

Er det en molekylær fellesnevner bak hyposalivasjon ved strålebehandling i hode- og halsområdet, diabetes og Sjøgrens syndrom?

Skrevet av Emilie Voje Aabel og Henrikke Heitmann

Veiledet av Trude M. Haug

Institutt for oral biologi
Det odontologiske fakultet



Forord

Med denne masteroppgaven ønsker vi å finne ut om det er en eller flere molekulære fellesnevner bak hyposalivasjon ved strålebehandling i hode- og halsområdet, diabetes og Sjøgrens syndrom. Dette vil gi et bedre innblikk i mekanismer bak hyposalivasjon, og vil videre gi nye behandlingsalternativer på tvers av tilstander. Også i et økonomisk perspektiv er dette gunstig, og pasientenes livskvalitet ville trolig blitt forbedret.

Vi vil takke vår veileder Trude M. Haug ved Institutt for Oral Biologi, Det odontologiske fakultet, for god veiledning. Dine innspill har vært verdifulle for oss gjennom prosessen med å skrive denne oppgaven.

Innholdsfortegnelse

Forord	2
Innholdsfortegnelse	3
Sammendrag	5
Liste over forkortelser	6
Introduksjon	7
Saliva	7
Ca ²⁺ -signaleringsmekanismen	8
Strålebehandling i hode- og halsområdet	9
Diabetes	10
Sjøgrens syndrom	11
Oksidativt stress og ROS	14
Materialer og metoder	15
Resultater	17
Strålebehandling i hode- og halsområdet	17
Diabetes	19
Sjøgrens syndrom	22
Diskusjon	25
Oksidativt stress og ROS	25
Dysfunksjonelle mitokondrier	26
Aquaporiner	27
M3R	29
IP3R	31
Behandlingsmuligheter basert på funn	32
Hva må vi forske videre på?	32
Konklusjon	33

Kilder..... 34

Sammendrag

Introduksjon: Saliva er av betydning for mange daglige funksjoner, og viktig for livskvalitet. Flere tilstander fører til at mengden saliva er patologisk redusert, dette kaller vi hyposalivasjon. Denne litteraturstudien utforsker om det kan være en molekylær fellesnevner bak hyposalivasjon ved strålebehandling i hode- og halsområdet, diabetes og Sjøgrens syndrom.

Materialer og metode: Gjennom litteratursøk i PubMed er det funnet relevante studier. Studiene som diskuteres i denne oppgaven retter fokus mot ulike molekylære mekanismer ved de forskjellige tilstandene, og det er spesielt Ca^{2+} -signaleringsmekanismen som utforskes.

Resultater: Det kan se ut til at oksidativt stress og reaktive oksygenderivater (ROS) påvirker cellene ved alle tre tilstandene. Det samme gjelder redusert uttrykk av aquaporin-5 (AQP5) og redusert uttrykk og sensitivitet for muskarinerg acetylkolin-reseptor 3 (M3R). Det er imidlertid ingen direkte evidens for at noe av dette er årsaken til hyposalivasjon. Man kan ikke utelukke at også andre mekanismer har betydning, blant annet observeres dysfunksjonelle mitokondrier og redusert inositol-1,4,5-trisfosfat reseptor (IP3R) ved noen av tilstandene.

Konklusjon: Det er ikke funnet en klar og entydig molekylær fellesnevner bak hyposalivasjon ved de tre tilstandene, men man kan se noen tendenser. Mer forskning er nødvendig for å kunne avdekke hvilke faktorer som påvirker spyttproduksjonen og om mekanismene er de samme ved alle tre tilstandene.

Liste over forkortelser

- ACh: acetylkolin
- ADPR: adenosin difosfat ribose
- AQP: aquaporin
- ATP: adenosin 5-trifosfat
- Cch: karbakol
- ER: endoplasmatisk retikulum
- IP3: inositol-1,4,5-trisfosfat
- M3R: muskarinerg acetylkolin-reseptor
- Orai1: kalsium frigjørende-aktivert kalsiumkanal protein 1
- PGE₂: prostaglandin E₂
- pSS: primært Sjøgrens syndrom
- ROS: reaktive oksygenderivater
- SOCE: store operated calcium entry
- STIM: stromal interaksjonsmolekyl
- STZ: streptozotocin
- TRPC1: forbigående reseptorpotensial kanonisk 1
- TRPM2: forbigående reseptorpotensial kationkanal

Introduksjon

I munnhulen har vi tre par store spyttkjertler; glandula sublingualis, glandula submandibularis og glandula parotis. I tillegg til disse finnes mange små spyttkjertler fordelt i hele munnhulen. De skiller ut en vannaktig væske, kalt saliva, som respons på ulike signaler fra det autonome nervesystemet. Når spyttkjertlene mottar dette signalet, dannes det blant annet et intracellulært Ca^{2+} -signal som regulerer salivasekresjonen (1). Det er viktig å huske på at det også er en basalsekresjon av saliva.

Hyposalivasjon er patologisk redusert salivasekresjon. Det er mange årsaker til hyposalivasjon, og et stort antall tilstander påvirker spyttkjertlene. For eksempel gir både strålebehandling, diabetes og Sjøgrens syndrom redusert salivasekresjon (1). Etiologien er usikker, og mange molekylære mekanismer er foreslått. Man vet at cellene utsettes for oksidativt stress ved alle de tre tilstandene, altså en forstyrrelse mellom frie radikaler fra blant annet celleånding og antioksidative systemer (2). Spørsmålet er om oksidativt stress kan påvirke Ca^{2+} -signaleringsmekanismen i en celle, eller om det er andre faktorer som spiller inn. Denne oppgaven vil ta for seg om det er en molekylær fellesnevner bak hyposalivasjon ved strålebehandling i hode- og halsområdet, diabetes og Sjøgrens syndrom, med hovedfokus på Ca^{2+} -signaleringsmekanismen.

Saliva

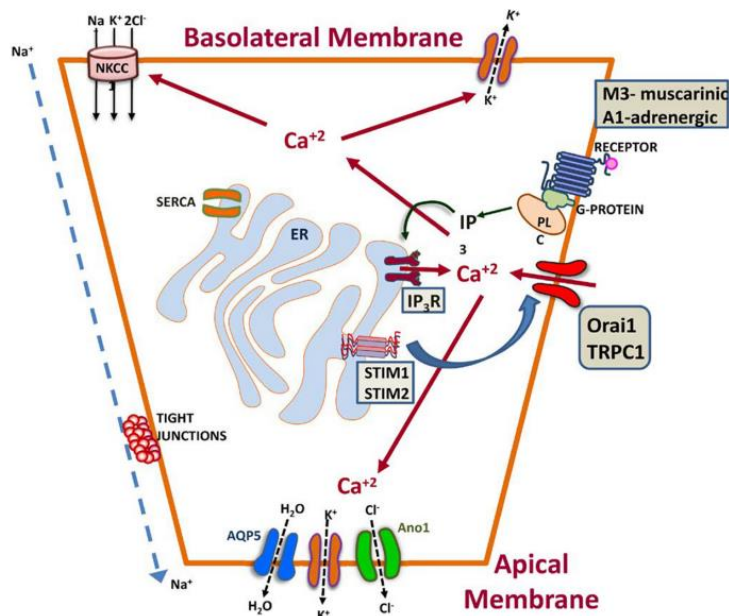
Saliva består av 99% vann (3). Den resterende 1%, med proteiner og elektrolytter gir saliva dens viktige funksjoner. Saliva gjør det lettere å svelge, starter fordøyelsen, og renser munnhulen for matrester, bakterier etc. I tillegg inneholder saliva bufferkomponenter som nøytraliserer syrer, mucin som beskytter slimhinnen og elektrolytter som gjenoppbygger tannemalje. Ved normal salivasjon tenker man ikke over hvilken funksjon saliva har. Lav sekresjon vil derimot kunne gi ugunstige konsekvenser, som blant annet karies og andre infeksjoner. Normal stimulert salivasekresjon er 1,0-2,0 ml/min, og normal ustimulert salivasekresjon er 0,2-0,5 ml/min. Salivasjon måles ved salivatester, og kriterier for hyposalivasjon er ustimulert saliva under 0,1 ml/min, og stimulert saliva under 0,7 ml/min (4). Dette er objektive kriterier, i motsetning til xerostomi, som er en subjektiv følelse av

munntørrhet (3). I 2016 mottok 0,62% av personer i Norge over 21 år refusjon for hyposalivasjon (5). Det er trolig store mørketall for hvor mange som plages av hyposalivasjon, da det kreves mye dokumentasjon for å få refusjon (4).

Ca²⁺-signaleringsmekanismen

I den forlengede marg har vi en spyttkjerne som heter *nucleus salivatorius* (6). Ved ulike stimuli, som for eksempel smak og lukt av mat og tygging, går det et afferent signal til spyttkjernen. Fra kjernen går et efferent signal ut til spyttkjertlene for å øke salivasekresjonen. Her finner vi acini og utførselsganger. I acini dannes primærsekresjon, og i utførselsgangene skjer en sekundær modifikasjon av saliva.

Via de parasympatiske nerveendene frigjøres nevrotransmitteren acetylkolin (ACh) (7). Denne binder til og aktiverer M3R. Dette er en G protein-koblet reseptor i plasmamembranen til de acinære cellene. Videre aktiveres enzymet fosfolipase C (PLC) som har i oppgave å spalte fosfatidylinositol 4,5 bisfosfat (PIP₂) til inositol-1, 4,5-trisfosfat (IP₃) og 1,2-diacylglycerol (DAG). IP₃ binder til den Ca²⁺-frigjørende IP₃-reseptor i membranen til endoplasmatisk retikulum (ER), slik at denne kanalen åpnes (1;8). Ca²⁺ forlater ER, og dette gir økt konsentrasjon i cytosol. Redusert Ca²⁺ i ER vil aktivere et Ca²⁺-sensorprotein i membranen som heter stromal interaksjonsmolekyl 1 (STIM1). Dette vil videre sette i gang en mekanisme som heter *store operated calcium entry* (SOCE). SOCE består av kalsiumkanalene Ca²⁺ frigjørende-aktivert kalsiumkanal protein 1 (Orai1) og forbigående reseptorpotensial kanonisk 1 (TRPC1). Disse befinner seg i plasmamembranen, og vil ved stimulering via STIM1, føre til økt innstrømning av Ca²⁺ til cytosol. Dette aktiverer andre ione kanaler slik at man får økt salivasekresjon. Deretter passerer Ca²⁺ videre inn til ER for å fylle opp kalsiumlagrene. I tillegg finnes et annet Ca²⁺-sensorprotein i ER, STIM2, som forbedrer sensitiviteten ved uttømming av Ca²⁺ fra ER. Dette er oppsummert i figur 1.



