



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Utveckling av lymfocytär tyreodit hos hund med fokus på immunologiska mekanismer

**The development of lymphocytic thyroiditis in
dogs with focus on immunological mechanisms**

Elin Lundbeck

Uppsala

*År
2019*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Utveckling av lymfocytär tyreodit hos hund med fokus på immunologiska mekanismer

The development of lymphocytic thyroiditis in dogs with focus on immunological mechanisms

Elin Lundbeck

Handledare: Magnus Åbrink, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)
Caroline Fossum, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Examinator: Maria Löfgren, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kursansvarig institution: Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kurskod: EX0862

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: år 2019

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

Nyckelord: hypothyroidism, lymfocytär tyreodit, hund, CTLA-4, DLA, autoantikroppar, FoxP3, cytotoxiska T-lymfocyter

Key words: hypothyroidism, lymphocytic thyroiditis, dog, CTLA-4, DLA, autoantibodies, FoxP3, cytotoxic T-lymphocytes

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder.....	3
Litteraturöversikt	4
Thyroidea och tyroideahormoner	4
Genetiska faktorer.....	4
<i>Dog Leukocyte Antigen</i>	4
<i>Cytotoxic T-lymphocyte Associated Antigen-4</i>	5
Cellulärt immunsvar.....	6
<i>Cytokinttryck</i>	7
Autoantikroppar – humoralt immunsvar.....	8
<i>Autoantikroppar mot thyroglobulin</i>	8
<i>Autoantikroppar mot tyroideahormoner</i>	8
Diskussion	10
<i>Slutsats</i>	12
Litteraturförteckning.....	13

SAMMANFATTNING

Lymfocytär tyreodit är en av de vanligaste endokrina sjukdomarna hos hund och uppkommer på grund av en autoimmun reaktion mot thyroidea. Det resulterar i att körteln bryts ned och nivåerna av thyroideahormoner i kroppen minskar. Detta får i värsta fall fatala konsekvenser för djuret då thyroideahormonerna påverkar många av kroppens organsystem. Dock är den exakta patogenesen bakom sjukdomsutvecklingen okänd men karaktäriseras av både ett cellulärt och humoralt immunsvaret. Framförallt autoreaktiva T-hjälparceller samt cytotoxiska T-lymfocyter bidrar till den cellulära nedbrytningen och den humoral immunresponsen utgörs utav autoantikroppar riktade mot thyroglobulin, thyroideahormonerna och thyroperoxidas. Dessutom finns spekulationer om att regulatoriska T-celler (Tregs) hos sjuka individer är nedreglerade vilket ger en nedsatt perifer immunosuppression. På grund av den multifaktoriella och komplexa bakgrunden till sjukdomsutvecklingen syftar denna litteraturstudie till att försöka sammanfatta de olika immunologiska mekanismerna som ger upphov till lymfocytär tyreodit hos hund.

Immunresponsen vid lymfocytär tyreodit verkar främst vara ett cellmedierat immunsvaret som karaktäriseras av en ökad mängd cytotoxiska T-lymfocyter och en ökad mängd cytokiner från T-hjälparceller typ 1. Polymorfier i cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4), som uttrycks på cellytan på både aktiverade T-lymfocyter och regulatoriska T-celler, förefaller spela en stor roll vid lymfocytär tyreodit. CTLA-4 verkar i normala fall nedreglerande på immunsvaret vilket gör att defekter i molekylens struktur eller regleringen av dess uttryck kan påverka utvecklingen av autoimmuna tillstånd. Det medför att Tregs immunosuppressiva förmåga minskar men också till att autoreaktiva T-hjälparceller inte hämmas. Vidare verkar även dog leukocyte antigen (DLA) klass II på antigenpresenterande celler vara inblandad eftersom antigen som presenteras på denna molekyl kan initiera ett immunsvaret. Detta gör att defekter i DLA som tillåter att autoantigen plockas upp och presenteras på DLA II kan leda till en autoimmun reaktion mot autoantigenet, vilket vid lymfocytär tyreodit är peptider producerade i thyroidea.

Utöver det påträffas även autoantikroppar ofta vid sjukdomstillståndet. Autoantikroppar riktade mot thyroglobulin är vanligast och tros uppkomma genom att vissa predisponerade hundar har thyroglobulin med en annorlunda molekylstruktur som gör att immunförsvaret reagerar på det. Autoantikropparna tycks verka framförallt via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC).

Ytterligare mekanismer som tros vara inblandade i sjukdomsutvecklingen är andra faktorer som leder till nedreglering av regulatoriska T-celler. En sådan komponent är plastiska regulatoriska T-celler som får T-hjälparcell typ 1-egenskaper och på det viset förlorar en del av sin immunosuppressiva förmåga. En annan möjlig mekanism är epigenetiska modifieringar i FoxP3-genen. FoxP3 är kopplat till T-cellsreceptorsignalering och vissa modifieringar tros påverka den regulatoriska T-cellens immunosuppressiva funktion.

SUMMARY

Lymphocytic thyroiditis is one of the most common endocrine disorders in dogs and arises from an autoimmune response against the thyroid. This results in the gland being degraded and the levels of thyroid hormones in the body decreasing. In the worst case, this will have fatal consequences for the animal as the thyroid hormones affect many of the organ systems in the body. However, the pathogenesis behind the development of the disease is unknown but it is characterized by a cellular and humoral immune response. The cellular immune response mainly consists of autoreactive T-helper cells as well as cytotoxic T-lymphocytes and the humoral immune response consists of autoantibodies against thyroglobulin, thyroid hormones and thyroperoxidase. In addition, there are speculations that regulatory T cells in diseased animals are down-regulated, which results in decreased peripheral immune suppression (tolerance). Due to the multifactorial background to the pathogenesis, this literature study aims to summarize the various immunological mechanisms that may lead to lymphocytic thyroiditis in dogs.

