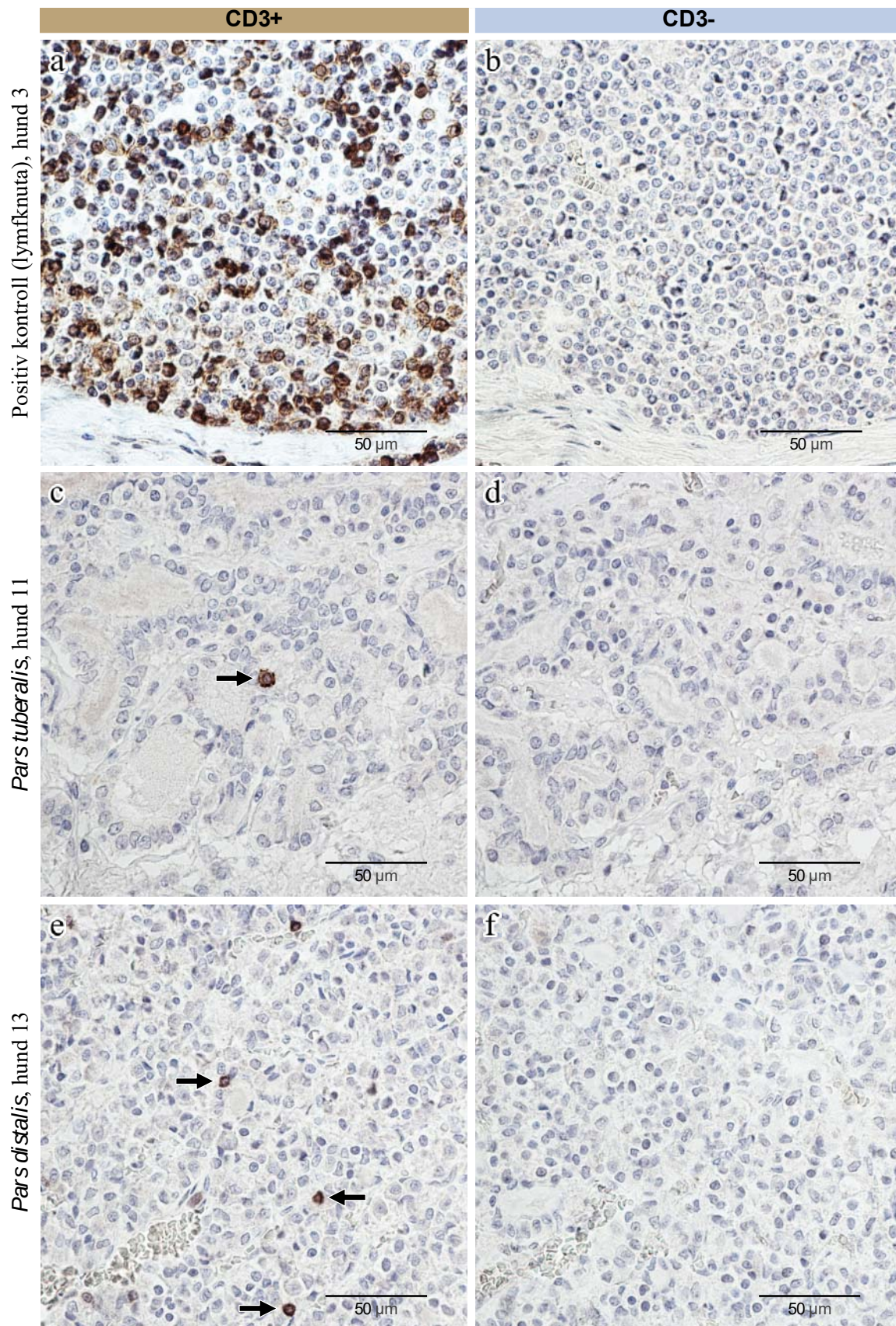
Immunohistokemi påvisade enstaka diffust spridda CD3+ celler i hypofysen hos samtliga hundar. Figur 7 visar CD3+ celler i pars tuberalis (hund 11) och pars distalis (hund 13). Data över antal CD3+ CPA är sammanställd i tabell 5 efter hypofysens huvudsakliga histoanatomiska delar: pars tuberalis, pars distalis, pars intermedia, infundibulum och lobus nervosus. Avvikande höga antal CD3+ CPA sågs hos hund 9 och 18. Eftersom histologi påvisade adenom hos hund 9 och kraftig lymfocytinfiltration hos hund 18 exkluderades dessa vid fortsatt statistisk analys. Antal CD3+ CPA i adenomet hos hund 9 var 54 CD3+ celler/mm². Antal CD3+ CPA för övriga 18 hundar är grafiskt presenterad som lådagran i figur 8.

Tabell 5. Antal CD3+ celler per areaenhet (CPA) angivet för pars tuberalis, pars distalis, pars intermedia, infundibulum och lobus nervosus hos hund med samma nummer i tabell 4. Areal som CPA är uppskattad på anges inom parentes i mm². Streck (-) anger att värdet saknas.