Figur 1: Ca^{2+} -signaleringsmekanismen i en acinær celle i spyttkjertlene. Hentet fra Ambudkar et al. (2018) med tillatelse fra Elsevier (1).

Ca^{2+} har en sentral rolle ved at det er det primære signalet for salivasekresjon (7). I ustimulerte acinære celler er konsentrasjonen av Ca^{2+} lavere enn hva som er nødvendig for å stimulere sekresjon av saliva (1). Når cellene mottar signaler fra nervesystemet, får man en forbigående økning i Ca^{2+} -konsentrasjonen via IP_3 . For å få et vedvarende høyt nivå, får man tilførsel av ekstracellulært Ca^{2+} via SOCE. Oppgaven til Ca^{2+} er å binde til Ca^{2+} -sensitive kanaler og transportører i plasmamembranen i acinære celler, slik at de blir mer aktive (7). I den basolaterale membranen blir natrium-kalium-klor-kotransportør (NKCC) og K-kanaler stimulert av Ca^{2+} , mens i den apikale membranen får aquaporin-5 (AQP5), K-kanaler og Cl-kanaler økt aktivitet (8). Som følge av dette vil vann og ioner transporteres over epitelcellen, fra basolateral til apikal side, og det dannes et primærsekret. Dermed er et vedvarende høyt nivå av Ca^{2+} i cytosol, via STIM og SOCE, essensielt for å opprettholde en forlenget salivasekresjon.

Strålebehandling i hode- og halsområdet

Kreft refererer til mange ulike sykdommer, der unormal ondartet cellevekst er en fellesnevner. Hode- og halskreft utgår fra munnhule, leppe, svelg, nese og bihuler, spyttkjertler eller

strupehode (9). Tall fra kreftregisteret viser at 797 personer ble diagnostisert med disse kreftformene i Norge i 2019, noe som utgjør omtrent 2,5% av nye krefttilfeller per år (10;11). Strålebehandling er et behandlingsalternativ ved kreft. Strålingen vil i mange tilfeller treffe omliggende vev, slik som spyttkjertlene. Dette kan påvirke de orale funksjonene, og kan gi hyposalivasjon. Som tannleger kan man møte disse pasientene både før og etter behandling.

En naturlig tanke er at salivasekresjonen reduseres som følge av at cellene i spyttkjertlene dør. Dette ble også foreslått av Stephen et al. i 1989 (12). Forskerne påviste strålingsindusert apoptose i spyttkjertlene til aper, men dette var først og fremst en kvalitativ studie. 10 år senere ble det gjennomført en mer kvantitativ studie fra parotiskjertler hos rotter (13). Resultater fra forskningen viste at den strålingsinduserte reduksjonen i salivasekresjon forekommer før apoptose. Man måtte derfor rette forskningsfokuset mot noe annet.

En følge av strålebehandling er, som tidligere nevnt, økt dannelse av ROS (14). Dette skjer gjennom radiolyse av vann som reagerer med oksygen. Dette påvirker mitokondriell membranpermeabilitet, noe som også stimulerer ROS-produksjon. Økt mengde ROS aktiverer enzymet poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), noe som fører til produksjon av adenosin difosfat ribose (ADPR) (1). ADPR binder til og aktiverer Ca^{2+} -permeabel forbigående reseptorpotensial kationkanal 2 (TRPM2). TRPM2 finnes i hele kroppen, inkludert spyttkjertlene (15). Som følge av at ROS aktiverer TRPM2, er det foreslått at denne kanalen er en redokssensor.

Diabetes

Diabetes mellitus er en gruppe sykdommer hvor insulin er involvert. Det er flere ulike typer, der type 1 og 2 er mest utbredt. Type 1 er en autoimmun sykdom som fører til at bukspyttkjertelen ikke produserer insulin (16). Type 2 er mer sammensatt, og skyldes både redusert insulinsekresjon og at insulinet som er tilstede ikke fungerer. Genetikk og livsstil i form av aktivitet og kosthold er viktige årsaksfaktorer til diabetes type 2 (17).

I 2020 ble det anslått at mellom 316 000 og 345 000 nordmenn har diabetes (18). 60 000 av disse er antatt å ha udiagnostisert diabetes. Dette er et usikkert tall fordi det i stor grad er basert på skjønn. Rundt 90% av diabetikere har diabetes type 2.

Det er mange ulike symptomer på diabetes, og det varierer ut fra hvilken type man har. Diabetes type 1 har ofte en raskere utvikling, og utarter seg med mer akutte symptomer (19). Vanlige akutte symptomer er vektreduksjon, følelse av dehydrering, tretthet og hyppigere urinering. Ved diabetes type 2 utvikler symptomene seg langsommere (19). De vanligste symptomene er tretthet og slapphet. Det kan ofte gå mange år før pasienten oppsøker lege, og dette er trolig bakgrunnen for det høye antallet udiagnostiserte diabetespasienter. Andre symptomer er uklart syn, soppinfeksjon i underlivet og saktegroende sår.

Den rådende hypotesen for hvorfor mange diabetikere har hyposalivasjon, er at hyperglykemi ved uregulert diabetes fører til økt osmotisk trykk i nyrene grunnet økt glukoseinnhold i urinen (20). Dette gir polyuri og redusert blodvolum. Som følge av dette er salivasekresjonen nedsatt. Nyere forskning viser imidlertid at det kan være andre molekylære mekanismer som forklarer nedsatt salivasekresjon (20-22).

Sjøgrens syndrom

Sjøgrens syndrom er en kronisk autoimmun sykdom som rammer de eksokrine kjertlene, blant annet spyttkjertler og tårekjertler (23;24). Kroppen klarer ikke skille mellom hva som er egne celler, og hva som er fremmede celler. Det finnes to typer av Sjøgrens syndrom; primært og sekundært. Primært Sjøgrens syndrom (pSS) kalles også *sicca* syndrom, og affiserer de eksokrine kjertlene. Sekundært Sjøgrens syndrom har i tillegg til dette også en assosiasjon med en annen bindevevssykdom, som systemisk lupus erythematosus, revmatoid artritt eller systemisk sklerose.

Gøransson et al. viste at prevalensen av Sjøgrens syndrom er ca. 0,05% (25;26). Dette er imidlertid en studie i en svært begrenset norsk befolkning. En internasjonal metaanalyse viste at gjennomsnittlig prevalens av Sjøgrens syndrom er ca. 0,06 % (27). Resultatet baserer seg

på totalt 18 studier som er valgt ut fra inklusjonskriterier. Dette gir en bedre innsikt i forekomsten på verdensbasis, men også her er tallene først og fremst hentet fra Europa og Asia. Forekomsten av Sjøgrens syndrom er derfor noe usikker, blant annet fordi det brukes ulike klassifiseringssystemer for å få diagnosen. Man vet at flertallet av de som rammes er kvinner.

For å få diagnosen primært Sjøgrens syndrom må man oppfylle visse kriterier. Disse varierer ut fra hvilken klassifisering man tar utgangspunkt i. Klassifiseringskriteriene fra den amerikansk-europeiske konsensusgruppen fra 2002 brukes mye. Her opereres det med at man må oppfylle fire av seks gitte kriterier (24;28;29). Kriterium 5 eller 6 må være oppfylt, noe som vil si at det er behov for en medisinsk objektiv prøve, enten i form av biopsi eller blodprøve. Kriteriene er som følger:

1. Tørre øyne
2. Tørr munn
3. Påvist nedsatt tåreproduksjon, for eksempel ved Schirmers test.
4. Påvist nedsatt salivasekresjon
5. Leppebiopsi som viser karakteristiske forandringer
6. Antistoffer i blodet (SSA, SSB, RF eller ANA)

Ved sekundært Sjøgrens syndrom brukes mange av de samme kriteriene. Man må oppfylle kriteriet 1 eller 2, og to av kriteriene 3-5 (24). I tillegg må man som tidligere nevnt ha en annen bindevevssykdom.

American College of Rheumatology (ACR) Board of Directors og *European League Against Rheumatism (EULAR)* publiserte i 2017 nye kriterier for pSS (30). Her har man vektet fem ulike kriterier, og laget et skåringssystem på bakgrunn av dette (tabell 1).

Tabell 1: Klassifikasjonskriterier fra 2017. Det kreves skår på ≥ 4 for å oppfylle kriterier for pSS.

Kriterium	Skår
Positiv anti-SSA/Ro	3
Spyttkjertelbiopsi med fokal lymfatisk sialadenitt. Det kreves ett eller flere foci per 4 mm ² .	3
Minst ett øye med unormal okulær fargeskår ≥ 5 . Eventuelt van Bijsterveld skår ≥ 4 .	1
Schirmer's test ≤ 5 mm/5 min	1
Ustimulert salivasekresjon $\leq 0,1$ ml/min	1

Symptombildet varierer fra pasient til pasient. Ofte tar det lang tid før diagnosen stilles, fordi plagene opptrer i perioder (29). I tillegg kan det ta tid før symptomene blir så karakteristiske at man kobler dem opp mot Sjøgrens syndrom. Det er trolig mange som ikke har noen diagnose, og forekomsten er antakelig høyere enn det som forespeiles.

De mest klassiske symptomene er tørrhet i munn, øyne, hud og underliv (24;31). Noen kan imidlertid oppleve å få økt tåreproduksjon i starten av sykdomsforløpet, men dette avtar etter hvert som sykdommen progredierer. Andre symptomer er leddsmerter og tretthet. Det er ikke vanlig at leddene skades permanent.

Karakteristisk for Sjøgrens syndrom er lymfocytinfiltrat, og dette vil nesten alltid føre til betennelse og deretter vevsødeleggelse (1). Man kunne tenkt seg at det er vevsødeleggelsen av spyttkjertlene som står bak hyposalivasjon. Studier viser imidlertid at redusert salivasekresjon kommer før åpenbar betennelse og vevsødeleggelse, slik at dette ikke kan være hele forklaringen (22;32;33). De molekylære mekanismene som står bak hyposalivasjon ved Sjøgrens syndrom er ikke kjent, men det er flere foreslåtte mekanismer.