The immune response in lymphocytic thyroiditis appears to be primarily cell-mediated characterized by an increased number of cytotoxic T-lymphocytes and by T-helper type 1 cytokines. Polymorphisms in the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, which is expressed on the cell surface of both activated T-lymphocytes and regulatory T-cells, appear to play a major role in lymphocytic thyroiditis. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 functions to down-regulate the immune response and defects in its molecular structure or its upregulation can be a primal cause for the development of autoimmune conditions. Such defects would reduce the immunosuppressive capacity of regulatory T cells, but also prevent inhibition of autoreactive T-helper cells. Likewise, dog leukocyte antigen class II on antigen presenting cells is also likely to be involved since antigen presented on this molecule may initiate an immune response. Defects in dog leukocyte antigen that would allow autoantigen to be picked up could possibly lead to an autoimmune response against the autoantigen, which in lymphocytic thyroiditis are molecules of the thyroid.

In addition, autoantibodies also occur frequently within the disease. Autoantibodies directed against thyroglobulin are most common. Their formation is believed to originate from thyroglobulin with an abnormal molecule structure in some predisposed dogs, which causes the immune system to react against it. The autoantibodies seem to work primarily through antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.

Additional mechanisms hypothesized to be involved in the development of lymphocytic thyroiditis are other factors that cause down-regulation of regulatory T cells. One such factor is plastic regulatory T cells that receive properties of type 1 T-helper cells and thus lose some of their immunosuppressive ability. Another possible mechanism is epigenetic modifications in the FoxP3 gene. FoxP3 is linked to T-cell receptor signaling and some modifications are believed to affect the immunosuppressive function in regulatory T-cells.

INLEDNING

Den vanligaste endokrina sjukdomen hos hund är hypothyroidism, vilket innebär att hunden har en underfunktion i thyroidea och därav lägre nivåer av thyroideahormoner i kroppen. Hypothyroidism kan vara både förvärvad eller kongenital och delas även in i tre olika former beroende på var den sjukdomsorsakande skadan sitter. Primär hypothyroidism orsakas av skada i thyroidea, sekundär hypothyroidism av skada i hypofysen och den tertiära formen av skada i hypothalamus (Graham *et al.*, 2007). Thyroideahormonerna påverkar metabolismen i nästintill kroppens alla organsystem; exempelvis ökar de ämnesomsättningen i flera kroppsvävnader, ökar hjärtfrekvensen och har även en betydande roll för normal neurologisk utveckling och muskeltillväxt. Brist på thyroideahormonerna kan leda till bland annat dermatologiska problem, letargi, viktökning, anemi, neuropatier och bradykardi (McCann, 2015).

Den mest förekommande formen är primär hypothyroidism där förvärvad primär hypothyroidism är vanligast och uppskattas utgöra 95% av alla fall (McCann, 2015). Förvärvad primär hypothyroidism kan indelas i två kategorier: lymfocytär tyreodit och idiopatisk atrofi, där förhållandet mellan andelen fall är ungefär 1:1 (Graham *et al.*, 2007).

Lymfocytär tyreodit (LT) utgör uppskattningsvis 50% av fallen av hypothyroidism hos hund. Det är en autoimmun sjukdom och karaktäriseras av att T-och B-lymfocyter, plasmaceller och makrofager infiltrerar thyroidea och i närvaro av autoantikroppar mot olika thyroideastrukturer bryter ned organet. Kortfattat är det både ett cellulärt och humoralt immunsvär, dessutom tros flera faktorer såsom miljö och genetik spela roll i sjukdomsutvecklingen. Sjukdomsförloppet tar lång tid och klassiska kliniska symtom syns oftast inte förrän cirka 75% av thyroidea brutits ned (Popiel & Cekiera, 2014).

LT är en mycket vanlig sjukdom hos människa och kallas då Hashimotos sjukdom (HT). Hund har använts en hel del som modell för HT för att förstå sjukdomsutvecklingen eftersom hund, till skillnad från exempelvis möss och råttor, lever längre vilket är nödvändigt för den långsamma sjukdomsutvecklingen. Hundar har också en låg inavelsgrad i förhållande till råttor och möss, vilket anses vara en fördel för att få så stor likhet med människa som möjligt. Hundar lever även i liknande miljö som människan varpå många av de miljöfaktorer som kan påverka sjukdomsförloppet antas likna de som människan utsätts för (Choi *et al.*, 2006).

Trots att LT ligger bakom ungefär hälften av alla sjukdomsfall av hypothyroidism hos hund är patogenesen bakom LT inte helt klarlagd. Syftet med denna litteraturstudie är därför att sammanställa och undersöka de immunologiska mekanismerna som ligger bakom utvecklingen av LT.

MATERIAL OCH METODER

Litteraturstudien har byggts på vetenskapliga artiklar från databaserna Web of Science, Scopus, Pubmed och Primo.

De sökord som har använts är:

(canine* OR dog*) AND (hypothyroidism OR thyroid*)

("canine lymphocytic thyroiditis" OR CLT OR thyroid*) AND (canine* OR dog*)

(canine* OR dog*) AND (hypothyroidism OR thyroid*) AND (CTLA4 OR CTLA-4 OR "cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4")

Även review-artiklar och referenser från referenslistor i vetenskapliga artiklar har använts i arbetet. Dock har nyare artiklar inriktade på litteraturstudiens ämne prioriterats. Studier på människa har inkluderats i litteraturstudien i syfte att bredda kunskaperna gällande sjukdomen och för att jämföra sjukdomstillståndet mellan människa hund.

LITTERATURÖVERSIKT

Thyroidea och thyroideahormoner

Thyroidea är ett organ som syntetiserar thyroideahormonerna tyroxin (T4) och trijodtyronin (T3) vilka utsöndras systemiskt i blodet. Thyroglobulin (Tg) syntetiseras av thyrocyterna och är en prekursor till T3 och T4. Med hjälp av thyroperoxidas (TPO) kan sedan T3 och T4 bildas från Tg. I cirkulationen är det mesta av T3 och T4 bundet till thyroideahormonbindande globuliner. Endast 1% av thyroideahormonerna i blodet förekommer i en aktiv fri form som fritt T3 (fT3) samt fritt T4 (fT4) och kan tas upp i kroppens celler (McCann, 2015).

Regleringen av mängden thyroideahormoner sköts av hypothalamus och hypofysen. Hypothalamus utsöndrar thyrotropin releasing hormone (TRH) som stimulerar hypofysen att frisätta thyroïdstimulerande hormon (TSH). TSH stimulerar thyrocyterna till att syntetisera thyroideahormoner. Höga halter av T3 och T4 i blodet påverkar både hypothalamus och hypofysen via negativ feedback till att minska utsöndringen av TRH och TSH. Även höga halter av TSH bidrar genom negativ feedback på hypothalamus till att minska utsöndring av TRH (McCann, 2015).