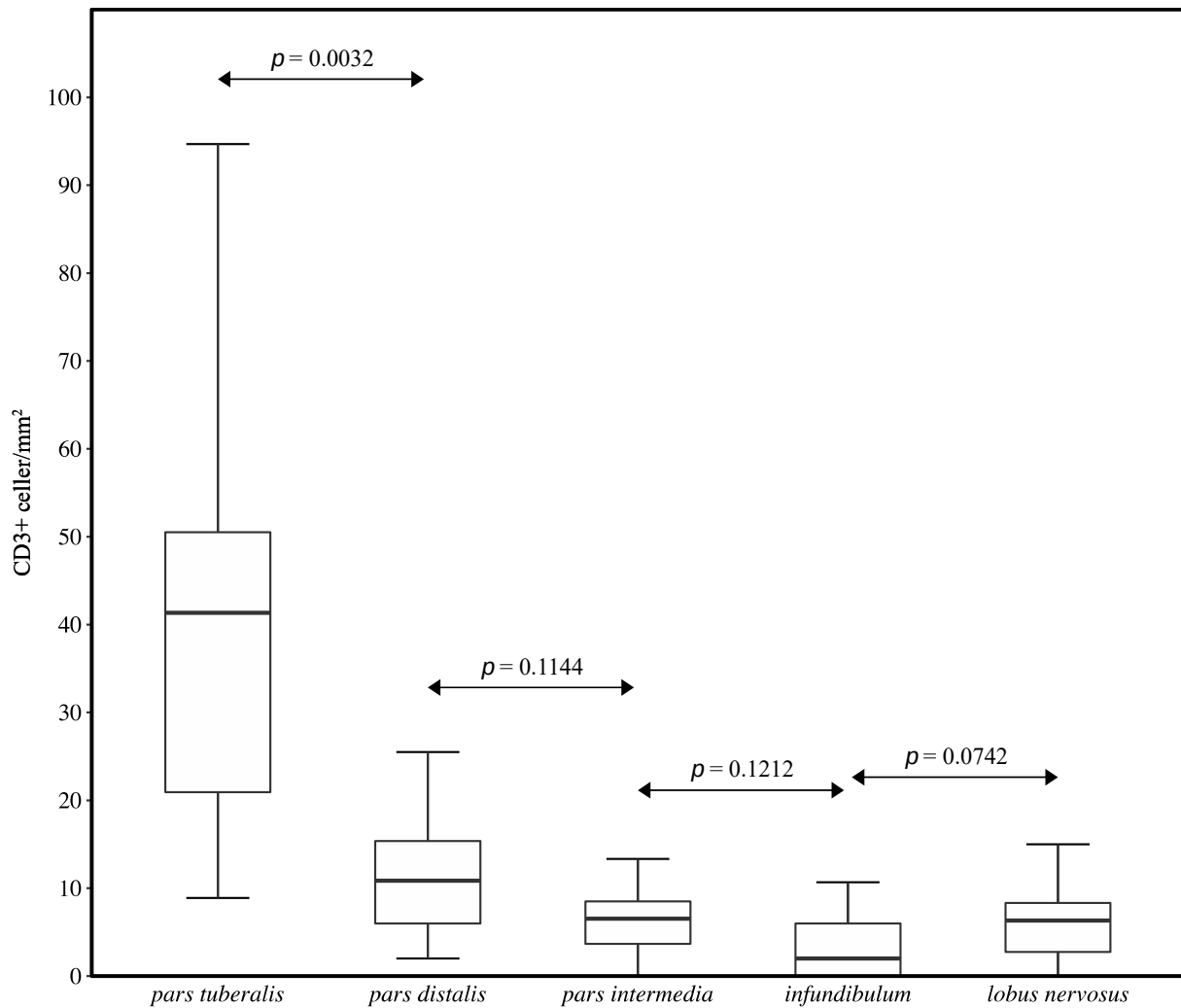
	Pars tuberalis	Pars distalis	Pars intermedia	Infundibulum	Lobus nervosus	
#	CPA (mm ²)	CPA (mm ²)	CPA (mm ²)	CPA (mm ²)	CPA (mm ²)	
1	8,9 (0,23)	3,4 (1,75)	6,0 (0,50)	0,0 (0,50)	2,0 (0,50)	
2	16,0 (0,25)	6,5 (2,00)	6,9 (0,44)	0,0 (0,50)	0,0 (0,13)	*
3	40,0 (0,25)	16,0 (0,50)	- -	8,0 (0,25)	- -	**
4	21,3 (0,75)	15,0 (2,00)	16,0 (0,38)	4,0 (0,25)	3,0 (1,00)	
5	20,8 (0,63)	2,0 (1,50)	0,0 (0,25)	0,0 (0,13)	0,0 (0,75)	*
6	26,7 (0,38)	- -	16,0 (0,25)	6,0 (0,50)	6,7 (0,75)	
7	50,7 (0,38)	3,0 (1,00)	8,0 (0,38)	0,0 (0,25)	6,0 (0,50)	*
8	42,7 (0,38)	15,4 (1,63)	10,0 (0,50)	4,0 (0,50)	8,0 (0,50)	
9	184,0 (0,13)	60,0 (0,50)	- -	52,0 (0,25)	- -	
10	50,0 (0,50)	13,5 (1,26)	0,0 (0,44)	10,0 (0,50)	6,7 (0,75)	
11	89,6 (0,63)	10,9 (1,75)	2,7 (0,75)	10,0 (0,50)	20,0 (1,00)	
12	21,3 (0,75)	7,3 (1,50)	4,0 (0,25)	0,0 (0,50)	5,0 (1,00)	
13	94,7 (0,75)	25,5 (2,00)	6,7 (0,75)	0,0 (0,50)	15,0 (1,00)	
14	16,0 (0,38)	9,3 (1,50)	6,0 (0,50)	2,0 (0,50)	3,0 (1,00)	
15	48,0 (0,25)	6,0 (1,00)	- -	- -	- -	
16	46,0 (0,50)	14,7 (1,50)	6,4 (0,31)	0,0 (0,50)	7,0 (1,00)	
17	64,0 (0,25)	16,5 (2,00)	0,0 (0,27)	4,0 (0,50)	9,3 (0,75)	
18	116,0 (0,50)	168,0 (1,00)	66,7 (0,38)	- -	172,0 (0,50)	
19	58,0 (0,50)	30,9 (1,75)	8,0 (0,50)	10,7 (0,38)	9,3 (0,75)	
20	13,3 (0,38)	6,0 (2,00)	13,3 (0,38)	0,0 (0,38)	1,1 (0,88)	

* Bedömning gjordes vid spädning 1:800 av den primära antikroppen, jämfört med spädning 1:400 för övriga hundar.

** Cellräkning och uppskattning av CPA gjordes ej enligt de områden som är definierade i figur 6 p.g.a. att snittets plan devierade kraftigt från sagittalplanet.



Figur 7. a) CD3+ celler i lymfknutans kortikala område, motsvarande lokalisering för T-celler (positiv kontroll, hund 3); b) negativ kontroll för motsvarande område som i a; c) CD3+ cell i pars tuberalis markerad med svart pil (hund 11); d) negativ kontroll för motsvarande område som i c; e) CD3+ celler i pars distalis markerade med svarta pilar (hund 13); f) negativ kontroll för motsvarande område som i e. IHC. Bar, 50 µm.