Oksidativt stress og ROS

Ved celleånding dannes normalt frie radikaler og ROS (2). Oksidativt stress oppstår når det ikke er balanse mellom produksjonen og elimineringen eller nøytraliseringen av disse. Dette kan skje hvis ROS tilføres utenfra, som for eksempel ved ioniserende stråling. Frie radikaler og ROS kan blant annet føre til skade på proteiner, membraner, RNA og DNA. Kroppen har flere antioksidant-mekanismer for å regulere mengden av ROS i kroppen. Ved diabetes, Sjøgrens syndrom og pasienter utsatt for strålebehandling av hode- og halsområdet er det likevel funnet at cellene utsettes for mer oksidativt stress enn hos mennesker uten disse tilstandene (34-36).

Materialer og metoder

I denne oppgaven har det vært gjennomført søk etter litteratur i databasen PubMed (*database of the U.S. National Library of Medicine*) i perioden fra 10.3.2021 til 07.12.2022.

For å finne relevante studier ble det i første omgang søkt etter relevante oversiktsartikler. Her ble tidsrommet på forhånd satt til «siste 10 år», og det ble krysset av for «review» og «systematic review». Eksklusjonskriterium var publikasjoner på andre språk enn norsk og engelsk. Inklusjonskriterium var at journalen oversiktsartikkelen var publisert i, var fagfellevurdert. Følgende søk ble utført:

- Søk under «advanced» med søkeordene «hyposalivation» AND «calcium» AND «radiation». Totalt 4 resultater.
- Søk under «advanced» med søkeordene «hyposalivation» AND «calcium» AND «sjøgren». Totalt 12 resultater.
- Søk under «advanced» med søkeordene «diabetes» AND «salivary gland»: Totalt 50 resultater.

Dette ga totalt 66 resultater. Vi var på jakt etter artikler som omhandlet de molekylære mekanismene bak hyposalivasjonen ved tilstandene. Basert på tittel og sammendrag ble det valgt ut 6 oversiktsartikler som ble lest fullstendig. Vi endte opp med 2 oversiktsartikler som omhandlet temaene Ca^{2+} -signaler, strålebehandling i hode- og halsregionen, Sjøgrens syndrom, diabetes og hyposalivasjon.

Fra disse 2 oversiktsartiklene ble det hentet ut 10 originalartikler som ble lest grundig for å se om de var relevante for oppgaven. 4 originalartikler ble funnet relevante, og vi valgte å ta med disse videre i oppgaven.

Det ble videre bestemt at vi for hver tilstand (strålebehandling i hode- og halsregionen, Sjøgrens syndrom og diabetes) skulle legge frem 3-4 originalartikler. For å finne flere

relevante studier, ikke minst studier som var for nye til å være omtalt i oversiktsartiklene, ble det derfor gjennomført nye søk i PubMed. På samme måte som for søket over, var eksklusjonskriterium publikasjoner på andre språk enn norsk og engelsk, og journalen skulle være fagfellevurdert. Følgende søk ble utført:

- Søk under «advanced» med søkeordene «soce» AND «salivary gland»: Totalt 23 publikasjoner.
- Søk under «advanced» med søkeordene «hyposalivation» AND «ROS» AND «diabetes»: Totalt 4 publikasjoner.
- Søk under «advanced» med søkeordene «diabetes» AND «aquaporin» AND «salivary gland»: Totalt 39 publikasjoner.
- Søk under «advanced» med søkeordene «sjogren» AND «aquaporin» AND «saliva»: Totalt 41 publikasjoner.
- Søk under «advanced» med søkeordene «radiation» AND «caspase» AND «salivary gland»: Totalt 32 publikasjoner.
- Søk under «advanced» med søkeordene «radiation» AND «aquaporin» AND «muscarine»: Totalt 14 publikasjoner.

Dette ga totalt 153 resultater. For å inkludere de nyeste artiklene innen temaene ble tidsrommet satt til «siste 10 år». Antall publikasjoner ble da redusert til 96 publikasjoner. For hvert av resultatene ble studier som ikke svarte på problemstillingen vår ekskludert ut fra tittelen og sammendrag. Etter dette var det 14 publikasjoner igjen. Disse ble lest i sin helhet, og studier som likevel ikke var relevant for oppgaven ble ekskludert. Artiklene ble vurdert i forhold til oppgavens problemstilling. Til slutt var det 6 publikasjoner igjen.

Til sammen er det dermed inkludert 10 studier i resultatdelen av oppgaven.

Resultater

Strålebehandling i hode- og halsområdet

I et forsøk publisert av Liu et al. i 2017 testet man effekten av stråling på TRPM2-positive og -negative mus, og en human cellelinje fra gl. submandibularis (37). Begge gruppene fikk en reduksjon i salivasekresjon, men sekresjonen kom tilbake hos TRPM2-negative mus. Som følge av aktivert TRPM2 fikk man økt tilstrømning av Ca^{2+} intracellulært. TRPM2-positive mus viste større økning av intracellulært Ca^{2+} enn TRPM2-negative mus etter strålebehandlingen, men dette var forbigående, og nivåene gikk tilbake til kontroll innen få dager. Man ville videre finne ut hvilke mekanismer som gjorde at aktivering av TRPM2 førte til nedsatt salivasekresjon ved strålingsterapi. Reduksjon av SOCE var den hypotesen som sto sterkest. Forskerne valgte derfor å se videre på dette. Man fant at SOCE ble redusert med rundt 75% 10 dager etter bestråling i TRPM2-positive mus, og det var ingen forbedring etter 30 og 60 dager. Ved Western blotting ble det vist at det var STIM1 som var redusert. Verken TRPC1 eller Orai1, som er andre viktige komponenter i SOCE, var redusert. I TRPM2-negative mus var også SOCE redusert etter 10 dager, men her var det 75% gjenopprettelse av spyttproduksjon etter 30 dager. Videre ble det vist at strålingsindusert aktivering av TRPM2 med påfølgende økt tilstrømning av Ca^{2+} intracellulært, førte til økning i mitokondrielt Ca^{2+} og mitokondrielt ROS. I tillegg ble det funnet reduksjon i mitokondrielt membranpotensial, men det er usikkert om dette var en direkte effekt av strålingsterapien. Reduksjonen i STIM1 ble funnet å korrelere med aktivering av proteinet kaspase-3. Dette så man både i humane celler fra gl. submandibularis og TRPM2-positive mus. TRPM2-positive og -negative mus hadde lik mengde kaspase-3 før stråling. Etter stråling hadde TRPM2-positive mus 10 ganger mer kaspase-3 etter 3 dager, og 5 ganger mer etter 30 dager. I TRPM2-negative mus var nivået av kaspase-3 3 ganger høyere enn hos kontroll etter 3 dager, men etter 10 dager var aktiviteten til kaspase-3 lik som før bestråling. Studien fant altså at aktivert TRPM2 førte til mer Ca^{2+} i cytosol som ble tatt opp av mitokondriene. Dette ga redusert membranpotensial, økt produksjon av mitokondrielt ROS og aktivering av kaspase-3. Kaspase-3 ble funnet å være ansvarlig for reduksjon av STIM1, og dette kan forklare nedsatt salivasekresjon.

I en forskningsartikkel publisert av Ren et al. 2022 presenteres en studie om strålingsindusert hyposalivasjon, og hvordan det muligens kan forhindres med ROS-scavengeren HL-003 (38). 24 mus ble inkludert i studien, og disse ble fordelt i fire grupper; en kontrollgruppe, en gruppe der spyttkjertlene ble utsatt for stråling (15 Gy), og to grupper som ble utsatt for stråling i tillegg til ulike behandlinger. For å teste om en behandling har effekt, må man se hvordan forholdene er uten behandling. Man målte derfor salivasekresjonen hos mus utsatt for stråling. Dette ble gjort ved injeksjon av muskarinerg acetylkolin agonist pilokarpin som stimulerer salivasekresjon. 3, 7 og 10 dager etter stråling var salivasekresjonen signifikant redusert hos mus eksponert for stråling. Ved Western blotting ble det funnet økt nivå av kaspase-3, og immunhistokjemisk farging viste at nivået av AQP5 var signifikant redusert i gruppen utsatt for stråling sammenliknet med kontrollgruppen. Aquaporiner er viktig for regulering av cellevolum, og AQP5 er som nevnt en vannkanal som er vist å ha stor betydning for salivasekresjon (39-41). Ved behandling med ROS-scavenger HL-003 så man at oksidativt stress ble redusert, og nivået av AQP5 var likt som i kontrollgruppen (38). Beskyttelseeffekten HL-003 hadde på oksidativt stress ved stråling ble utforsket videre ved å se på ulike markører. Ved immunhistokjemi målte man nivåene av en biomarkør for oksidativt stress; 8-OHdG, og et antioksidantenzym; SOD2. Sammenliknet med kontrollgruppen så man at det var høyt nivå av 8-OHdG-fargingen i gruppen utsatt for stråling. Gruppen som var utsatt for stråling, men behandlet med HL-003, hadde derimot lavere nivåer av 8-OHdG-fargingen. Antallet SOD2-positive celler var høyere i strålingsgruppen behandlet med HL-003, enn i strålingsgruppen som ikke fikk denne behandlingen. Resultatene i denne studien tyder på at stråling øker oksidativt stress og reduserer salivasekresjonen, og at HL-003 kan motvirke dette.

En artikkel av Wu et al. fra 2021 presenterer funn angående strålingsindusert hyposalivasjon, med fokus på mulig beskyttende effekt av iskemisk prekondisjonering (42). Dette er en metode der man utsetter kroppen for forbigående perioder med iskemi, og dette skal beskytte celler eller organer for senere iskemi. Til sammen 30 rotter var inkludert i forsøket. Salivaflow, som ble målt ved hjelp av et rør innsatt i gl. submandibularis, var signifikant redusert hos rotter utsatt for stråling sammenliknet med kontrollgruppen. Etter 1 uke var det redusert med 28,2%, og etter 12 uker med 42,9%. Iskemisk prekondisjonering ble oppnådd gjennom tre minutters okklusjon av arteria facialis, etterfulgt av tre minutter med reperfusjon. Denne sekvensen ble gjentatt tre ganger før bestråling ble utført. Salivaflow i denne gruppen

var 19,3% og 16,7% høyere ved henholdsvis 1 og 12 uker, enn i gruppen som kun var utsatt for stråling. Ved hjelp av immunfluoresens, Western blotting og PCR fant man at mRNA-nivået og proteinuttrykket av M3R og AQP5 var redusert i strålingsgruppen sammenliknet med kontrollgruppen, både etter 1 og 12 uker. I gruppen utsatt for iskemisk prekondisjonering etterfulgt av bestråling var mRNA-nivået og proteinuttrykket av M3R og AQP5 signifikant høyere ved 1 og 12 uker, sammenliknet med gruppen kun utsatt for stråling. Dataene presentert i studien til Wu et al. viser at redusert M3R og AQP5 kan være en molekylær mekanisme bak hyposalivasjon ved stråling, og at iskemisk prekondisjonering ser ut til å ha en beskyttende effekt av stråling på både sekresjon, M3R og AQP5.