Genetiska faktorer

Vissa hundraser, exempelvis Dobermann, Golden retriever och Gordon Setter, är predisponerade för att insjukna i hypotyreos vilket gör att genetiska faktorer tros ingå i sjukdomsutvecklingen. Speciellt viktig misstänks den genetiska faktorn vara hos renrasiga hundar som har en liten genpool. I samband med detta har man kunnat detektera flera gener som kan vara associerade med utvecklingen av autoimmuna sjukdomar (Bianchi *et al.*, 2015). Gener som associerats med LT hos hund är dog leukocyte antigen (DLA) och cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) (Friedenberg *et al.*, 2016).

Dog Leukocyte Antigen

DLA motsvarar major histocompatibility complex (MHC) och utgör på gennivå ett område på genomet som kodar för proteiner vilka är mycket viktiga för immunsvaret men också associerade med flera autoimmuna sjukdomar. DLA är uppdelat i tre klasser och det förekommer en hög polymorfism inom klasserna; DLA inom samma klass kan se olika ut hos olika individer. På proteinnivå har DLA klass I och II som övergripande funktion att detektera och binda antigen samt att via T-cellsreceptorn (TCR) presentera dessa för T-lymfocyter vilket initierar ett immunsvaret mot antigen (Kennedy *et al.*, 2006). I anknytning med LT är det framförallt DLAI på antigenpresenterande celler (APC) som anses ha ett samband med sjukdomen (Wilbe *et al.*, 2010).

Flertalet studier har kommit fram till att olika specifika haplotyper av DLA kan öka risken för att utveckla hypothyroidism hos vissa raser och den autoimmuna sjukdomen antas bero på rubbningar i självtoleransen (Wilbe *et al.*, 2010). Den exakta verkningsmekanismen bakom är

oklar men en föreslagen mekanism är att aminosyrasekvensen på bindningsstället i DLA för vissa haplotyper blir utformad så att autoantigen tillåts plockas upp och presenteras för T-lymfocyter. Det leder till ett immunsvaret mot autoantigenet (Safra *et al.*, 2011; Gershony *et al.*, 2019). Dock bör noteras att variationer i DLAI inte är den enda anledningen bakom sjukdomsutvecklingen hos alla raser (Bianchi, 2017). De haplotyper som associerats med LT har även funnits hos djur som aldrig utvecklat sjukdomen (Gershony *et al.*, 2019).

Cytotoxic T-lymphocyte Associated Antigen-4

CTLA-4 har en nedreglerande effekt på T-cellssvaret. Dess funktion är att upprätthålla den perifera toleransen och verka immunosuppressivt, vilket gör att molekylen ofta är inblandad i autoimmuna sjukdomar. Exempelvis utvecklas en dödlig autoimmun lymfoproliferativ sjukdom i genmodifierade möss som saknar CTLA-4-genen (Choi *et al.*, 2015). En annan viktig molekyl för immunsvaret är CD28 som uttrycks på både vilande och aktiverade T-lymfocyter och binder likt CTLA-4 till B7 men med lägre affinitet. I motsats till CTLA-4 är CD28 en viktig molekyl för att aktivera immunsvaret. CTLA-4 är däremot inaktiv i vilande T-lymfocyter och förvaras intracellulärt tills T-lymfocyterna aktiveras. Vid stimulering från TCR och bindning mellan CD28 och CD80 (B7-1) eller CD86 (B7-2) kommer CTLA-4 transporteras till cellytan via exocytos av CTLA-4-innehållande vesiklar. Om CTLA-4/B7-bindningen är starkare än CD28/B7 fås en negativ signal och T-lymfocyternas aktivitet bromsas genom minskad produktion av bland annat IL-2 vilket hämmar cellproliferation. Bindningen mellan CTLA-4 och B7 spekuleras verka nedreglerande på två sätt, dels genom att verka kompetitivt till bindningen mellan CD28/B7 vilket resulterar i mindre aktivering via CD28, dels genom att inhibera bindningen mellan TCR/MHC vilket hämmar initiering av ett immunsvaret (Buchbinder & Desai, 2016).

Det har genomförts studier i möss som inducerats med experimentell lymfocytär tyreoidit (EAT) och därefter behandlats med antikroppar som binder och stimulerar CTLA-4. Resultaten visade att behandlade möss fick en sänkt produktion av Th1-cytokiner, i synnerhet IFN- γ , IL-2 och TNF- α , och högre nivåer av Tregs (Vasu *et al.*, 2003). En liknande studie har också gjorts på hundar med EAT som behandlats med CTLA4Ig, ett fusionsprotein som fungerar likt CTLA-4 och binder till B7 med högre affinitet än CD28. Detta ledde till att T-lymfocytproliferation, cytokinsvaret och bildning av autoantikroppar mot Tg hämmades. I perifera mononukleära blodceller kunde man även se ett minskat mRNA-uttryck av IFN- γ , IL-12p40, IL-15, IL-18, IL-10 och IL-1 β hos samtliga hundar i studien (Choi *et al.*, 2008).

Den mekanism som misstänks ligga bakom sambandet mellan CTLA-4 och utvecklingen av autoimmuna sjukdomar är polymorfier i CTLA-4-genen. Bland annat kommer polymorfier som minskar uttrycket av CTLA-4 på cellytan minska molekylen aktivitet samt effekt och därigenom ge en minskad nedreglering av aktiva T-lymfocyter. En studie utförd på människa för att hitta en möjlig förklaring till minskad cellyteexponering visade att vissa varianter av CTLA-4 ledde till att glykosyleringen i det endoplasmatiska retiklet blev ofullständig. Detta medförde att proteinet veckades fel och påverkade transporten till cellytan (Anjos *et al.*, 2002).

CTLA-4 uttrycks även på Tregs och antas ha en viktig roll för deras immunosuppressiva funktion. En mekanism som Tregs tros använda för att nedreglera aktiverade T-lymfocyter är att via CTLA-4 binda upp B7-ligander på APCs, vilket i sig leder till minskad kostimulering av CD28 (Buchbinder & Desai, 2016).