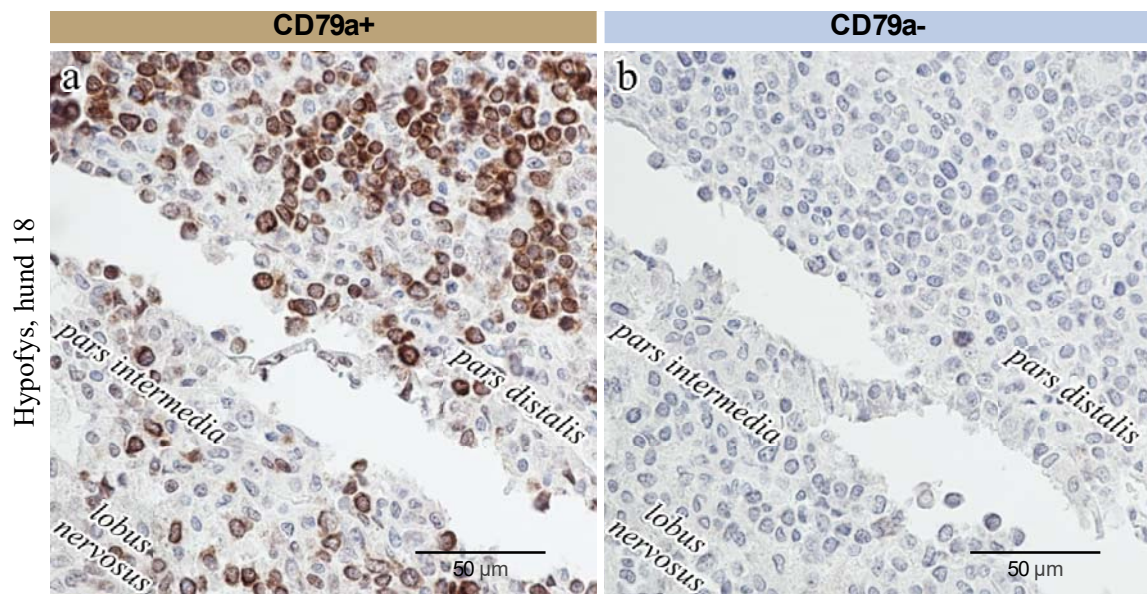


Figur 8. Lådagram över antalet CD3+ celler per areaenhet (mm²) i pars tuberalis, pars distalis, pars intermedia, infundibulum respektive lobus nervosus. Antalet CD3+ celler per areaenhet är som högst i pars tuberalis och som lägst i infundibulum. Punkter sammanbundna med linjer motsvarar varje enskild hund/preparat. I figuren anges också p-värden vid parvis jämförelse mellan de olika delarna i hypofysen.

En signifikant skillnad av antalet CD3+ CPA påvisades mellan hypofysens olika delar, $\chi^2(4) = 45,90$, $p < 0,001$. Antalet CD3+ CPA var som högst i pars tuberalis (Median = 41,3 celler/mm²) och som lägst i infundibulum (Median = 2,0 celler/mm²).

Jämförelse mellan hundar med multicentriskt malignt lymfom och övriga påvisade inga skillnader för någon del av hypofysen. Likaså påvisades inga skillnader mellan kastrerade och intakta hundar för någon del av hypofysen.

CD79a+ celler påvisades hos 7 hundar (35%). En kraftig infiltration av CD79a+ celler sågs hos hund 18, se figur 9. Antalet CD79a+ CPA uppmättes till >500 celler/mm² i hypofysens samtliga delar hos denna hund. Hund 19 hade ett mindre aggregat, med 12 st CD79a+ celler i pars tuberalis, vilket rymdes inom ett synfält vid 400x förstoring. Hos övriga fem hundar (hund 3, 5, 6, 7 och 13) kunde endast ett mycket litet antal CD79a+ celler (1-2 celler/preparat) påvisas.



Figur 9. a) CD79a+ celler i hypofysen hos hund 18 med multicentriskt malignt lymfom. Pars distalis, pars intermedia och lobus nervosus är markerade i figuren; b) negativ kontroll för motsvarande område som i a. IHC. Bar, 50 µm.

DISKUSSION

Lymfocyter har normalt inte ansetts förekomma i hypofysen hos hund. Ändå kunde enstaka diffust spridda CD3+ celler, vilka bedömdes motsvara T-celler, påvisas genom IHC i hypofysen hos samtliga 20 hundar som ingick i studien. Vidare kunde IHC bara påvisa CD79a+ celler, vilka bedömdes motsvara B-celler, i betydande omfattning hos två hundar där båda var diagnostiserade med multicentriskt malignt lymfom. Standardinfärgning med H&E påvisade endast i ett fall en uppenbar förekomst av lymfocyter i form av en kraftig infiltration. Resultaten samstämmer med dem från tidigare studier på häst och människa. Grau-Roma *et al.* (2017) påvisade CD3+ T-celler hos samtliga undersökta kontrollhästar genom IHC, vilka endast var påvisbara i standardinfärgning i hälften av fallen. Likaså har förekomst av lymfocyter i hypofysen beskrivits hos människa (Shanklin 1948; 1951). Resultaten i den aktuella studien indikerar att en liten mängd T-celler kan förekomma normalt i hypofysen även hos hund.

Lymfocytinfiltrat har beskrivits i samband med hypofysit hos hund (McAllister, 1991; Adissu *et al.*, 2010; Cramer *et al.* 2011; Wolfesberger *et al.*, 2011; Meij *et al.*, 2012; Polledo *et al.*, 2017). Ingen av hundarna i den aktuella studien misstänktes kliniskt ha en hypofysrelaterad sjukdom. Histologisk undersökning påvisade en kraftig infiltration av lymfocyter i ett fall. Infiltrationen dominerades av CD79a+ B-celler men även ett avvikande högt antal CD3+ CPA kunde konstateras. Malignt lymfom med involvering av lever, bukspottkörtel, gallblåsa, mjälte, magsäck, hjärta, multipla lymfknotor och benmärg fastställdes i samband med obduktion hos denna hund. Fenotypning av lymfocytinfiltraten i andra organ än hypofysen utfördes ej, men med avseende på infiltratets sammansättning i hypofysen är det rimligt att anta att lymfomet inbegriper B-cellslinjen. Vidare bedömning av B-cellernas karaktäristika utfördes ej i denna studie. Även om antalet CD3+ CPA var högre i hypofysen hos denna hund jämfört med majoriteten av hundarna, så var infiltratets utseende likartat med enstaka diffust spridda T-celler. Detta skulle kunna reflektera en respons orsakad av infiltrationen av B-celler. Hos en av hundarna sågs ett mindre aggregat med 12 st CD79a+ B-celler i pars tuberalis. Denna hund hade också multicentriskt malignt lymfom vilket skulle kunna förklara fyndet av CD79a+ B-celler i hypofysen.