Diabetes

Xiang et al. utførte i 2019 et forsøk der de studerte hvordan diabetes påvirker spyttkjertlene (21). Fordi tidligere studier har foreslått at mitokondrier kan ha en viktig rolle ved diabetes, valgte forskerne å undersøke dette videre. Forskerne brukte db/db mus for å simulere diabetes. Disse har en mutasjon i diabetes (db) genet som koder for leptinreseptor. Som kontroll ble det brukt db/m mus. Det ble observert at db/db mus hadde større kroppsvekt og -størrelse enn kontrollgruppen. Likevel hadde db/db mus signifikant mindre vekt og størrelse på gl. submandibularis og parotis sammenliknet med kontrollgruppen. Gl. sublingualis var lik hos begge grupper. Dette indikerer at størrelsen på gl. submandibularis og parotis påvirkes av diabetes. I tillegg kunne man se cellulære forandringer. Hos db/db mus ble det i gl. submandibularis registrert forstørrelse av acini og atrofierte utførselsganger. Dette indikerer at diabetes fører til histologiske forandringer i spyttkjertelen. Tilsvarende funn ble ikke funnet i de andre spyttkjertlene. For å studere effekten dette hadde på salivasekresjonen, fikk mus satt inn et lite kapillærrør i gl. submandibularis sin utførselsgang. Mus i begge gruppene fikk injisert pilokarpin, og etter 10 minutter kunne man måle stimulert saliva ut fra rørene. Stimulert saliva fra gl. submandibularis var signifikant redusert med 67% i db/db mus. Det ble samtidig funnet økt ROS hos db/db mus. I tillegg fant man redusert mitokondrie-membranpotensial og adenosin 5-trifosfat (ATP), noe som gir mitokondriell dysfunksjon. Det ble også funnet økt uttrykk av proteinene PTEN-indusert kinase 1 (PINK1) og Parkin, og redusert ekstracellulære signalregulerte kinaser 1/2 (ERK1/2). Dette er proteiner som har innvirkning på mitofagi. Mitofagi er en prosess der ødelagte mitokondrier fjernes fra cellene på en kontrollert måte slik at oksidativt stress reduseres. Studien konkluderte med at økt

oksidativt stress kan være årsaken til mitokondriell dysfunksjon og økt mitofagi. De spekulerer videre i at redusert mitokondriekapasitet gir for lite ATP-produksjon til å drive salivasekresjonen. Studien demonstrerte ulike morfologiske forandringer som skjer i gl. submandibularis når man er eksponert for et diabetisk miljø, og at disse kan være en drivende faktor for hyposalivasjon hos diabetespasienter.

En studie utført av Cui et al. fra 2021 så på forholdet mellom nedsatt salivasekresjon ved diabetes og uttrykk av ulike AQP i gl. submandibularis hos rotter (20). Rottene ble delt inn i tre grupper; kontrollgruppe, diabetesgruppe og insulingruppe. Rottene i diabetes- og insulingruppen inntok fettrik diett i 2 måneder for å hemme glukosetoleransen og indusere insulinresistens. Deretter ble β -cellene i pankreas ødelagt ved injeksjon av streptozotocin (STZ). På denne måten laget man modeller med diabetes type 2, hvor kun insulingruppen ble behandlet med insulin. Ved hematoksylin-eosin-farging fant man at acini var noe atrofiert, og de acinære cellene var organisert i et irregulært mønster i diabetesgruppen. Ved immunhistokjemisk farging så man redusert nivå av AQP1, AQP5 og AQP8 hos diabetesgruppen, sammenliknet med kontroll- og insulingruppen. Det ble brukt bildeanalyse på datamaskin for å se på verdier for gjennomsnittlig optisk tetthet (MOD-verdier) av AQP1, AQP5 og AQP8. Jo høyere tall, desto større uttrykk. Uttrykket av de tre typene aquaporiner var signifikant redusert i diabetesgruppen sammenliknet med kontroll- og insulingruppen. Det ble ikke presentert eksakte tall, men vi kan lese ut fra figur 5 i artikkelen at de omtrentlige MOD-verdiene for AQP1, AQP5 og AQP8 er henholdsvis 0,31, 0,35 og 0,43 hos kontrollgruppen, og 0,28, 0,30 og 0,37 hos insulingruppen. For diabetesgruppen leses verdiene til 0,23, 0,25 og 0,31. Studien belyser dermed at AQP1, AQP5 og AQP8 påvirkes negativt av diabetes, og at dette kan forklare hyposalivasjon. Insulin kan ha en beskyttende rolle ved å oppregulere nivået av de nevnte aquaporiner.

Salivasekresjon og muskarinreseptorer ved diabetes har blitt undersøkt i en studie av Watanabe et al. (2001) (22). Det ble benyttet rotter hvor man hadde en kontrollgruppe som fikk injisert saltvann og en STZ-indusert diabetesgruppe. Det ble gjennomført salivasekresjonstester med og uten vanntilgang til rottene. Ved hver prøvetaking ble det benyttet tre bomullspellet som ble plassert i munnen til rottene i 10 sekunder av gangen. Disse ble overført til en beholder så raskt som mulig, og ble deretter veid. Forskjellen i vekt før og etter

prøvetaking viste hvor mye saliva som var sektrert. Med fri vanntilgang hadde kontroll- og diabetesgruppene omtrent lik salivasekresjon uten stimuli (tabell 2). Ved pilokarpin-stimulering så man en signifikant økning fra ustimulert til stimulert saliva hos begge gruppene. Denne økningen var signifikant 2-3 ganger større hos kontrollgruppen enn hos STZ-indusert diabetesgruppe. Uten vanntilgang hadde kontrollgruppen signifikant høyere ustimulert saliva i forhold til STZ-indusert diabetesgruppen (tabell 3). Ved pilokarpin-stimulering så man økt salivasekresjon hos kontrollgruppen etter 30 og 60 minutter. STZ-indusert diabetesgruppe hadde en ikke-signifikant minimal økning i stimulert saliva etter 30 og 60 minutter. Dette indikerer at redusert salivasekresjon kan forverres av polyuri som diabetikere opplever.

Tabell 2: Salivasekresjonsmålinger hos kontroll- og diabetesgruppen med fri vanntilgang.

* signifikant forskjell mellom ustimulert og stimulert saliva.

¤ signifikant forskjell mellom kontroll- og diabetesgruppen.

	Ustimulert saliva	Stimulert saliva	
		30 min	60 min
Kontrollgruppe	60 µl/min	112 µl/min *	93 µl/min *
Diabetesgruppe	54 µl/min	70 µl/min ¤	78 µl/min *

Tabell 3: Salivasekresjonsmålinger hos kontroll- og diabetesgruppen uten vanntilgang.

* signifikant forskjell mellom ustimulert og stimulert saliva.

¤ signifikant forskjell mellom kontroll- og diabetesgruppen.

	Ustimulert saliva	Stimulert saliva	
		30 min	60 min
Kontrollgruppe	56 µl/min	132 µl/min *	94 µl/min *
Diabetesgruppe	37 µl/min ¤	39 µl/min ¤	48 µl/min ¤

Man ville også undersøke om muskarinreseptoren var påvirket av diabetes (22). Dette ble undersøkt ved bruk av radioligand-bindingsanalyser, hvor de brukte en radioaktiv antagonist til muskarinreseptoren. Resultatet var: (i) redusert antall bindingssteder for muskarinreseptor-antagonisten i parotis-kjertelen, (ii) redusert affinitet av muskarinreseptoren i membranen på submandibular-kjertelen, og (iii) redusert legemiddelmottagelighet for muskarinreseptor-agonister, som pilokarpin, hos diabetesgruppen sammenliknet med kontrollgruppen. Studien

konkluderte med at nedsatt spyttproduksjon hos STZ-induserte diabetesrotter ikke bare skyldes polyuri, men også redusert antall muskarinreseptorer i spyttkjertlene og at reseptoren har nedsatt affinitet for agonistene sine.

Sjøgrens syndrom

Teos et al. (2015) undersøkte en hypotese om at defekter i Ca^{2+} -signaliseringen i acinære celler er forklaringen på nedsatt salivasekresjon hos pasienter med pSS, der det enda ikke er lymfocytinfiltrasjon eller påvisbar skade histologisk (43). Det ble brukt biopsier fra de små spyttkjertlene hos 24 pasienter med pSS og 22 friske frivillige. Ingen av de friske frivillige hadde subjektive orale symptomer. Forskerne fant hos pSS-pasienter signifikant redusert salivasekresjon sammenliknet med kontrollgruppen, selv der det var mye gjenværende intakt spyttkjertelvev. For å vurdere frigjøringen av intracellulært Ca^{2+} i acinære celler, ble det tilført karbakol (CCh) som binder og aktiverer ACh-reseptorer. Forandringene ble målt ved hjelp av Fluo2 fluorescens fra 7 friske og 11 pSS pasienter. Forskerne fant hos pSS-pasientene signifikant redusert frigjøring av intracellulært Ca^{2+} ved alle konsentrasjoner av CCh sammenliknet med kontrollgruppen. Det indikerer en redusert CCh-avhengig frigjøring av Ca^{2+} , fremfor en nedsatt sensitivitet til CCh. De fant også at IP3R2 og IP3R3 er redusert i morfologisk intakte områder i spyttkjertelbiopsier fra acinære celler hos pasienter med pSS. IP3R er, som tidligere nevnt, en viktig faktor for frigjøring av Ca^{2+} fra ER. Også uttrykket av AQP5 og STIM 1 ble undersøkt, men her fant man kun reduksjon i områder med lymfocytinfiltrasjon. $\text{I}\alpha$ -TG-mus er en modell som viser mange likheter med forløpet av Sjøgrens syndrom, blant annet tap av salivasekresjon før lymfocytinfiltrasjon. Teos et al. undersøkte derfor disse musene. Det de fant bekrefter resultatet fra de humane cellene, nemlig at den primære mekanismen som forårsaker tap av salivasekresjon er en reduksjon i Ca^{2+} -signalering som følge av tap av IP3R.