Cellulärt immunsvar

Flera olika celltyper har kopplats till LT och för att utreda sjukdomsförloppet är det nödvändigt att veta vilka celler som är inblandade. I detta avseende har det setts stora skillnader i mängden CD4⁺ T-lymfocyter i förhållande till CD8⁺ T-lymfocyter hos både människa med HT och hund med LT (Ben-Skowronek *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2015). I en studie av Ben-Skowronek *et al.* (2013) sågs ingen statistisk skillnad mellan mängden CD4⁺ T-lymfocyter hos sjuka respektive friska personer. Däremot var mängden CD8⁺ T-lymfocyter betydligt högre hos sjuka personer. Vid ljusmikroskopering kunde man även se cytotoxiska T-lymfocyter (CTL) i ansamling runt destruerade thyrocyter i thyroidea. Ett liknande samband kunde även ses i en studie som gjordes på hypothyroida hundar där CD4:CD8-ration var sänkt (Miller *et al.*, 2015). Den starka korrelationen mellan förekomst av CD8⁺ T-lymfocyter och apoptotiska thyrocyter anses tyda på att CTL har en stor betydelse för sjukdomsförloppet vid LT (Ben-Skowronek *et al.*, 2013).

Aktivering av CTL måste ske innan de kan vara verksamma. Det sker via cytokiner från APC, interaktion mellan TCR och antigen som presenteras på DLA klass I på APC. Därtill krävs IL-2 samt IFN- γ från en aktiverad T-hjälparcell typ 1 (Th1). CTL kan sedan döda alla celler som uttrycker målantigenet på DLA klass I. Vid LT är det autoantigen som uttrycks på thyrocyter, vilket leder till att de destrueras av CTL (Bianchi, 2017). För aktivering av Th-celler måste Th inte bara få antigen presenterat av en APC på DLA klass II utan det krävs även kostimulering. CD40 på APC är en initierande kostimulerande molekyl som binder till CD154 på Th. Detta uppreglerar uttrycket av B7 på APC som kan binda till bland annat CD28 på Th. Bindningen mellan dessa ger upphov till att cytokiner produceras och beroende på immunsvar produceras olika typer av cytokiner. Emellertid uttrycks även CTLA-4 på aktiverade T-lymfocyter, och CTLA-4 har som ovan nämnts en nedreglerande effekt på immunsvaret (Alberts *et al.*, 2002).

Plasmaceller är en annan viktig celltyp vid LT. Studier på människor med HT har visat på en ökad mängd plasmaceller hos sjuka personer. I anslutning till plasmacellerna har det även setts foci av destruerade thyroideafoliklar och thyrocyter. Varken plasmaceller eller autoantikroppar som påträffas i samband med sjukdomen verkar i sig inte skada thyrocyterna utan spelar en viktig roll för ADCC (Ben-Skowronek *et al.*, 2013). Detta tas upp mer i detalj senare i litteraturstudien.

En annan celltyp vars förekomst också undersökts hos hypothyroida gentemot friska hundar är Tregs. Man har då sett att det inte är någon skillnad i mängden Tregs hos de båda grupperna, varken CD25⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺ eller CD4⁺FoxP3⁺ Tregs. Troligtvis spelar Tregs en stor roll i utvecklingen av autoimmuna thyroideasjukdomar, då de har en viktig funktion i att upprätthålla den perifera immunologiska självtoleransen (Miller *et al.*, 2015).

Treg kan binda in IL-2 på CD25, vilket minskar upptaget av IL-2 hos proinflammatoriska celler. Det har en stor betydelse för immunsvaret eftersom IL-2 är en mycket viktig signalmolekyl och stimulerar bland annat proliferation av CTL, natural killer cells (NK-celler) och Th1-celler. IL-2 kan också verka aktiverande för bland annat B-lymfocyter och makrofager. Tregs hämmar det cellmedierade immunsvaret; till exempel genom att producera TGF- β och IL-10 (Ben-Skowronek *et al.*, 2013). I människa har TGF- β bland annat visats nedreglera uttrycket av antigen på MHCII samt inhibera CTL och NK-celler (Choi *et al.*, 2006).

En markör för Treg är transkriptionsfaktorn factor forkhead box P3 (FoxP3). FoxP3 tros vara mycket viktig för korrekt Treg-funktion då muterade möss som saknade FoxP3-genen

utvecklade en dödlig lymfoproliferativ sjukdom. Dock är inte den exakta funktionen av FoxP3 klarlagd men det finns teorier om att FoxP3 påverkar gener kopplade till TCR-signalering och därför fungera som både aktivator och repressor (Corthay, 2009). Vissa epigenetiska modifieringar i FoxP3 som fosforylering och ubikvitinering anses påverka Tregs stabilitet negativt och påverka den suppressiva funktionen (Qiu *et al.*, 2018)

Tregs kan vara plastiska och uttrycka Th-egenskaper, både för Th1, Th2 och Th17. Dessa Th-liknande Tregs producerar proinflammatoriska cytokiner men har kvar Foxp3. Samma faktorer som stimulerar bildning av Th1, exempelvis IL-12 och IFN- γ , antas driva utvecklingen av Th1-egenskaper hos Tregs, medan utvecklingen hämmas av IL-4, TGF- β och IL-2. För Th2-liknande Tregs är däremot IL-4 drivande och för Th17-liknande Tregs är IL-6 drivande (Qiu *et al.*, 2018).

Cytokininuttryck

Cytokininuttrycket är viktigt både för utveckling och reglering av immunsvaret vid LT. Hur ser cytokininuttrycket ut i samband med LT? I hypothyroidea hundar finns en märkbar ökning av IFN- γ , vilket tros tyda på ett starkt cellmedierat immunsvaret med aktiva Th1. Dessutom var uttrycket av IL-4 och IL-10 samt TGF- β inte förhöjt hos de sjuka hundarna (Miller *et al.*, 2015). Även andra studier har visat på liknande resultat, det vill säga att uttrycket av Th1-cytokiner så som IFN- γ , IL-18 och IL-15 ökat i samband med LT hos hund. Samtidigt har man också undersökt förekomsten av Th2-cytokiner som IL-6 och IL-4 där signifikant förändring inte kunnat ses (Choi *et al.*, 2006). IL-18 stimulerar bland annat IFN- γ -produktion och proliferation av Th1. IFN- γ i sig har flera funktioner men är delvis viktig för att aktivera makrofager, NK-celler och CTL. Därtill kan även IFN- γ inducera eller förbättra uttrycket av antigen på DLAI. IL-15 reglerar exempelvis aktivering och proliferation av NK-celler och T-lymfocyter (Choi *et al.*, 2008).