Ett avvikande högt antal CD3+ CPA sågs även hos en 13 år gammal kastrerad tik med hypofysadenom som enligt anamnestiska uppgifter förefaller icke-funktionellt. Biokemiska analysdata saknas i detta fall. Fibrosarkom och osteosarkom i flera juverdelar fastställdes som sektionsdiagnos. Hypofystumörens histologiska utseende, i form av en välvgränsad proliferation av polygonala celler med mild anisocytos, mild anisokaryos och låg mitosaktivitet, gjorde att metastas från tumörer påvisade i juver bedömdes som mindre troligt. Även i detta fall skulle ett högt antal CD3+ CPA kunna förklaras som en respons till adenomet eller till följd av kompression och vävnadsskada i omgivande parenkym.

Signifikanta skillnader, gällande antal CD3+ CPA, mellan hypofysens olika delar kunde påvisas. Antalet CD3+ CPA var generellt högre i adenohypofysen, jämfört med neurohypofysen, och högst i pars tuberalis. En förklaring till skillnaderna kan ligga i hypofysens blodcirkulation. Kapillärbädden har en mycket högre densitet och större kärl-diameter i adenohypofysen jämfört med neurohypofysen (Akmayev, 1971). Adenohypofysen borde således vara exponerad för ett högre tryck av cirkulerande lymfocyter. Adenohypofysens

arteriella försörjning fås i huvudsak från artärer som utgår från *circulus arteriosus cerebri*, vilka ansluter till det primära kapillärnätverket som försörjer pars tuberalis, som via portasystemet försörjer pars distalis. Cirkulerande lymfocyter kommer därför först i kontakt med pars tuberalis på sin resa genom adenohypofysen. Pars tuberalis är dessutom först exponerad för eventuella cirkulerande skadliga agens som skulle kunna orsaka vävnadsskada och rekrytering av lymfocyter som följd. Den arteriella försörjningen av neurohypofysen kommer i första hand från artärer som ansluter till neurohypofysens kaudala pol.

Uppbyggnaden av adenohypofysen och neurohypofysen skiljer sig åt. Adenohypofysen består av ett körtelparenkym medan neurohypofysen är en förlängning av hypothalamus bestående av axon och pituicyter. Adenohypofysen är dessutom mer plastisk i sin natur när det kommer till omställning av produktion och frisättning av hormoner. Det här är också skillnader som skulle kunna förklara distributionen av CD3+ T-celler.

Att CD3+ T-celler förekom i större omfattning än CD79a+ B-celler överensstämmer med att T-celler är den dominerande cirkulerande fenotypen (Tizard, 2013).

Vid jämförelse mellan hundar med malignt lymfom och övriga, samt mellan kastrerade och intakta hundar kunde inga skillnader gällande antal CD3+ CPA påvisas för någon del av hypofysen. Det bör dock understrykas att detta bygger på resultat med mycket små urvalsgrupper.

Provmaterialet bestod av hypofysvävnad insamlad vid rutinobduktion. Med undantag för två hundar, vilka avlivades utan specifik frågeställning, så uppvisade övriga hundar någon form av tecken på sjukdom. Det går inte utesluta att systemisk sjukdom skulle ha kunnat orsaka de funna lymfocytinfiltraten. CD3+ T-celler påvisades i hypofysen hos samtliga hundar, även i två fall där klinisk bild och sektionsfynd främst var lokaliserade till rörelseapparaten. Detta faktum gör det rimligt att anta att systemisk sjukdom inte gett upphov till lymfocytinfiltrat i hypofysen hos samtliga hundar.

Antal CD3+ CPA sammanställdes för hypofysens olika delar, se tabell 5, baserade på data för de områden som är definierade i figur 6. Något eller några områden saknades i stort sett alla preparat. Dessutom fanns individuella skillnader i hypofysens morfologi, nivåskillnader mellan snitten i förhållande till midsagittalplanet och varierande grad av deviation i förhållande till sagittalplanet. Detta innebär att ett och samma område hos en individ inte till fullo motsvarar det hos en annan. Genom sammanslagning av registreringar från flera områden erhöles förhoppningsvis ett mer representativt genomsnitt. För att öka precisionen skulle flera snitt från samma individ i olika nivåer kunnat undersökas.

Ett flertal problem har förelegat med analysmetoden (IHC) och valda komponenter. Bakgrundsfärgning orsakad av den sekundära antikroppen kunde reduceras enligt förslag på åtgärder i tillverkarens felsökningsguide, men kunde inte elimineras fullständigt. Detta innebar en ökad risk för falskt positiva resultat och typ I-fel (α), men som minimerades genom tillämpning av strikta tolkningskriterier rörande cellmorfologi och lokalisation för att tolkas som lymfocyt. Därmed infördes en viss risk för falskt negativa och typ II-fel (β), men denna risk föredrogs framför risk för typ I-fel. Ett förslag på åtgärd i tillverkarens felsökningsguide

var att tillsätta 2% normalserum från samma djurslag som den analyserade vävnaden till den sekundära antikroppen. I denna studie tillsattes 1% normalserum från hund till den sekundära antikroppen vilket tillsammans med ytterligare spädning av sekundära antikroppen och tillsats av detergent (Tween 20) i buffertlösningen, se figur 4, reducerade bakgrundsfärgningen markant. Negativ kontroll vid respektive körning visade på konsekvent reduktion av bakgrundsfärgning.

Den primära antikroppen gav också upphov till bakgrundsfärgning. Mängden varierade mellan preparaten och även mellan områden i samma preparat. Vissa delar av preparaten var därför inte möjliga att analysera. I de fall där detta var ett problem utfördes upprepad infärgning av nya snitt från samma individ. Om bakgrundsfärgningen kvarstod i samma område förklarades detta som artefakter i samband med t.ex. fixering, dehydrering eller snittning och det aktuella området uteslöts från analys. Försök att späda den primära antikroppen ytterligare gav i stället en genomgående dålig kontrast. I tre fall kunde bedömning av CD3+ celler inte göras vid den i övrigt använda spädningen 1:400. Bedömning gjordes i stället vid spädning 1:800. Anti-CD79a-antikroppen fäste, förutom in till sitt tänkta målantigen hos B-cellen, även in till okänd epitop hos celler i blodkärlsväggar. Bedömning i närheten av kärl var därför svår och infärgning i nära anslutning tolkades inte som sann positiv. Detta kan innebära att perivaskulära CD79a+ B-celler utelämnats och att antalet CD79a+ B-celler underskattats. Kompletterande analys med ytterligare anti-B-cells-antikroppar, riktade mot exempelvis Pax5 och CD20 som används vid fenotypning av lymfom, kunde möjligtvis ha eliminerat detta problem (Avery *et al.*, 2013).