M3R er reseptoren for ACh, og dermed sentral for parasymptatisk stimulering av salivasekresjonen. I en studie av Passafaro et al. (2010) ble det funnet autoantistoffer mot M3R hos pasienter med Sjøgrens syndrom (44). 15 kvinner i alderen 33-55 år, og som hadde hatt diagnosen pSS i 7-15 år, ble inkludert i studien. 18 kvinner i samme aldersgruppe, uten systemiske sykdommer, ble brukt som kontroll. Det ble tatt biopsi og målt salivasekresjon før

forsøket ble utført. IgG fra pasientene ble isolert, og så ble autoantistoffene mot M3R isolert fra dette igjen. Autoantistoffer fra pasientene med pSS ble studert på M3R i gl. submandibularis hos rotter. Det ble funnet at disse fungerte som en delvis muskarinerg agonist, og man fant økt nivå at prostaglandin E₂ (PGE₂), som videre korrelerte med inhibisjon av Na⁺/K⁺-ATPase-aktivitet. Det ble funnet at ionebalansen var endret, og dette kan påvirke salivasekresjonen negativt. Autoantistoffene ser altså ut til å ha flere effekter på spyttkjertlene. Den økte produksjonen av PGE₂, som er pro-inflammatorisk, kan både føre til inflammasjon i kjertelen, og samtidig redusert salivasekresjon på grunn av den inhiberende effekten på Na⁺/K⁺-ATPasen.

Aquaporiner er vannkanaler som er viktig for regulering av cellevolum. Enger et al. (2014) har studert betydningen av AQP5 for salivasekresjon (25). For å undersøke om evnen til volumregulering er redusert ved pSS, ble acinære celler fra pasienter med pSS utsatt for hypo-osmotisk stress. I en normal situasjon vil man forvente at volumet først øker, og man vil få en etterfølgende volumreduksjon som kompensasjon, hjulpet av AQP5. Den regulatoriske volumreduksjonen som kommer etter svellingen, var signifikant redusert hos pSS-cellene sammenliknet med kontrollceller. Dette tyder på at de har færre aquaporiner i membranen. Dette støttes av et qPCR-forsøk utført i studien, som viste redusert ekspresjon av AQP5 i pSS-cellene i forhold til kontrollcellene. Det er imidlertid viktig å huske på at permeabiliteten for vann også bestemmes av andre faktorer, som blant annet ionebalansen i og utenfor cellene. For at AQP5 skal innta sin plass i den apikale plasmamembranen, er man avhengig av et Ca²⁺-signal trigget av M3R-aktivering. I studien ble det også funnet at den intracellulære Ca²⁺-signaleringen var forstyrret. Tap av M3R kan dermed affisere funksjonen til AQP5. Studien konkluderte med at plasseringen og uttrykket av aquaporiner rammes hos pSS-pasienter, i tillegg til at man ser nedsatt evne til regulering av cellevolum og Ca²⁺-signalering, noe som kan forklares av det reduserte uttrykket av AQP5.

Dawson et al. (2001) hadde en hypotese om at hyposalivasjon hos pasienter med Sjögrens syndrom skyldes en forstyrrelse av enten frigjøringen av ACh, den dose-avhengige frigjøringen av intracellulær Ca²⁺ eller aktiveringen av Ca²⁺-avhengige K⁺ og Cl⁻-kanaler (45). Det ble hentet to små spyttkjertler ved biopsi fra underleppen til fire pasienter med påvist Sjögrens syndrom og fire friske kontrollpasienter som deltok i forbindelse med fjerning av en

mucocoele. Acinære celler ble skilt fra spyttkjertlene med mikrodisseksjon, og fikk tilført det Ca^{2+} -bindende fluoriserende stoffet fura-2 som binder Ca^{2+} i cytosol. Slik kunne man måle aktiviteten av intracellulær Ca^{2+} ved hjelp av mikrofluorometri. Acinære celler fra Sjøgrens- og kontrollgruppen responderte likt til maksimumdosen av ACh, men det var signifikant forskjell i den dose-avhengige responsen. Ved lavere konsentrasjon av ACh, var det nedsatt mobilisering av intracellulært Ca^{2+} sammenliknet med kontrollgruppen. For å vurdere effekten av dette på Ca^{2+} -avhengige K^+ og Cl^- -kanalene, ble det brukt elektrofysiologisk patch-clamp-teknikk. Det var ingen signifikant forskjell i kanalenes hvilestrøm hos de to ulike gruppene. Ved eksponering for ACh kunne man se at Sjøgrens-gruppen opplevde mye lavere aktivering av de Ca^{2+} -avhengige K^+ og Cl^- -kanalene enn kontrollgruppen. Det ble vist at ved Sjøgrens syndrom må man ha 10 ganger høyere konsentrasjon av ACh for å kunne frigjøre nok fritt Ca^{2+} i cytosol til å få samme stimulering av de Ca^{2+} -avhengige K^+ og Cl^- -kanalene som kontrollgruppen. Studien konkluderte med at pasienter med Sjøgrens syndrom har fungerende Ca^{2+} -avhengige K^+ og Cl^- -kanaler, men at hyposalivasjon kan oppstå som følge av at cellen har nedsatt sensitivitet for ACh.

Diskusjon

Artiklene i resultatdelen peker på ulike faktorer i Ca^{2+} -signaleringsmekanismen som kan forklare hyposalivasjon ved strålebehandling i hode- og halsregionen, diabetes og Sjøgrens syndrom. Finnes det fellesnevnerne?

Oksidativt stress og ROS

ROS vil trolig påvirke spyttkjertelcellene på flere måter, men man vet at det med stor sannsynlighet kan sette i gang et kaskadesystem som resulterer i aktivering av TRPM2 (1;15;36;37;46). Abuarab et al. publiserte i 2017 en studie med fokus på TRPM2 ved diabetes undersøkt på humane endotelceller (46). Resultatene viste at økt Ca^{2+} -innstrømning gjennom aktivering av TRMP2 i et hyperglykemisk miljø, førte til mitokondriell fisjon. Normalt er det en balanse mellom fusjon og fisjon i mitokondrier, men denne balansen tipper mot fisjon ved oksidativt stress. Som følge av dette dannes fragmenterte og dysfunksjonelle mitokondrier. Til sammenligning fant de ingen mitokondriell fragmentering i celler som manglet TRPM2 eller celler dyrket i normal glukosekonsentrasjon. Studien peker altså på at ROS-produksjon som følge av høyt nivå av glukose fører til aktivering av TRPM2, som videre fører til økt Ca^{2+} -innstrømning, mitokondriell fisjon og dysfunksjonelle mitokondrier. Det er usikkert om dette kan overføres til spyttkjertelceller. Studien til Xiang et al. viste økt produksjon av ROS i spyttkjertlene ved diabetes, og at dette kan føre til mitokondriell dysfunksjon (21). Det ble ikke studert hvorvidt TRPM2 er involvert, men det kan ikke utelukkes.

Studien til Liu et al. 2017 viste at TRPM2 har en viktig innflytelse på spyttproduksjonen, og aktiveres som følge av økt ROS-produksjon ved strålingsterapi (37). Tilstedeværelsen av kanalen fører til at STIM1 reduseres, trolig som følge av økt mengde aktivert kaspase-3 som spalter proteinet. Dette resulterer i en mindre effektiv Ca^{2+} -signaleringsmekanisme, noe som igjen medfører redusert salivasekresjon. De fullstendige mekanismene og sammenhengen mellom TRPM2 og kaspase-3 er ikke kjent. Resultatet fra studien til Ren et al. styrker teorien om at det er økt oksidativt stress som er bindeleddet mellom strålebehandling og redusert salivasjon (38). HL-003 virker som en slags antioksidant ved å fjerne ROS, og dermed

redusere oksidativt stress. I denne studien fant man at AQP5 beskyttes ved behandling med HL-003, og dette er et argument for at det er ROS som er grunnen til at AQP5, og dermed sekresjonen, er redusert. Både Liu og Ren belyser dermed at ROS-produksjonen er økt ved strålebehandling i hode- og halsområdet, og at dette har betydning for salivasjon. Disse peker på redusert STIM1 og AQP5 som to ulike komponenter som påvirker Ca^{2+} -signaleringsmekanismen. Det styrker hypotesen om at ROS kan være en utløsende faktor til hyposalivasjon.

Studier ved to ulike tilstander har dermed rettet fokus mot oksidativt stress og ROS som mulig forklaring til hyposalivasjon (37;46). Om også Sjøgrens syndrom kan kobles opp mot dette er usikkert. Man vet at flere autoimmune sykdommer fører til dannelse av ROS og inflammatorisk respons (34), men det er lite litteratur angående Sjøgrens syndrom og oksidativt stress. Det gjør at man ikke kan utelukke at aktivering av TRPM2 og reduksjon av ulike komponenter i Ca^{2+} -signaleringsmekanismen kan være en del av sykdomsbildet også her.

Ved alle tre tilstandene kan man dermed mistenke en økt forekomst av oksidativt stress og ROS, og det er ikke utenkelig at dette spiller en rolle på spyttproduksjonen. Det er ikke nok tilgjengelig litteratur for å understreke om dette er en viktig fellesnevner bak hyposalivasjon ved alle tre tilstandene.

Dysfunksjonelle mitokondrier

Mitokondrier er viktige organeller som sørger for at cellene får tilstrekkelig energi i form av blant annet ATP. Dette spiller også en viktig rolle for spyttproduksjonen. Ved salivasekresjon er det flere ATP-avhengige ionepumper som krever energi for å pumpe ioner mot sin konsentrasjonsgradient (47;48). En mulig hypotese bak hyposalivasjon ved de tre aktuelle tilstandene baserer seg på at mitokondriene er dysfunksjonelle, slik at man får enten redusert mengde eller kvalitet på saliva. Det er blitt vist at det er økt ROS ved diabetes, og at dette aktiverer TRPM2 slik man får økt Ca^{2+} -innstrømning (46). Dette gir økt mitokondriell fisjon, og mitokondriene blir dysfunksjonelle. Det er blitt observert økt mitofagi hos

diabetesinduserte mus for å fjerne de dysfunksjonelle mitokondriene (21). ROS og redusert membranpotensial er noen av årsakene til at mitokondriene mister sin funksjon. I studiene fokuseres det ikke på om noen av disse årsakene virker inn på spyttproduksjonen på andre måter enn via mitokondriene. Man vet likevel at ROS påvirker cellen via flere andre mekanismer. Teorien om at dysfunksjonelle mitokondrier alene fører til nedsatt spyttproduksjon hos diabetikere står dermed svakt, men det kan ha en påvirkning. Det kan spekuleres i at når flere mitokondrier fjernes, eller at de har redusert funksjon, vil man ha mindre tilgjengelig ATP til å produsere saliva. Dette kan forklare noe av hyposalivasjonen hos diabetikere, men det er ikke evidens til å trekke noen konklusjon enda.