Likt LT hos hund har studier på människa med HT visat på snarlika resultat där patienterna hade förhöjda nivåer av IL-2, IFN- γ , IL-18 som produceras av Th1 och IL-12 som produceras av APCs. IL-12 stimulerar aktivering av Th1 samt produktion av IFN- γ och TNF- α från T-celler och NK-celler (Phenekos *et al.*, 2004) Hos människa har det också visats att virusinfektioner i thyroidea ökar uttrycket av IFN- γ , där det höga uttrycket av IFN- γ påverkar thyrocyterna till att uttrycka egna MHC klass II molekyler vilket tros leda till den autoimmuna reaktionen (Popiel & Cekiera, 2014).

Uttrycket av IL-17 är påtagligt förhöjt hos hypothyroidea hundar. IL-17 utsöndras av Th17-celler och verkar proinflammatoriskt, vilket indikerar sjukdomens multifaktoriella bakgrund (Miller *et al.*, 2015). Th17-celler är mer plastiska och instabila i förhållande till Th1 och Th2-celler. Det finns exempelvis Th1-liknande Th17-celler som seccenerar både IFN- γ och IL-17. En teori bakom omvandlingen från Th17 till Th1-liknande Th17 är att miljön runtomkring blir inflammatorisk. IL-12 ansågs tidigare vara inblandat i switchen men anses vara oviktig för IFN- γ -produktion av Th17 *in vivo* (Sandquist & Kolls, 2018).

Av kostimulatoriska molekyler kunde ett betydligt högre uttryck av CD28 ses hos de hypothyroidea hundarna i förhållande till friska hundar, medan uttrycket av CTLA-4 inte skiljde sig åt anmärkningsvärt mellan sjuka och friska hundar. Det höga uttrycket av CD28 tros påvisa

en stark cellulär aktivering som kan vara kopplad till den höga nivån av IFN- γ (Miller *et al.*, 2015).

Autoantikroppar – humoralt immunsvär

Autoantikroppar, i huvudsak av subklass IgG, mot olika thyroideastrukturer påträffas i samband med LT, främst mot thyroglobulin, thyroideahormoner samt mot thyroperoxidas (Patzl & Möstl, 2003). Autoantikropparna tros verka via ADCC. Vilket innebär att de binder in till antigenet varpå effektorceller med Fc-receptorer (FcR) kan binda in via autoantikroppen och därmed förstöra cellen som bär antigenet. Flera olika celltyper i kroppen bär FcR och kan utföra ADCC, bland annat NK-celler, makrofager och granulocyter (Ackerman & Nimmerjahn, 2013).

Både ADCC och thyrocytapoptos tros intensifiera den autoimmuna reaktionen eftersom reaktionerna leder till utsläpp av intracellulära antigen som annars aldrig skulle exponerats för lymfocyterna (Ben-Skowronek *et al.*, 2013). Även ökad inflammationsaktivitet och tecken på pyroptosis (en form av apoptos) har observerats hos människa med autoimmun thyrodit (Guo *et al.*, 2018).

Autoantikroppar mot thyroglobulin

Tg är en mycket stor och komplex molekyl. Molekylens storlek ger en heterogen grupp av autoantikroppar riktade mot olika epitoper på Tg-molekylen. Vissa epitoper är mer antigena än andra vilket tros vara en anledning till att autoantikroppar mot Tg (TgAA) uppkommer (Graham *et al.*, 2007). Den bakomliggande orsaken är däremot oklar men det finns teorier om att hundar med predisponering för att utveckla LT har en annorlunda struktur på Tg-molekylen som följd av avvikande nedbrytning av proteaser, i detta fall trypsin (Tani *et al.*, 2003). TgAA är den vanligaste autoantikroppen i samband med LT hos hund (Graham *et al.*, 2007).

Det bör dock noteras att förekomst av TgAA också har detekterats hos friska djur och i samband med andra sjukdomstillstånd. Emellertid har även vissa studier visat att friska hundar med TgAA utvecklat hypothyroidism inom ett år från att autoantikropparna upptäckts (Patzl & Möstl, 2003). Dessutom kan TgAA-negativa hundar lida av LT och det spekuleras i att ett djur kan gå från att vara TgAA-positiv till TgAA-negativ. Detta kan ske om sjukdomen pågått tillräckligt länge, för om stora delar av thyroidea destruerats minskar mängden av de strukturer som immunförsvaret reagerar mot och följaktligen sjunker mängden TgAA (Mooney, 2011; Bianchi, 2017).

Autoantikroppar mot thyroideahormoner

Förekomst av autoantikroppar mot thyroideahormonerna (THAA) hos hundar med LT är ovanligare än förekomst av TgAA. Thyroideahormonerna är haptener med en liten molekylstorlek och ger därför inte upphov till antikroppar (Popiel & Cekiera, 2014). I thyroidea spjälkas T3 och T4 från Tg med hjälp av cathepsiner och thyroideahormonerna tar sig ut i blodet. I blodcirkulationen binds T3 och T4 upp av thyroxin-binding globulin, transthyretin och serum albumin vilka fungerar som transportmolekyler för thyroideahormonerna men troligen också som carrier vid antikropps bildning mot T3 och T4 (Pappa *et al.*, 2015). Dessutom har även TgAA visats korsreagera med hormonerna. På det här sättet utvecklas THAA och hundar har oftast THAA mot både T3 och T4 samtidigt. Det medför också att ifall det finns THAA så är det högst troligt att det även finns TgAA. Däremot tros THAA ha en liten fysiologisk

betydelse på grund av den låga andelen fT3 och fT4 som finns i cirkulationen och används därför främst i diagnostiskt syfte (Graham *et al.*, 2007).

DISKUSSION

Den immunologiska processen bakom sjukdomsutvecklingen av LT hos hund är invecklad och sannolikt leder flera olika defekter i signalsystem och cellutveckling till det autoimmuna svaret.