Ekonomiska begränsningar ledde till valet att använda snitt där primär antikropp utelämnats och ersatts med enbart buffertlösning som negativ kontroll. Detta anses inte vara *lege artis* enligt vissa författare då det inte går att avgöra huruvida antikroppen har bundit in till sitt antigen via den antigenbindande delen på Fab-fragmentet eller via ospecifika mekanismer (Hewitt *et al.*, 2014). Vid användning av en monoklonal primär antikropp rekommenderas därför att denna ersätts med en irrelevant isotypmatchad monoklonal antikropp. Det bör dock tilläggas att det finns mycket lite publicerad evidens gällande negativ kontroll i IHC (Torlakovic *et al.*, 2014).

Uppenbart intravaskulära och intrasinusoidala lymfocyter inkluderades inte vid cellräkning. Uppskattningsvis utgjorde de ca 10-20% av de identifierade lymfocyterna. Det går dock inte utesluta att några cirkulerande lymfocyter blivit medräknade. Även om adenohipofysen är rikligt vaskulariserad så förväntas bara ett litet antal cirkulerande lymfocyter i ett histologiskt snitt. Ett större antal skulle i så fall indikera en process som rekryterar lymfocyter i hypofysen.

Trots ovan nämnda problem bedöms resultaten som tillförlitliga. Inklusionskriterier tillämpades för att undvika falskt positiva. De valda primära antikropparna är förvisso riktade mot humana antigen men är enligt tillverkarens specifikation verifierade för analys hos hund. Även om ytterligare studier behövs för att fördjupa kunskaperna på området har det i denna studie första gången påvisats CD3+ T-celler i hypofyser vid rutinobduktion av hundar där det inte fanns någon klinisk misstanke om hypofyspatologi. Det låga antalet CD79a+ B-celler tyder på att förekomsten av B-celler är låg.

Konklusion

Resultaten från denna studie indikerar att lymfocyter förekommer i sparsam mängd i hypofysen hos hundar utan klinisk misstanke om hypofysit. Resultaten indikerar vidare att majoriteten av lymfocyterna utgörs av T-celler och att dessa framför allt är belägna i pars tuberalis. Förekomsten av B-celler förefaller låg.

TILLKÄNNAGIVANDEN

Ett stort tack till alla inblandade! Utan er hade detta projekt inte varit möjligt att genomföra.

Tack till Veterinärmedicinska fakultetens stipendiesamfund som bidragit med 7 264 SEK och därmed gjort detta projekt ekonomiskt genomförbart.

Ett speciellt stort tack till Jeanette Hanson. Din entusiasm och ditt otroliga engagemang har varit ovärderligt. Det har varit många intressanta diskussioner med mycket humor inblandad. Det förtroende och den frihet jag givits under hela arbetets gång har värdesatts högt och skapat en oerhörd motivation.

Ett stort tack Cecilia Ley för värdefull återkoppling och hjälp med såväl praktiska som teoretiska och lingvistiska utmaningar.

Tack till alla på Patologen vid SLU i Uppsala: Peder Eriksson, Christina Nilsson, Vidar Andersson, Karin Vargmar, Elisabet Ekman, Karolina Karlsson m.fl.

Tack till alla på KV-labb vid SLU i Uppsala: Anna Svensson, Annika Rikberg m.fl.

Marcus Blomqvist

REFERENSER

- Adissu, H. A., Hamel-Jolette, A. & Foster, R. A. (2010). Lymphocytic Adenohypophysitis and Adrenalitis in a Dog With Adrenal and Thyroid Atrophy. *Veterinary Pathology* [online], 47(6), pp 1082–1085. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985810382520>. [Accessed 2017-08-30].
- Akmayev, I. G. (1969). Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* [online], 96(4), pp 609–624. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00973337>. [Accessed 2017-09-26].
- Akmayev, I. G. (1971). Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* [online], 116(2), pp 178–194. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00331260>. [Accessed 2017-10-04].
- Allix, I. & Rohmer, V. (2015). Hypophysitis in 2014. */data/revues/00034266/v76i5/S0003426615010811/* [online],. Available from: <http://www.em-consulte.com/en/article/1013901>. [Accessed 2017-10-29].
- Avery, A. C., Olver, C., Khanna, C. & Paoloni, M. C. (2013). 8 - Molecular Diagnostics A2 - Withrow, Stephen J. In: Vail, D. M. & Page, R. L. (Eds) *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (Fifth Edition). pp 131–142. Saint Louis: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4377-2362-5.
- Bacha, W. J. & Bacha, L. M. (2012). *Color atlas of veterinary histology*. 3. ed. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell. ISBN 978-0-470-95851-3.
- Barr, S. C. (1985). Pituitary tumour causing multiple endocrinopathies in a dog. *Australian Veterinary Journal* [online], 62(4), pp 127–129. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.1985.tb07260.x/abstract>.
- Bellastella, A., Bizzarro, A., Coronella, C., Bellastella, G., Sinisi, A. A. & De Bellis, A. (2003). Lymphocytic hypophysitis: a rare or underestimated disease? *European Journal of Endocrinology* [online], 149(5), pp 363–376. Available from: <http://www.eje-online.org/content/149/5/363.short>. [Accessed 2017-03-11].
- Bolf, P., Niculescu, S., Tomuta, A., Tabaran, F., Nagy, A., Vidrighinescu, R., Irimie, A. & Catoi, C. (2014). Bilateral Cryptorchidism, Seminoma and Sertoli Cell Tumour Associated with Craniopharyngioma and Diabetes Insipidus in a Dog. *Journal of Comparative Pathology* [online], 150(1), p 106. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997513002946>.
- Bricaire, L., Van Haecke, C., Laurent-Roussel, S., Jrad, G., Bertherat, J., Bernier, M., Gaillard, S., Groussin, L. & Dupin, N. (2015). The Great Imitator in Endocrinology: A Painful Hypophysitis Mimicking a Pituitary Tumor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online], 100(8), pp 2837–2840. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/100/8/2837/2836074>. [Accessed 2017-12-08].
- Cabrera Blatter, M. F., del Prado, A., Gallelli, M. F., D'Anna, E., Ivanic, J., Esarte, M., Miceli, D. D., Gómez, N. V. & Castillo, V. A. (2012). Blindness in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism: Relationship with glucose, cortisol and triglyceride concentration and with ophthalmic blood flow. *Research in Veterinary Science* [online], 92(3), pp 387–392. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003452881100169X>.