En oversiktsartikkel fra Barrera et al. har sett på betydningen av dysfunksjonelle mitokondrier ved Sjøgrens syndrom (49). Dysfunksjonelle mitokondrier kan frigjøre skade- eller faresignaler (DAMP). Disse kan binde seg til såkalte mønstergjenkjenningsreseptorer (pattern recognition receptors), og dette kan indusere inflammasjonsreaksjon som ses ved autoimmune sykdommer. Andre studier har, som tidligere nevnt, funnet ut at redusert salivasekresjon ses før åpenbar inflammasjon. Det er dermed usikkert hvorvidt dysfunksjonelle mitokondrier påvirker spyttproduksjonen på andre måter enn å stimulere til inflammasjon.

Det er ikke funnet lignende studier knyttet opp mot pasienter utsatt for stråling mot hode- og halsregionen, og derfor er det vanskelig å konkludere om dysfunksjonelle mitokondrier er en fellesnevner mellom de ulike tilstandene. Man kan likevel spekulere i om det vil opptre dysfunksjonelle mitokondrier i strålebehandlede spyttkjertler, siden vi vet at ROS øker betraktelig også i dette tilfellet. Ved Sjøgrens syndrom og diabetes ser det ut til at dysfunksjonelle mitokondrier påvirker cellen på et vis. Det er ikke avklart om dysfunksjonelle mitokondrier spiller en patologisk rolle rundt hyposalivasjon, men deres tilstedeværelse er bekreftet i noen studier som simulerte Sjøgrens syndrom og diabetes.

Aquaporiner

Aquaporiner er en gruppe av proteinkanaler som transporterer vann og små oppløste stoffer gjennom cellemembranen. Dette reguleres av osmotisk trykk, og spiller blant annet en viktig

rolle ved salivasekresjonen. Til nå er det identifisert 13 aquaporiner hos pattedyr (39;41). AQP5 er funnet i gl. parotis, gl. submandibularis, gl. sublingualis og i de små spyttkjertlene hos mennesker, rotter og mus. Det finnes også andre aquaporiner i spyttkjertler, men det er kun AQP5 som er vist å bli regulert i forbindelse med salivasekresjon.

Det er gjort flere studier angående aquaporiner og diabetes. Cui et al. fant redusert nivå av AQP1, AQP5 og AQP8 hos rotter med diabetes type 2 (20). I denne studien burde det blitt målt sekresjonsvolum for å vise at modellen deres faktisk hadde hyposalivasjon, og at det ble bedre ved insulin. Studien forklarer hyposalivasjon med at det har oppstått degenerative endringer i spyttkjertlene, men de underliggende årsakene til det reduserte nivået av aquaporiner kunne de ikke si noe om. Ved diabetes type 1 er det divergerende data angående AQP5. Noen studier finner redusert nivå (50-52), mens andre finner ingen endring (53). Det er med andre ord behov for ytterligere studier for å vurdere rollen til AQP5 ved diabetes, men vi kan ikke utelukke at det spiller en rolle ved hyposalivasjon.

Ved immunhistokjemisk farging har man funnet redusert AQP5 hos mus utsatt for stråling mot spyttkjertelregionen (38). Dette ble funnet 3, 7 og 10 dager etter stråling. Noe av det samme er funnet hos rotter, der man ved hjelp av immunfluoresens, Western blotting og PCR fant at mRNA-nivået og proteinuttrykket av AQP5 var redusert (42). Dette ble imidlertid funnet ved 1 og 12 uker etter stråling, noe som kan gi en indikasjon på at det reduserte nivået av AQP5 ikke kun ses i dagene etter stråling, men også etter 12 uker. Også ved diabetes type 2 er det hos rotter funnet at mRNA-nivået av AQP5 er redusert (54). Wang et al. fant i motsetning økt mRNA-nivå av AQP5, men redusert proteinuttrykk i gl.parotis hos rotter med diabetes type 1, og det foreslås at det er den posttranskripsjonelle dysreguleringen som fører til redusert nivå av AQP5 (51). Både redusert mRNA-uttrykk og posttranskripsjonell dysregulering kan forklare redusert AQP5 og dermed en del av patogenesen bak hyposalivasjon ved diabetes.

Hva så med Sjøgrens syndrom? Enger et al. testet hvordan de acinære cellene fra pasienter med og uten pSS responderte på et hypo-osmotisk miljø (25). Dette er en modell som kan brukes for å undersøke vannpermeabiliteten til celler. Ideelt sett skulle man ha sett en økning i

cellevolum etterfulgt av regulatorisk volumreduksjon. Enger et al. mente at årsaken til redusert volumkompensasjon ved pSS kunne tilskrives redusert forekomst av AQP5. Det er imidlertid viktig å huske på at også andre faktorer kan bidra til defekten i denne volumreguleringen. Også Teos et al. undersøkte AQP5 ved Sjøgrens syndrom, men fant kun reduksjon i områder med lymfocyttrreduksjon (43). Da er det nærliggende å anta at det er lymfocytinfiltrasjonen med påfølgende betennelse og vevsødeleggelse som har forårsaket redusert nivå av AQP5. Flere studier har sett en sammenheng mellom inflammasjon og endret uttrykk av AQP5 i spyttkjertelceller (55;56). Her kreves det med andre ord mer forskning. Det er også observert autoantistoffer mot AQP5 hos pasienter med pSS, men det kreves ytterligere studier for å undersøke effekten (57;58).

AQP5 er dermed en faktor som nevnes ved både strålingsindusert hyposalivasjon, diabetes og Sjøgrens syndrom. Man kjenner ikke den bakenforliggende mekanismen, og det er sannsynlig at det er flere årsaker til hyposalivasjon enn redusert nivå av AQP5. For at AQP5 skal innta sin plass i den apikale plasmamembranen, er man avhengig av Ca^{2+} -signal via M3R. I studien til Enger ble det funnet at den intracellulære Ca^{2+} -signaleringsmekanismen var forstyrret (25). Tap av M3R kan dermed affisere funksjonen til AQP5.

M3R

M3R i cellene spiller en nøkkelrolle når det gjelder å starte selve Ca^{2+} -signaleringsmekanismen som fører til spyttproduksjon, og det er svært trolig at dets tilstedeværelse er nødvendig. Hos strålingsinduserte rotter var det signifikant redusert mRNA- og proteinuttrykk av M3R sammenliknet med kontroll (42). Andre studier har fokusert på det samme hos diabetesinduserte rotter, og også her var det redusert mRNA-uttrykk av M3R sammenliknet med kontroll (54;59). Det kan spekuleres i om dette er årsaken til redusert antall bindingssteder for muskarinreseptor-antagonisten, slik studien til Watanabe viste (22). Vi har ikke funnet studier som har sett på mRNA-nivået av M3R hos pasienter med Sjøgrens syndrom, men det kan ikke utelukkes at det samme skjer her. En teori bak hyposalivasjon hos disse tre tilstandene baserer seg derfor på at et redusert antall M3R vil føre til redusert aktivering av Ca^{2+} -signaleringsmekanismen. Mekanismene som stimulerer spyttproduksjonen vil dermed fungere som normalt, bare i redusert mengde. Kanskje er alle gjenværende

reseptorer mettet med ACh slik at kroppen ikke har kapasitet til å øke spyttproduksjonen mer. Man mister muligheten til å kontrollere spyttproduksjonen. Det er riktignok ikke funnet noen årsak til det reduserte uttrykket av M3R, men det er likevel et viktig funn.

En annen teori bak hyposalivasjon hos pasienter med Sjøgrens syndrom, diabetes eller som er strålebehandlet for kreft i hode- og halsområdet, er at M3R er dysfunksjonell og ikke responderer som den skal. Pilokarpin binder til M3R og aktiverer reseptoren slik at spyttproduksjonen øker. Den har god effekt på friske mus, men signifikant redusert effekt hos mus eksponert for stråling (38). Det kan skyldes at man har redusert antall M3R tilgjengelig hos strålingsinduserte mus, men kan også skyldes nedsatt sensitivitet for muskarinerge signaler. Dawson et al. viste at man ved Sjøgrens syndrom måtte ha betydelig høyere konsentrasjon av ACh for å kunne frigjøre nok Ca^{2+} til cytosol, for å videre kunne aktivere de Ca^{2+} -avhengige K^+ og Cl^- -kanalene som er viktige for spyttproduksjonen (45). Denne konsentrasjonen av ACh er høyere enn hva kroppen produserer, slik at pasienter med Sjøgrens syndrom ikke får produsert nok saliva. Studien konkluderer med at dette kan skyldes nedsatt sensitivitet til ACh på M3R. Man kan likevel ikke utelukke at det kan skyldes redusert antall reseptorer. Ved Sjøgrens syndrom og hos de som er strålebehandlet i hode- og halsområdet er det dermed studier som viser at M3R ikke responderer som den skal, men årsaken er ikke fullstendig kjent.

Ingen studier har hittil fastslått årsaken til at M3R har nedsatt sensitivitet, og det kan være ødeleggelser, hindringer eller andre signaler som hemmer for normal respons. Det er vist at kroppen danner autoantistoffer mot M3R ved Sjøgrens syndrom, men det er uvisst om det har noen betydning (44). Antistoffene kan binde M3R uten å aktivere kanalen slik at det blir færre ledige plasser for de aktiverende muskarinerge signalene. Dette kan medføre nedsatt spyttproduksjon, men det er ingen andre studier som har undersøkt det samme. Det er heller ikke blitt funnet noen autoantistoff rettet mot M3R hos pasienter med diabetes eller stråling mot hode- og halsområdet. Det er ikke utforsket om det er andre spesifikke signalmolekyler som svekker M3R sin sensitivitet på ACh.

Med dagens kunnskap om M3R kan det se ut til at det er noen fellestrekk som kan føre til hyposalivasjon hos pasienter med diabetes, Sjøgrens syndrom og de som har mottatt stråling mot hode- og halsområdet. Det er vist at det er redusert mRNA-uttrykk ved stråling og diabetes, og at M3R kan ha nedsatt sensitivitet ved stråling og Sjøgrens syndrom. Dette er viktige funn, men ut fra aktuelle studier kan man ikke konkludere med at det er en felles årsak til dette. Man kjenner heller ikke konsekvensene av den nedsatte sensitiviteten, eller om dette alene er årsaken til hyposalivasjon.