Flera olika celltyper är viktiga i LT, exempelvis olika typer av Th, CTL, makrofager och plasmaceller. För att utveckla LT måste effektorcellerna aktiveras där APC och Th är viktiga för aktiveringen. Dessa två celltyper initierar immunsvaret och kan aktivera andra celltyper, vid LT handlar det främst om CTL och plasmaceller. Därför ligger det nära till hands att utreda möjliga defekter i deras interaktion som kan leda till det autoimmuna svaret vid sjukdomen.

Det är sen tidigare känt att DLAII är kopplad till autoimmuna sjukdomar, vilket är logiskt; om ett autoantigen presenteras på molekylen kommer en immunreaktion sättas igång mot det om toleransen av någon anledning är bruten (Kennedy *et al.*, 2006). Många av generna inom DLA-regionen på genomet är mycket polymorfa och inom vissa hundraser har även specifika haplotyper konstaterats vara kopplade till LT. Det gör att även arvs gången kan studeras (Wilbe *et al.*, 2010). Därför är det rimligt att vissa polymorfier blir utformade så autoantigen plockas upp på molekylen. Dessutom kan denna mekanism ligga till grund för att autoantikroppar bildas. En annan teori bakom bildningen av autoantikroppar är att Tg-molekylen har en onormal struktur hos predisponerade hundar vilket kan medföra att APC reagerar på dem och visar upp dem på DLAII (Tani *et al.*, 2003).

Vad som inte ska inte glömmas bort är att kroppen har mekanismer för att kunna stoppa autoreaktiva celler. Det innebär att polymorfier i DLA omöjligt kan vara ensam orsak till utvecklingen av LT. Den perifera toleransen är viktig för att undvika autoimmuna tillstånd och två verkande faktorer som är inblandade i denna reglering och som även tagits upp i samband med LT är Tregs och CTLA-4. De studier som tas upp i detta arbete visar tydligt att defekter i CTLA-4 ger stora konsekvenser för regleringen av immunsvaret. Likväl som för DLA II verkar polymorfier i CTLA-4 kunna leda till att CTLA-4 inte uppvisas korrekt vilket i sin tur leder till minskad eller helt avsaknad av effekt (Anjos *et al.*, 2002). Vidare kan CTLA-4s centrala roll i LT styrkas utifrån det immunsvaret som uppstår och cytokinuttrycket. Studier på såväl människa som hund har visat att immunsvaret framförallt är cellmedierat, med främst CD8+ T-lymfocyter i samband med LT, trots att sjukdomstillståndet också är starkt kopplat till förekomst av autoantikroppar (Miller *et al.*, 2015; Ben-Skowronek *et al.*, 2013).

CTL aktiveras av Th1-cytokiner och studier av cytokinuttryck hos hund med LT har påvisat förhöjda Th1-cytokinnivåer samtidigt som förekomsten Th2-cytokiner är låg (Choi *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2015). Studier på möss med EAT har visat att stimulering av CTLA-4 leder till minskad Th1-produktion (Vasu *et al.*, 2003). Även hos hund med EAT som behandlats med CTLA-4Ig minskade mRNA-uttrycket för flera cytokiner som driver på Th1-profilen, bland annat minskade uttrycket av IL-12 som är direkt nödvändigt för att aktivera Th1. Detta är rimligt eftersom defekter i CTLA-4 gör att mer IL-12 secceneras vilket ökar graden av Th1-aktivering vid LT (Choi *et al.*, 2008). Dessutom kunde Miller *et al.* (2015) i sin studie inte se någon skillnad på uttrycket av CTLA-4 mellan hypothyroida hundar och friska kontroller, ytterligare en faktor som tyder på att CTLA-4-uttrycket inte uppregerats som det ska trots det starka immunsvaret hos de sjuka djuren. CTLA-4 uttrycks även på Tregs och tros vara viktig för deras immunosuppressiva funktion (Buchbinder & Desai, 2016). Även om CTLA-4-polymorfier gör att molekylen inte uppregeras korrekt skulle det kunna vara en bidragande orsak till att Tregs immunosuppressiva funktion är nedreglerad och därför inte kan dämpa autoreaktiva celler.

Även i studien av Vasu *et al.* (2003) på möss gjorde stimuleringen av CTLA-4 att fler Tregs uttrycktes, vilket visar ett möjligt samband mellan CTLA-4s effekt och antalet Tregs trots att få studier som noterat samma resultat hittats.

Antalet CD4⁺ T-lymfocyter vid LT verkar vara lågt. Det är sannolikt eftersom Tregs, som är CD4⁺, motverkar autoimmuna reaktioner. Det har redan tagits upp att defekter i CTLA-4 kan vara en bakomliggande orsak till nedreglerade Tregs, bland annat till en försämrad funktion genom att CTLA-4 på Tregs hämmas men utifrån studien av Vasu *et al.* (2003) verkar det även kunna vara så att minskad stimulering av CTLA-4 gör att färre Tregs uttrycks.

En annan faktor som kan bidra till Tregs underfunktion är transkriptionsfaktorn FoxP3. FoxP3 är likt CTLA-4 essentiell för att bibehålla ett fungerande immunförsvar, då utslagning av FoxP3-genen hos möss ledde till utvecklingen av en dödlig immunsjukdom (Corthay, 2009). Därför är det möjligt att defekter i FoxP3 kan leda till en dämpad immunosuppressiv funktion (Qiu *et al.*, 2018). Dessutom kan Tregs vara plastiska och eftersom immunsvaret i LT hos hund främst tros vara ett cellmedierat Th1-svar är Th1-liknande Tregs mest intressant (Qiu *et al.*, 2018). Re-differentieringen drivs som tidigare nämnts av bland annat IL-12 och IFN- γ vars uttryck ökar vid LT, medan den hämmas av IL-4 och TGF- β vars nivåer är låga vid LT hos hund (Choi *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2015). En Th1-liknande Treg kan ytterligare driva på ett cellmedierat immunsvaret i och med att de producerar samma typer av cytokiner som Th1. Däremot finns det belägg för att plastiska Tregs inte ligger bakom utvecklingen av LT. Exempelvis motverkar IL-2 utvecklingen av Th1-liknande Tregs men är också en viktig Th1-cytokin och nödvändig för att aktivera CTL (Miller *et al.*, 2015; Ben-Skowronek *et al.*, 2013). I och med att nivån av CD8⁺ T-lymfocyter är förhöjd vid LT bör en hög halt av IL-2 också finnas, vilket skulle hämma re-differentieringen av Tregs. Dock har inga studier hittats där nivån av IL-2 mätts i samband med LT hos hund men studier på människa med HT har visat förhöjda nivåer av IL-2 (Phenekos *et al.*, 2004).