- Caturegli, P. (2007). Autoimmune Hypophysitis: An Underestimated Disease in Search of Its Autoantigen(s). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online], 92(6), pp 2038–2040. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/92/6/2038/2597170/Autoimmune-Hypophysitis-An-Underestimated-Disease>. [Accessed 2017-10-26].
- Caturegli, P. & Iwama, S. (2013). From Japan With Love: Another Tessera in the Hypophysitis Mosaic. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online], 98(5), pp 1865–1868. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/98/5/1865/2536840/From-Japan-With-Love-Another-Tessera-in-the>. [Accessed 2017-08-30].
- Caturegli, P., Lupi, I., Landek-Salgado, M., Kimura, H. & Rose, N. R. (2008). Pituitary autoimmunity: 30 years later. *Autoimmunity Reviews* [online], 7(8), pp 631–637. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568997208000621>.
- Caturegli, P., Newschaffer, C., Olivi, A., Pomper, M. G., Burger, P. C. & Rose, N. R. (2005). Autoimmune Hypophysitis. *Endocrine Reviews* [online], 26(5), pp 599–614. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article/26/5/599/2355167/Autoimmune-Hypophysitis>. [Accessed 2017-10-22].
- Cramer, S. D., Miller, A. D., Medici, E. L., Brunner, J. D. & Ritchey, J. W. (2011). Sellar Xanthogranuloma in a Dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* [online], 23(2), pp 387–390. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/104063871102300236>.
- Deshpande, V., Zen, Y., Chan, J. K., Yi, E. E., Sato, Y., Yoshino, T., Klöppel, G., Heathcote, J. G., Khosroshahi, A., Ferry, J. A., Aalberse, R. C., Bloch, D. B., Brugge, W. R., Bateman, A. C., Carruthers, M. N., Chari, S. T., Cheuk, W., Cornell, L. D., Fernandez-Del Castillo, C., Forcione, D. G., Hamilos, D. L., Kamisawa, T., Kasashima, S., Kawa, S., Kawano, M., Lauwers, G. Y., Masaki, Y., Nakanuma, Y., Notohara, K., Okazaki, K., Ryu, J. K., Saeki, T., Sahani, D. V., Smyrk, T. C., Stone, J. R., Takahira, M., Webster, G. J., Yamamoto, M., Zamboni, G., Umehara, H. & Stone, J. H. (2012). Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. *Modern Pathology* [online], 25(9), pp 1181–1192. Available from: <https://www.nature.com/modpathol/journal/v25/n9/full/modpathol201272a.html>. [Accessed 2017-10-30].
- Evans, H. E. & DeLahunta, A. (Eds) (2013). *Miller's anatomy of the dog*. 4. ed. St. Louis, Mo: Elsevier. ISBN 978-1-4377-0812-7.
- Ezzat, S., Asa, S. L., Couldwell, W. T., Barr, C. E., Dodge, W. E., Vance, M. L. & McCutcheon, I. E. (2004). The prevalence of pituitary adenomas. *Cancer* [online], 101. Available from: <http://www.readcube.com/articles/10.1002/cncr.20412>. [Accessed 2017-12-04].
- Faje, A. (2016). Hypophysitis: Evaluation and Management. *Clinical Diabetes and Endocrinology* [online], 2(1). Available from: <http://clindiabetesendo.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40842-016-0034-8>. [Accessed 2017-10-22].
- Fehn, M., Sommer, C., Lüdecke, D. K., Plöckinger, U. & Saeger, W. (1998). Lymphocytic hypophysitis: Light and electron microscopic findings and correlation to clinical appearance. *Endocrine Pathology* [online], 9(1), pp 71–78. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02739954>. [Accessed 2017-09-13].
- Fink, G. (1986). The external layer of the median eminence: A neurovascular synapse☆. *Neurochemistry International* [online], 9(1), pp 141–153. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0197018686900434>. [Accessed 2017-10-15].

- Foley, C., Bracker, K. & Drellich, S. (2009). Hypothalamic-pituitary axis deficiency following traumatic brain injury in a dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* [online], 19(3), pp 269–274. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-4431.2009.00409.x/abstract>.
- Goossens, M. M. C., Rijnberk, A., Mol, J. A., Wolfswinkel, J. & Voorhout, G. (1995). Central Diabetes Insipidus in a Dog With a Pro-Opiomelanocortin-Producing Pituitary Tumor Not Causing Hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* [online], 9(5), pp 361–365. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1995.tb01099.x/abstract>.
- Grau-Roma, L., Peckham, R., Paton, J., Stahel, A. & de Brot, S. (2017). Occurrence of primary lymphocytic hypophysitis in two horses and presence of scattered T-lymphocytes in the normal equine pituitary gland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* [online], 29(1), pp 115–121. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1040638716676292>.
- Gundgurthi, A., Kharb, S., Garg, M. K., Brar, K. S., Bharwaj, R., Gupta, S. & Pathak, H. C. (2012). Combined granulomatous and lymphocytic hypophysitis presenting as pituitary incidentaloma in a middle-aged woman. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* [online], 16(5), p 846. Available from: <http://www.ijem.in/article.asp?issn=2230-8210;year=2012;volume=16;issue=5;spage=846;epage=849;aulast=Gundgurthi;type=0>. [Accessed 2017-10-26].
- Gutenberg, A., Buslei, R., Fahlbusch, R., Buchfelder, M. & Brück, W. (2005). Immunopathology of primary hypophysitis: implications for pathogenesis. *The American journal of surgical pathology*, 29(3), pp 329–338.
- Hanna, B., Li, Y. M., Beutler, T., Goyal, P. & Hall, W. A. (2015). Xanthomatous hypophysitis. *Journal of Clinical Neuroscience* [online], 22(7), pp 1091–1097. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967586815000892>. [Accessed 2017-10-28].
- Hashimoto, M., Yanaki, T., Nakahara, N. & Masuzawa, T. (1991). Lymphocytic adenohypophysitis: An immunohistochemical study. *Surgical Neurology* [online], 36(2), pp 137–144. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009030199190232X>. [Accessed 2017-10-27].
- Hewitt, S. M., Baskin, D. G., Frevert, C. W., Stahl, W. L. & Rosa-Molinar, E. (2014). Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(10), pp 693–697.
- Honegger, J., Buchfelder, M., Schlaffer, S., Droste, M., Werner, S., Strasburger, C., Störmann, S., Schopohl, J., Kacheva, S., Deutschbein, T., Stalla, G., Flitsch, J., Milian, M., Petersenn, S. & Elbelt, U. (2015). Treatment of Primary Hypophysitis in Germany. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online], 100(9), pp 3460–3469. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/100/9/3460/2830224/Treatment-of-Primary-Hypophysitis-in-Germany>. [Accessed 2017-08-30].
- Howlett, T. A., Levy, M. J. & Robertson, I. J. (2009). How Reliably Can Autoimmune Hypophysitis Be Diagnosed Without Pituitary Biopsy. *Clinical Endocrinology* [online],. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2265.2009.03765.x>. [Accessed 2017-11-28].
- Hunn, B. H. M., Martin, W. G., Simpson, S. & Mclean, C. A. (2014). Idiopathic granulomatous hypophysitis: a systematic review of 82 cases in the literature. *Pituitary* [online], 17(4), pp 357–365. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11102-013-0510-4>. [Accessed 2017-10-29].
- Husain, N., Husain, M. & Rao, P. (2008). Pituitary tuberculosis mimicking idiopathic granulomatous hypophysitis. *Pituitary* [online], 11(3), p 313. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11102-007-0068-0>. [Accessed 2017-10-30].