IP3R

Teos et al. undersøkte redusert salivasekresjon hos Sjøgrens-pasienter med lavt nivå av lymfocytinfiltrasjon, og fant redusert mengde av IP3R (43). Dette støttes av en studie gjort av Zeng et al., hvor det ble benyttet ikke-overvektige diabetiske mus som utviklet Sjøgrens syndrom (60). De fant at redusert Ca^{2+} frigjøring fra kalsiumlagrene skyldes redusert uttrykk eller funksjon av IP3R i spyttkjertlene, og at redusert Ca^{2+} innstrømming skyldes redusert uttrykk eller funksjon av Orai1. Andre har vist at tap av IP3R hos mus har ført til fullstendig tap av salivasekresjon (61), og tap av tåresekresjon (62). Dette indikerer at IP3R er essensiell for spyttproduksjonen, men årsakene til reduksjon av reseptoren er enda ukjent. Det kan være redusert produksjon og/eller økt degradering. Kaspaser og proteaser kan degradere IP3R, og man kan derfor ikke utelukke at det er en av mekanismene som fører til hyposalivasjon (63).

Ingen studier har sett på det samme knyttet til pasienter som har fått strålebehandling i hode- og halsområdet eller har diabetes, men det er noen interessante funn i forbindelse med diabetes. Dia et al. har brukt mus med høy-fett og sukrose diett for å studere dysregulering av Ca^{2+} i mitokondrier i forbindelse med kardiomyopati hos pasienter med diabetes type 2 (64). Studien fant redusert IP3-stimulert Ca^{2+} overføring til mitokondrier i hjertet, og dette skyldes deformering av reseptorkomplekset. Denne studien har fokusert på én av komplikasjonene man kan få på grunn av diabetes type 2, og ikke på sykdommen som helhet. Likevel er det et viktig funn, og dette kan gi grunnlag for at IP3R burde studeres nøyere i spyttkjertlene til pasienter med diabetes. En annen studie benyttet seg av STZ-rotter for å studere blant annet IP3R i vaskulære glatte muskelceller ved hyperglykemi hos de med diabetes type 1 (65). De konkluderte med at hyperglykemi førte til redusert IP3-indusert frigjøring av Ca^{2+} , og at dette

skyldes redusert uttrykk eller funksjon av IP3R. På samme måte som ved Sjøgrens syndrom (43;60), fant man også redusert mengde IP3R ved diabetes (65). Man kan se en tendens til fellestrekk mellom Sjøgrens syndrom og diabetes, men det er behov for mer forskning for å avdekke om funnene ved diabetes kan overføres til spyttkjertlene. Generelt er det behov for mer forskning for å avdekke om redusert mengde eller funksjon av IP3R er en av hovedårsakene til hyposalivasjon hos pasienter med diabetes, Sjøgrens syndrom eller pasienter som har fått strålebehandling i hode- og halsområdet.

Behandlingsmuligheter basert på funn

Per i dag finnes det ingen spesifikk behandling for hyposalivasjon. Det er trolig flere årsaker til hyposalivasjon, og én behandling vil med liten sannsynlighet hjelpe alle. Økt ROS, aktivering av TRPM2, dysfunksjonelle mitokondrier, økt kaspase-3, autoantistoff mot M3R og AQP5 og redusert AQP5, M3R og IP3R er funn som presenteres ved de ulike tilstandene i denne oppgaven. Det er sannsynlig at behandling basert på disse funnene kan forbedre salivaproduksjonen, og dette er også vist i noen av studiene presentert (38;42). Kanskje man kan tilføre antioksidanter og/eller aktivere kroppens eget antioksidantsystem for å redusere ROS? Er blokkering av TRPM2 før strålebehandling en mulighet? Kan nivået av AQP5, M3R eller IP3R økes med genterapi? Spørsmålene forblir åpne, og vi overlater denne problemstillingen til andre som eventuelt skal forske videre på dette emnet.

Hva må vi forske videre på?

Når signaleringsveien for å produsere spytt er så lang og komplisert som den er, er det rimelig å tenke at alle ulike komponenter kan påvirkes slik man får mindre saliva. Det kreves mer forskning for å avdekke om det er andre signalmolekyl eller patologiske prosesser som påvirkes i større grad enn de som er nevnt.

Alle studiene inkludert i denne oppgaven er utført på celler eller dyr. Flere av cellene er tatt fra mennesker, og dette er mer verdt enn forsøk på cellekulturer. Siden det er mye usikkerhet rundt de molekylære mekanismene, vil det være vanskelig og tidkrevende å utforske alle elementene hos mennesker også. Det er derfor nødvendig med flere eksperimentelle studier på

både celler og dyr for å kunne kartlegge mekanismene så detaljert som mulig før man kan gå videre på humane forsøk. Med dagens litteratur er det manglende evidens for at disse funnene kan overføres direkte til mennesker.

Funnene i denne oppgaven viser at det trolig kan være en sammenheng knyttet til AQP5 eller M3R ved de tre tilstandene, og at disse kanskje lar seg påvirke av ROS. Det trengs likevel mer spesifikk forskning rundt dette teamet for å kunne stadfeste om det er en fellesnevner ved de tre tilstandene, og adskillig mer forskning for å ta denne kunnskapen i bruk i behandling.

Konklusjon

Forskning rundt de molekylære mekanismene bak hyposalivasjon hos pasienter som har diabetes, Sjøgrens syndrom eller er strålebehandlet mot hode- og halsområdet er svært kompleks. Mange av teoriene står sterkere ved en eller to av tilstandene, mens det mangler evidens for det samme ved den siste sykdomstilstanden. Med dagens tilgjengelige litteratur kan man ikke konkludere med at det er én molekylær fellesnevner bak hyposalivasjon ved strålebehandling i hode- og halsområdet, diabetes og Sjøgrens syndrom. Det er indikasjoner for at oksidativt stress, redusert uttrykk av AQP5 og redusert uttrykk og sensitivitet av M3R bidrar til hyposalivasjon. Trolig kan også flere faktorer bidra, og det er usikkert om dysfunksjonelle mitokondrier eller redusert mengde IP3R har betydning. Videre forskning er nødvendig for å kunne konkludere om det er en eller flere molekylære fellesnevner ved de tre tilstandene.

Kilder

1. Ambudkar I. Calcium signaling defects underlying salivary gland dysfunction. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018;1865(11):1771-7.
2. Frivoll Å. Oksidativt stress. 2019. Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/oksidativt_stress
3. Fejerskov O, Kidd EAM, Nyvad B. Dental caries : the disease and its clinical management. 3rd ed. utg. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2015.
4. Helfo. 10 Hyposalivasjon (munntørrhet). 2020. Tønsberg: Helfo. Tilgjengelig fra: <https://www.helfo.no/regelverk-og-takster/overordnet-regelverk/tilstander-som-kan-gi-rett-til-st%C3%B8nad-til-tannbehandling/tilstand-10#referere>
5. Ekornrud T, Skjøstad O, Texmon I. Utgifter til behandling hos tannlege og tannpleier 2014-2016. Statistisk sentralbyrå; 2017. Tilgjengelig fra: <https://www.ssb.no/helse/artikler-og-publikasjoner/attachment/333645?ts=1606dd9bf38>
6. Brodal P. Sentralnervesystemet. 5. utg. utg. Oslo: Universitetsforl.; 2013.
7. Ambudkar IS. Ca²⁺ signaling and regulation of fluid secretion in salivary gland acinar cells. *Cell Calcium.* 2014;55(6):297-305.
8. Liu X, Ong HL, Ambudkar I. TRP Channel Involvement in Salivary Glands-Some Good, Some Bad. *Cells.* 2018;7(7):74.
9. OUS. Hode- og halskreft. 2020. Øre-nese-halsavdelingen [oppdatert 20.09.20]. Tilgjengelig fra: <https://oslo-universitetssykehus.no/behandlinger/hode-og-halskreft>
10. Krefregisteret Statistikkbank [database]. 2020; [hentet 17.08.21]. Tilgjengelig fra: <https://sb.krefregisteret.no/insidens/>
11. Helsedirektoratet. Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging, behandling og oppfølging av hode-/halskreft helsedirektoratet.no: Helsedirektoratet; 2020. Tilgjengelig fra: <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/hode-hals-kreft-handlingsprogram/Nasjonalt%20handlingsprogram%20med%20retningslinjer%20for%20diagnostikk,%20behandling%20og%20oppf%C3%B8lging%20av%20hode-halskreft.pdf/attachment/inline/c0da55c4-473c-4e86-a626-d43e5ba906bc:f355c954824eaaee5b1cf8a476655ab8bed61ac9/Nasjonalt%20handlingsprogram%20med%20retningslinjer%20for%20diagnostikk,%20behandling%20og%20oppf%C3%B8lging%20av%20hode-halskreft.pdf>
12. Stephens LC, Schultheiss TE, Small SM, Ang KK, Peters LJ. Response of Parotid Gland Organ Culture to Radiation. *Radiat Res.* 1989;120(1):140-53.
13. Coppes RP, Meter A, Latumalea SP, Roffel AF, Kampinga HH. Defects in muscarinic receptor-coupled signal transduction in isolated parotid gland cells after in vivo irradiation: evidence for a non-DNA target of radiation. *Br J Cancer.* 2005;92(3):539-46.
14. Zou Z, Chang H, Li H, Wang S. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis.* 2017;22(11):1321-35.
15. Malko P, Jiang L-H. TRPM2 channel-mediated cell death: An important mechanism linking oxidative stress-inducing pathological factors to associated pathological conditions. *Redox Biol.* 2020;37:101755.
16. Åsvold BO. Diabetes. 2021. Store medisinske leksikon Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/diabetes>