Det har även noterats en förhöjd nivå IL-17 hos hypothyroida hundar (Miller *et al.*, 2015). Det är möjligt att det vid LT kan vara plastiska Th17 som re-differentierat till Th1-liknande Th17. Dessa seccenerar bland annat IFN- γ och bidrar ytterligare till det cellmedierade immunsvaret samt förstärker immunresponsen. Plasticiteten misstänks uppkomma i en starkt inflammatorisk miljö, vilket tydligt råder vid LT (Sandquist & Kolls, 2018). Dock har endast en studie hittats där uttrycket av IL-17 undersökts i samband med hypothyroidism hos hund och därför bör området utforskas mer innan slutsatser om Th17s påverkan kan dras.

Det kan konstateras att flera av de orsaker till LT hos hund som tagits upp ovan berör hundens genom. Det förklarar även varför LT är vanligare inom vissa raser, speciellt hos de med en liten genpool. I och med att genomet är inblandat bör olika miljöfaktorers inverkan på sjukdomen diskuteras, eftersom miljön kan påverka det genetiska materialet och vilka gener som kommer till uttryck. Forskning på människa med HT har visat att olika miljöfaktorer så som stress, graviditet, alkohol och vissa mediciner kan öka risken att insjukna i HT om personen är genetiskt predisponerad (Liontiris & Mazokopakis, 2017). Att inga studier av miljöfaktorers påverkan på LT hos hund hittats kan bero på att en sådan studie kan tänkas vara irrelevant eftersom vi håller våra hundar som vi själva lever och att fungerande mediciner mot sjukdomen finns. Dock kan olika miljöbetingelser också vara en möjlig förklaring till att olika studier som undersöker LT hos hund visar något olika resultat. Det är inte heller säkert att alla nämnda

faktorer i denna litteraturstudie krävs för att sjukdomstillståndet ska utvecklas, trots att inte heller endast en defekt, i exempelvis DLA, kan leda till den autoimmuna reaktionen.

Angående HT hos människa har, likt för LT hos hund, CTLA-4 och human leukocyte antigen konstaterats ha en koppling till sjukdomsutvecklingen. Dessutom har även en tredje gen, protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22), kopplats till HT. PTPN22 är involverad i T-cellsignalering (Bianchi, 2017). En specifik mutation i PTPN22-genen, även kallad R620W, tros leda till att T-cellssvaret hämmas vilket resulterar i minskad inducerad T-cellsapoptos och att autoreaktiva T-lymfocyter lever vidare (Jacobson & Tomer, 2007). Den specifika mutationen har påvisats i flera autoimmuna sjukdomar, däribland HT (Burn *et al.*, 2011). Det finns även samband mellan PTPN22 och autoimmuna sjukdomar hos hund men någon koppling mellan PTPN22 och LT har inte undersökts (Friedenberg *et al.*, 2016). Möjligtvis bör ett sådant samband utredas hos hund för ytterligare kunskap om sjukdomens komplexa bakgrund och orsaker. Dessutom kan kunskap om bakomliggande orsaker öppna upp för nya sätt att behandla sjukdomen.

Slutsats

Sammanfattningsvis kan jag baserat på den litteratur som finns konstatera att flera faktorer ligger bakom den autoimmuna reaktion som fås vid LT hos hund. Det är inte förvånande eftersom immunförsvarets funktion grundar sig på ett detaljerat samarbete mellan celler, molekyler och signaler. Huvudorsaker verkar vara polymorfier i DLA klass II och CTLA-4 som påverkar deras funktion. I synnerhet CTLA-4 verkar vara extra viktig då molekylen tycks kunna påverka både funktion och uttryck av Tregs men även reglering av T-lymfocyter, som i sig krävs för att aktivera alla de celler som bidrar till destruktionsen av thyroidea. Även modifieringar i FoxP3 som leder till nedreglering av Tregs och strukturförändring av Tg verkar kunna vara sjukdomsorsakande faktorer.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Ackerman, M. & Nimmerjahn, F. (2013). *Antibody Fc: Linking Adaptive and Innate Immunity*. San Diego, UNITED STATES: Elsevier Science & Technology. Tillgänglig: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/slub-ebooks/detail.action?docID=1337490>. [2019-02-20].
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). Helper T Cells and Lymphocyte Activation. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Tillgänglig: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26827/>. [2019-03-16].
- Anjos, S., Nguyen, A., Ounissi-Benkhalha, H., Tessier, M.-C. & Polychronakos, C. (2002). A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46478–46486.
- Ben-Skowronek, I., Szewczyk, L., Kulik-Rechberger, B. & Korobowicz, E. (2013). The differences in T and B cell subsets in thyroid of children with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *World Journal of Pediatrics*, 9(3), 245–250.
- Bianchi, M. (2017). *Genetic Studies of Immunological Diseases in Dogs and Humans*. Diss. Uppsala: Uppsala universitet.
- Bianchi, M., Dahlgren, S., Massey, J., Dietschi, E., Kierczak, M., Lund-Ziener, M., Sundberg, K., Thoresen, S. I., Kämpe, O., Andersson, G., Ollier, W. E. R., Hedhammar, Å., Leeb, T., Lindblad-Toh, K., Kennedy, L. J., Lingaas, F. & Rosengren Pielberg, G. (2015). A Multi-Breed Genome-Wide Association Analysis for Canine Hypothyroidism Identifies a Shared Major Risk Locus on CFA12. *PLoS ONE*, 10(8): e0134720.
- Buchbinder, E. I. & Desai, A. (2016). CTLA-4 and PD-1 Pathways. *American Journal of Clinical Oncology*, 39(1), 98–106.
- Burn, G. L., Svensson, L., Sanchez-Blanco, C., Saini, M. & Cope, A. P. (2011). Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Letters*, 585(23), 3689–3698.
- Choi, E. W., Lee, J. M., Lee, H. W., Yang, J. & Youn, H. Y. (2015). Therapeutic effects of CTLA4Ig gene-transduced adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation on established autoimmune thyroiditis. *Cell Transplantation*, 24(11), 2221–2236.
- Choi, E. W., Shin, I. S., Lee, C. W. & Youn, H. Y. (2008). The effect of gene therapy using CTLA4Ig/silica-nanoparticles on canine experimental autoimmune thyroiditis. *The Journal of Gene Medicine*, 10(7), 795–804.
- Choi, E.-W., Shin, I.-S., Bhang, D.-H., Lee, D.-H., Bae, B.-K., Kang, M.-S., Kim, D.-Y., Hwang, C.-Y., Lee, C.-W. & Youn, H.-Y. (2006). Hormonal change and cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells during the development of canine autoimmune thyroiditis. *Clinical & Experimental Immunology*, 146(1), 101–108.
- Corthay, A. (2009). How do Regulatory T Cells Work? *Scandinavian Journal of Immunology*, 70(4), 326–336.
- Friedenberg, S. G., Buhrman, G., Chdid, L., Olby, N. J., Olivry, T., Guillaumin, J., O'Toole, T., Goggs, R., Kennedy, L. J., Rose, R. B. & Meurs, K. M. (2016). Evaluation of a DLA-79 allele associated with multiple immune-mediated diseases in dogs. *Immunogenetics*, 68(3), 205–217.