- Khare, S., Jagtap, V. S., Budyal, S. R., Kasaliwal, R., Kakade, H. R., Bukan, A., Sankhe, S., Lila, A. R., Bandgar, T., Menon, P. S. & Shah, N. S. (2015). Primary (autoimmune) hypophysitis: a single centre experience. *Pituitary* [online], 18(1), pp 16–22. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11102-013-0550-9>. [Accessed 2017-09-13].
- Kingsbury, B. F. & Roemer, F. J. (1940). The development of the hypophysis of the dog. *American Journal of Anatomy* [online], 66(3), pp 449–481. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aja.1000660306/abstract>.
- Le Tissier, P. R., Hodson, D. J., Lafont, C., Fontanaud, P., Schaeffer, M. & Mollard, P. (2012). Anterior pituitary cell networks. *Frontiers in Neuroendocrinology* [online], 33(3), pp 252–266. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091302212000349>. [Accessed 2017-10-06].
- Leporati, P., Landek-Salgado, M. A., Lupi, I., Chiovato, L. & Caturegli, P. (2011). IgG4-Related Hypophysitis: A New Addition to the Hypophysitis Spectrum. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online], 96(7), pp 1971–1980. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/96/7/1971/2833859/IgG4-Related-Hypophysitis-A-New-Addition-to-the>. [Accessed 2017-08-30].
- Levy, M. J., Jäger, H. R., Powell, M., Matharu, M. S., Meeran, K. & Goadsby, P. J. (2004). Pituitary Volume and Headache: Size Is Not Everything. *Archives of Neurology* [online], 61(5), p 721. Available from: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneur.61.5.721>. [Accessed 2017-10-28].
- Lin, W., Gao, L., Guo, X., Wang, W. & Xing, B. (2017). Xanthomatous Hypophysitis Presenting with Diabetes Insipidus Completely Cured Through Transsphenoidal Surgery: Case Report and Literature Review. *World Neurosurgery* [online], 104, p 1051.e7-1051.e13. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878875017308586>. [Accessed 2017-12-07].
- Madsen, J. R. & Karluk, D. (2000). Case 34-2000: a 71-year-old woman with an enlarging pituitary mass. *New England Journal of Medicine* [online], 343(19), pp 1399–1406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200011093431909>. [Accessed 2017-10-26].
- Mason, D. Y., Cordell, J. L., Brown, M. H., Borst, J., Jones, M., Pulford, K., Jaffe, E., Ralfkiaer, E., Dallenbach, F. & Stein, H. (1995). CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood* [online], 86(4), pp 1453–1459. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/86/4/1453>. [Accessed 2017-11-16].
- McAllister, M. M. (1991). Adenohypophysitis Associated with Sebaceous Gland Atrophy in a Dog. *Veterinary Pathology* [online], 28(4), pp 340–341. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/030098589102800413>.
- McLaughlin, N., Lavigne, F., Kilty, S., Berthelet, F. & Bojanowski, M. W. (2010). Hypophysitis Secondary to a Ruptured Rathke Cleft Cyst. *Canadian Journal of Neurological Sciences* [online], 37(3), pp 402–405. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/canadian-journal-of-neurological-sciences/article/hypophysitis-secondary-to-a-ruptured-rathke-cleft-cyst/B413D22322D1A7CA8098DD32893FA852>. [Accessed 2017-12-08].
- Medvei, V. C. (2012). *A History of Endocrinology*. Springer Science & Business Media. ISBN 978-94-009-7304-6.
- Meij, B. P., Voorhout, G., Gerritsen, R. J., Grinwis, G. C. M. & Ijzer, J. (2012). Lymphocytic Hypophysitis in a Dog with Diabetes Insipidus. *Journal of Comparative Pathology* [online], 147(4), pp 503–507. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997512000795>. [Accessed 2017-03-11].