17. Helsebiblioteket. Diabetes type 2: Hva er det? 2021. Tilgjengelig fra: <https://www.helsebiblioteket.no/pasientinformasjon/alle-brosjyrer/diabetes-type-2-hva-er-det>
18. Stene LC, Ruiz PL-D, Åsvold BO, Bjarkø VV, Sørgerd EP, Njølstad I, et al. Hvor mange har diabetes i Norge i 2020? 2020. Tidsskriftet for Den norske legeforening. Tilgjengelig fra: <https://tidsskriftet.no/2020/11/kronikk/hvor-mange-har-diabetes-i-norge-i-2020>
19. Diabetesforbundet. Symptomer 2021. Diabetes.no Tilgjengelig fra: <https://www.diabetes.no/hva-er-diabetes/symptomer/>
20. Cui F, Hu M, Li R, Li B, Huang D, Ma W, et al. Insulin on changes in expressions of aquaporin-1, aquaporin-5, and aquaporin-8 in submandibular salivary glands of rats with Streptozotocin-induced diabetes. *Int J Clin Exp Pathol.* 2021;14(2):221-9.
21. Xiang RL, Huang Y, Zhang Y, Cong X, Zhang ZJ, Wu LL, et al. Type 2 diabetes-induced hyposalivation of the submandibular gland through PINK1/Parkin-mediated mitophagy. *J Cell Physiol.* 2020;235(1):232-44. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31190343>
22. Watanabe M, Yamagishi-Wang H, Kawaguchi M. Lowered Susceptibility of Muscarinic Receptor Involved in Salivary Secretion of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *JpnJPharmacol.* 2001;87(2):117-24.
23. Palm Ø. Sjøgrens syndrom 2019. Store medisinske leksikon [hentet 03.11 2021]. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/Sj%C3%B8grens_syndrom
24. NEL. Sjøgrens syndrom. 2020. [hentet 03.11 2021]. Tilgjengelig fra: <https://legehandboka-no.ezproxy.uio.no/handboken/kliniske-kapitler/revmatologi/tilstander-og-sykdommer/systemiske-inflammasjoner/sjogrens-syndrom#diagnosen-sykehistorie>
25. Enger TB, Aure MH, Jensen JL, Galtung HK. Calcium signaling and cell volume regulation are altered in Sjögren's Syndrome. *Acta Odontol Scand.* 2014;72(7):549-56.
26. Gøransson LG, Haldorsen K, Brun JG, Harboe E, Jonsson MV, Skarstein K, et al. The point prevalence of clinically relevant primary Sjögren's syndrome in two Norwegian counties. *Scand J Rheumatol.* 2011;40(3):221-4.
27. Qin B, Wang J, Yang Z, Yang M, Ma N, Huang F, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(11):1983-9.
28. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(6):554-8.
29. NHI. Sjøgrens syndrom. 2020. [hentet 03.11 2021]. Tilgjengelig fra: <https://nhi.no/sykdommer/muskelskjelett/gikt/sykdommer/sjogrens-syndrom/?page=2>
30. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjögren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. Malden, MA :2017. s. 35-45.
31. Oslo universitetssykehus. Sjøgrens syndrom 2019. Helsenorge; [hentet 03.11 2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.helsenorge.no/sykdom/muskel-og-skjelett/sjogren-syndrom/>
32. Shen L, Suresh L, Malyavantham K, Kowal P, Xuan J, Lindemann MJ, et al. Different stages of primary Sjogren's syndrome involving lymphotoxin and type 1 IFN. *J Immunol.* 2013;191(2):608-13.

33. Xuan J, Shen L, Malyavantham K, Pankewycz O, Ambrus JLL, Suresh L. Temporal histological changes in lacrimal and major salivary glands in mouse models of Sjogren's syndrome. *BMC Oral Health*. 2013;13(1):51-.
34. Smallwood MJ, Nissim A, Knight AR, Whiteman M, Haigh R, Winyard PG. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic Biol Med*. 2018;125:3-14.
35. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, De Bittencourt PIH. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J*. 2016;473(24):4527-50.
36. Liu Z, Dong L, Zheng Z, Liu S, Gong S, Meng L, et al. Mechanism, Prevention, and Treatment of Radiation-Induced Salivary Gland Injury Related to Oxidative Stress. *Antioxidants*. 2021;10(11):1666.
37. Liu X, Gong B, De Souza LB, Ong HL, Subedi KP, Cheng KT, et al. Radiation inhibits salivary gland function by promoting STIM1 cleavage by caspase-3 and loss of SOCE through a TRPM2-dependent pathway. *Sci Signal*. 2017;10(482):eaal4064.
38. Ren J, Huang R, Li Y, Chen R, Tian H, Liu C. Radioprotective effects and mechanism of HL-003 on radiation-induced salivary gland damage in mice. *Sci Rep*. 2022;12(1):8419-.
39. D'Agostino C, Elkashty OA, Chivasso C, Perret J, Tran SD, Delporte C. Insight into Salivary Gland Aquaporins. *Cells*. 2020;9(6):1547.
40. Ambudkar IS. Calcium signalling in salivary gland physiology and dysfunction. *J Physiol*. 2016;594(11):2813-24.
41. Soyfoo MS, Chivasso C, Perret J, Delporte C. Involvement of Aquaporins in the Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Sjögren's Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3392.
42. Wu YH, Yao QT, Liu SH, Song XB, Yakupu APZGL, Lu LD, et al. Effect of ischemic preconditioning on radiation damage to the submandibular gland in rats. *Eur J Oral Sci*. 2021;129(3):e12785-n/a.
43. Teos LY, Zhang Y, Cotrim AP, Swaim W, Won JH, Ambrus J, et al. IP3R deficit underlies loss of salivary fluid secretion in Sjögren's Syndrome. *Sci Rep*. 2015;5(1):13953-.
44. Passafaro D, Reina S, Sterin-Borda L, Borda E. Cholinergic autoantibodies from primary Sjogren's syndrome modulate submandibular gland Na⁺/K⁺-ATPase activity via prostaglandin E-2 and cyclic AMP. *European journal of oral sciences*. 2010;118(2):131-8.
45. Dawson LJ, Field EA, Harmer AR, Smith PM. Acetylcholine-evoked calcium mobilization and ion channel activation in human labial gland acinar cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2001;124(3):480-5.
46. Abuarab N, Munsey TS, Jiang L-H, Li J, Sivaprasadarao A. High glucose-induced ROS activates TRPM2 to trigger lysosomal membrane permeabilization and Zn²⁺-mediated mitochondrial fission. *Science signaling*. 2017;10(490):eaal4161.
47. Bhattarai KR, Junjappa R, Handigund M, Kim H-R, Chae H-J. The imprint of salivary secretion in autoimmune disorders and related pathological conditions. *Autoimmunity reviews*. 2018;17(4):376-90.
48. Khalafalla MG, Woods LT, Camden JM, Khan AA, Limesand KH, Petris MJ, et al. P2X7 receptor antagonism prevents IL-1 β release from salivary epithelial cells and reduces inflammation in a mouse model of autoimmune exocrinopathy. *J Biol Chem*. 2017;292(40):16626-37.

49. Barrera M-J, Aguilera S, Castro I, Carvajal P, Jara D, Molina C, et al. Dysfunctional mitochondria as critical players in the inflammation of autoimmune diseases: Potential role in Sjögren's syndrome. *Autoimmunity reviews*. 2021;20(8):102867.
50. Biswas R, Ahn JC, Moon JH, Kim J, Choi Y-H, Park SY, et al. Low-level laser therapy with 850 nm recovers salivary function via membrane redistribution of aquaporin 5 by reducing intracellular Ca²⁺ overload and ER stress during hyperglycemia. *Biochimica et biophysica acta General subjects*. 2018;1862(8):1770-80.
51. Wang D, Yuan Z, Inoue N, Cho G, Shono M, Ishikawa Y. Abnormal subcellular localization of AQP5 and downregulated AQP5 protein in parotid glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimica et biophysica acta General subjects*. 2011;1810(5):543-54.
52. Bhattarai KR, Lee H-Y, Kim S-H, Kim H-R, Chae H-J. *Ilex dentata* Extract Increases Salivary Secretion through the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress in a Diabetes-Induced Xerostomia Rat Model. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):1059.
53. Soyfoo MS, Bolaky N, Depoortere I, Delporte C. Relationship between aquaporin-5 expression and saliva flow in streptozotocin-induced diabetic mice? *Oral Dis*. 2012;18(5):501-5.
54. Chen S-Y, Wang Y, Zhang C-L, Yang Z-M. Decreased basal and stimulated salivary parameters by histopathological lesions and secretory dysfunction of parotid and submandibular glands in rats with type 2 diabetes. *Exp Ther Med*. 2020;19(4):2707-19.
55. Soyfoo MS, Konno A, Bolaky N, Oak JS, Fruman D, Nicaise C, et al. Link between inflammation and aquaporin-5 distribution in submandibular gland in sjögren's syndrome? *Oral Dis*. 2012;18(6):568-74.
56. Soyfoo MS, De Vriese C, Debaix H, Martin-Martinez MD, Mathieu C, Devuyst O, et al. Modified aquaporin 5 expression and distribution in submandibular glands from NOD mice displaying autoimmune exocrinopathy. *Arthritis Rheum*. 2007;56(8):2566-74.
57. Alam J, Koh JH, Kim N, Kwok S-K, Park S-H, Song YW, et al. Detection of autoantibodies against aquaporin-5 in the sera of patients with primary Sjögren's syndrome. *Immunol Res*. 2016;64(4):848-56.
58. Jeon S, Lee J, Park S-H, Kim H-D, Choi Y. Associations of Anti-Aquaporin 5 Autoantibodies with Serologic and Histopathological Features of Sjögren's Syndrome. *J Clin Med*. 2019;8(11):1863.
59. Sato T, Mito K, Ishii H. Relationship between impaired parasympathetic vasodilation and hyposalivation in parotid glands associated with type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2020;318(5):R940-R9.
60. Zeng M, Szymczak M, Ahuja M, Zheng C, Yin H, Swaim W, et al. Correction of Ductal CFTR Activity Rescues Acinar Cell and Pancreatic and Salivary Gland Functions in Mouse Models of Autoimmune Disease. *Gastroenterology (New York, NY 1943)*. 2017;153(4):1148-59.
61. Futatsugi A, Nakamura T, Mikoshiba K, Yamada MK, Ebisui E, Nakamura K, et al. IP₃ receptor types 2 and 3 mediate exocrine secretion underlying energy metabolism. *Science*. 2005;309(5744):2232-4.
62. Inaba T, Hisatsune C, Sasaki Y, Ogawa Y, Ebisui E, Ogawa N, et al. Mice lacking inositol 1,4,5-trisphosphate receptors exhibit dry eye. *PLoS One*. 2014;9(6):e99205-e.
63. Mikoshiba K. Role of IP₃ receptor signaling in cell functions and diseases. *Adv Biol Regul*. 2015;57:217-27.

64. Dia M, Gomez L, Thibault H, Tessier N, Leon C, Chouabe C, et al. Reduced reticulum–mitochondria Ca²⁺ transfer is an early and reversible trigger of mitochondrial dysfunctions in diabetic cardiomyopathy. *Basic research in cardiology*. 2020;115(6):74-.
65. Searls YM, Loganathan R, Smirnova IV, Stehno-Bittel L. Intracellular Ca²⁺ regulating proteins in vascular smooth muscle cells are altered with type 1 diabetes due to the direct effects of hyperglycemia. *Cardiovasc Diabetol*. 2010;9(1):8-.