- Gershony, L. C., Belanger, J. M., Short, A. D., Le, M., Hytönen, M. K., Lohi, H., Famula, T. R., Kennedy, L. J. & Oberbauer, A. M. (2019). DLA class II risk haplotypes for autoimmune diseases in the bearded collie offer insight to autoimmunity signatures across dog breeds. *Canine Genetics and Epidemiology*, 6(1).
- Graham, P. A., Refsal, K. R. & Nachreiner, R. F. (2007). Etiopathologic Findings of Canine Hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37(4), 617–631.
- Guo, Q., Wu, Y., Hou, Y., Liu, Y., Liu, T., Zhang, H., Fan, C., Guan, H., Li, Y., Shan, Z. & Teng, W. (2018). Cytokine Secretion and Pyroptosis of Thyroid Follicular Cells Mediated by Enhanced NLRP3, NLRP1, NLRC4, and AIM2 Inflammasomes Are Associated With Autoimmune Thyroiditis. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Jacobson, E. M. & Tomer, Y. (2007). The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: Back to the future. *Journal of Autoimmunity*, 28(2), 85–98.
- Kennedy, L. J., Quarmby, S., Happ, G. M., Barnes, A., Ramsey, I. K., Dixon, R. M., Catchpole, B., Rusbridge, C., Graham, P. A., Hillbertz, N. S., Roethel, C., Dodds, W. J., Carmichael, N. G. & Ollier, W. E. R. (2006). Association of canine hypothyroidism with a common major histocompatibility complex DLA class II allele. *Tissue Antigens*, 68(1), 82–86.
- Liontiris, M. I. & Mazokopakis, E. E. (2017). A concise review of Hashimoto thyroiditis (HT) and the importance of iodine, selenium, vitamin D and gluten on the autoimmunity and dietary management of HT patients. Points that need more investigation. *Hellenic Journal of Nuclear Medicine*, 20(1), 51–56.
- McCann, T. (2015). Canine hypothyroidism. *Companion animal*, 20(10), 6.
- Miller, J., Popiel, J. & Chelmońska-Soyta, A. (2015). Humoral and Cellular Immune Response in Canine Hypothyroidism. *Journal of Comparative Pathology*. 153(1), 28–37.
- Mooney, C. (2011). Canine hypothyroidism: A review of aetiology and diagnosis. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(3), 105–114.
- Pappa, T., Ferrara, A. M. & Refetoff, S. (2015). Inherited defects of thyroxine-binding proteins. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(5), 735–747.
- Patzl, M. & Möstl, E. (2003). Determination of Autoantibodies to Thyroglobulin, Thyroxine and Triiodothyronine in Canine Serum. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50(2), 72–78.
- Phenekos, C., Vryonidou, A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N., Goula, M. & Papamichail, M. (2004). Th1 and Th2 Serum Cytokine Profiles Characterize Patients with Hashimoto's Thyroiditis (Th1) and Graves' Disease (Th2). *Neuroimmunomodulation*, 11(4), 209–213.
- Popiel, J. & Cekiera, A. (2014). Usefulness of measuring the concentration of thyroglobulin antibodies in serum of dogs for the assessment of thyroid functioning. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 58(2), 261–266.
- Qiu, R., Zhou, L., Ma, Y., Zhou, L., Liang, T., Shi, L., Long, J. & Yuan, D. (2018). Regulatory T Cell Plasticity and Stability and Autoimmune Diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. doi: 10.1007/s12016-018-8721-0. [2019-03-02]

Safra, N., Pedersen, N. C., Wolf, Z., Johnson, E. G., Liu, H. W., Hughes, A. M., Young, A. & Bannasch, D. L. (2011). Expanded dog leukocyte antigen (DLA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping reveals spurious class II associations. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 189(2), 220–226.

Sandquist, I. & Kolls, J. (2018). Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Research*, 7.

Tani, H., Shimizu, R., Sasai, K. & Baba, E. (2003). Recognition Pattern of Thyroglobulin Autoantibody from Hypothyroid Dogs to Tryptic Peptides of Canine Thyroglobulin. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65(10), 1049–1056.

Vasu, C., Gorla, S. R., Prabhakar, B. S. & Holterman, M. J. (2003). Targeted engagement of CTLA-4 prevents autoimmune thyroiditis. *International Immunology*, 15(5), 641–654.

Wilbe, M., Sundberg, K., Hansen, I. R., Strandberg, E., Nachreiner, R. F., Hedhammar, Å., Kennedy, L. J., Andersson, G. & Björnerfeldt, S. (2010). Increased genetic risk or protection for canine autoimmune lymphocytic thyroiditis in Giant Schnauzers depends on DLA class II genotype. *Tissue Antigens*, 75(6), 712–719.