- Mirocha, S., Elagin, R. B., Salamat, S. & Jaume, J. C. (2009). T regulatory cells distinguish two types of primary hypophysitis. *Clinical & Experimental Immunology* [online], 155(3), pp 403–411. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2008.03828.x>. [Accessed 2017-10-25].
- Monroe, B. G. (1967). A comparative study of the ultrastructure of the median eminence, infundibular stem and neural lobe of the hypophysis of the rat. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* [online], 76(3), pp 405–432. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00339297>. [Accessed 2017-09-26].
- Nielsen, L., Thompson, H., Hammond, G. J., Chang, Y.-P. & Ramsey, I. K. (2008). Central diabetes insipidus associated with primary focal B cell lymphoma in a dog. *Veterinary Record* [online], 162(4), pp 124–125. Available from: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/162/4/124>. [Accessed 2017-11-27].
- Ohta, M., KIMURA, T., OTA, K., SHOJI, M., INOUE, M., SATO, K., YAMAMOTO, T., ENDO, K., NARITA, M. & ABE, K. (1991). Glucocorticoid-induced central diabetes insipidus in a case of malignant lymphoma. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 163(4), pp 245–254.
- Pereira, E. A. C., Plaha, P., Hofer, M., Karavitaki, N. & Cudlip, S. A. (2013). Hypophyseal Wegener's granulomatosis presenting by visual field constriction without hypopituitarism. *Clinical Neurology and Neurosurgery* [online], 115(6), pp 762–764. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303846712003964>.
- Platt, S. R., Chrisman, C. L., Graham, J. & Clemmons, R. M. (1999). Secondary hypoadrenocorticism associated with craniocerebral trauma in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(2), pp 117–122.
- Polledo, L., Oliveira, M., Adamany, J., Graham, P. & Baiker, K. (2017). Hypophysitis, Panhypopituitarism, and Hypothalamitis in a Scottish Terrier Dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine* [online], Available from: <http://www.readcube.com/articles/10.1111/jvim.14790>. [Accessed 2017-09-04].
- Rao, S., Mahadevan, A., Maiti, T., Ranjan, M., Shwetha, S. D., Arivazhagan, A. & Saini, J. (2016). Granulomatous and lymphocytic hypophysitis – are they immunologically distinct? *APMIS* [online], 124(12), pp 1072–1077. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apm.12603/abstract>.
- Reford, L. L. & Cushing, H. (1909). Is the pituitary gland essential to the maintenance of life? *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, 20(217), pp 105–107.
- Rijn, S. J. van, Tryfonidou, M. A., Hanson, J. M., Penning, L. C. & Meij, B. P. (2013). Stem cells in the canine pituitary gland and in pituitary adenomas. *Veterinary Quarterly* [online], 33(4), pp 217–224. Available from: <https://doi.org/10.1080/01652176.2013.873961>.
- Rijnberk, A. & Kooistra, H. S. (Eds) (2010). *Clinical endocrinology of dogs and cats: an illustrated text*. 2nd. rev. and extended ed. Hannover: Schlütersche. (Vet). ISBN 978-3-89993-058-0.
- Rosol, T. J. & Gröne, A. (2015). Endocrine glands. Jubb, Kennedy & Palmer's pathology of domestic animals, 3, pp 269–357.
- Rudinsky, A., Clark, E., Russell, D. & Gilor, C. (2015). Adrenal insufficiency secondary to lymphocytic panhypophysitis in a cat. *Australian Veterinary Journal* [online], 93(9), pp 327–331. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/avj.12354/abstract>.
- Rzechorzek, N. M., Liuti, T., Stalin, C. & Marioni-Henry, K. (2017). Restored vision in a young dog following corticosteroid treatment of presumptive hypophysitis. *BMC Veterinary Research* [online], 13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5330113/>.

- Sautner, D., Saeger, W., Lüdecke, D. K., Jansen, V. & Puchner, M. J. A. (1995). Hypophysitis in surgical and autoptical specimens. *Acta Neuropathologica* [online], 90(6), pp 637–644. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00318578>. [Accessed 2017-11-28].
- Schwartz, H. G. (1936). The meningeal relations of the hypophysis cerebri. *The Anatomical Record* [online], 67(1), pp 35–51. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.1090670106/full>. [Accessed 2017-09-17].
- Shanklin, W. M. (1948). Mesothelial concretions and mesothelium in the human pituitary. *The Anatomical Record* [online], 102(1), pp 77–101. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.1091020108/abstract>.
- Shanklin, W. M. (1951). Lymphocytes and lymphoid tissue in the human pituitary. *The Anatomical Record* [online], 111(2), pp 177–191. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.1091110205/abstract>.
- Shikuma, J., Kan, K., Ito, R., Hara, K., Sakai, H., Miwa, T., Kanazawa, A. & Odawara, M. (2017). Critical review of IgG4-related hypophysitis. *Pituitary* [online], 20(2), pp 282–291. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11102-016-0773-7>. [Accessed 2017-10-31].
- Studdert, V. P., Gay, C. C. & Blood, D. C. (Eds) (2012). *Saunders comprehensive veterinary dictionary*. 4th ed. Edinburgh ; New York: Saunders Elsevier. ISBN 978-0-7020-3231-8.
- Tashiro, T., Sano, T., Xu, B., Wakatsuki, S., Kagawa, N., Nishioka, H., Yamada, S. & Kovacs, K. (2002). Spectrum of different types of hypophysitis: A clinicopathologic study of hypophysitis in 31 cases. *Endocrine Pathology* [online], 13(3), pp 183–195. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1385/EP:13:3:183>. [Accessed 2017-10-26].
- Theisen, S. K., Podell, M., Schneider, T., Wilkie, D. A. & Fenner, W. R. (1996). A Retrospective Study of Cavernous Sinus Syndrome in 4 Dogs and 8 Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* [online], 10(2), pp 65–71. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1996.tb02029.x/abstract>.
- Tizard, I. R. (2013). *Veterinary immunology*. 9th ed. St. Louis, Mo: Elsevier/Saunders. ISBN 978-1-4557-0362-3.
- Torlakovic, E. E., Francis, G., Garratt, J., Gilks, B., Hyjek, E., Ibrahim, M., Miller, R., Nielsen, S., Petcu, E. B., Swanson, P. E., Taylor, C. R. & Vyberg, M. (2014). Standardization of Negative Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations From the International Ad Hoc Expert Panel. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* [online], 22(4), pp 241–252. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00129039-201404000-00001>.
- Van Den Pol, A. N., Wuarin, J.-P. & Dudek, F. E. (1990). Glutamate, the Dominant Excitatory Transmitter in Neuroendocrine Regulation. *Science* [online], 250(4985), pp 1276–1278. Available from: <http://www.jstor.org/stable/2878659>.
- Watkins, W. B. (1975). Neurosecretory Neurons in the Hypothalamus and Median Eminence of the Dog and Sheep as Revealed by Immunohistochemical Methods*. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online], 248(1), pp 134–152. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1975.tb34181.x/abstract>.
- Wisner, E. R. & Zwingerberger, A. L. (2015). Sella and parasellar region. *Atlas of Small Animal CT and MRI*. pp 244–263. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 978-1-119-42139-9.

- Wolfesberger, B., Fuchs-Baumgartinger, A., Schwendenwein, I., Zeugswetter, F. & Shibly, S. (2011). Sudden Death in a Dog with Lymphoplasmacytic Hypophysitis. *Journal of Comparative Pathology* [online], 145(2–3), pp 231–234. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997511000077>. [Accessed 2017-03-11].
- Wong, S., Lam, W. Y., Wong, W. K. & Lee, K. C. (2007). Hypophysitis presented as inflammatory pseudotumor in immunoglobulin G4-related systemic disease. *Human Pathology* [online], 38(11), pp 1720–1723. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0046817707003504>.
- Yeung, C.-M., Chan, C.-B., Leung, P.-S. & Cheng, C. H. K. (2006). Cells of the anterior pituitary. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online], 38(9), pp 1441–1449. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272506000719>. [Accessed 2017-10-06].