

*TAM-reseptoruttrykk i labiale spyttkjertler hos  
pasienter med primært Sjögrens syndrom*

*Hovedvekt på makrofager og dendrittiske celler*

Masteroppgave i farmasi

Alireza Molai



Senter for farmasi og

Broegelmanns Forskningslaboratorium

Klinisk institutt 2

Universitet i Bergen

Mai 2023

# INNHOLDSFORTEGNELSE

<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>3</b>
<b>FORORD</b> .....	<b>4</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>5</b>
<b>1. INTRODUKSJON</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 SJÖGRENS SYNDROM</b> .....	<b>7</b>
<i>1.1.1 Etiopatogenese</i> .....	<i>8</i>
<i>1.1.2 Kliniske manifestasjoner</i> .....	<i>12</i>
<i>1.1.3 Klassifiseringskriterier</i> .....	<i>13</i>
<i>1.1.4 Behandling</i> .....	<i>15</i>
<b>1.2 HISTOPATOLOGI I PSJS</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3 TAM-RESEPTORER</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4 UTVALGTE IMMUNCELLER</b> .....	<b>22</b>
<b>2. MÅL FOR STUDIEN</b> .....	<b>23</b>
<b>3. MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 STUDIEPOPULASJON</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2 IMMUNHISTOKJEMI</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3 HAMAMATSU NANOZOOMER-XR</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4 QUPATH</b> .....	<b>29</b>
<i>3.4.1 Optimaliseringsprosess for farger</i> .....	<i>29</i>
<i>3.4.2 Positiv celledeteksjon</i> .....	<i>33</i>
<i>3.4.3 Celleklassifisering</i> .....	<i>38</i>
<b>3.5 DATAANALYSE</b> .....	<b>40</b>

<b>4. RESULTATER.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 IMMUNCCELLER I PASIENTER OG SICCA KONTROLLER.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 TAM-RESEPTORER I PASIENTER OG KONTROLLER.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 IMMUNCCELLER SOM UTTRYKKER TAM-RESEPTORER.....</b>	<b>49</b>
<b>5. DISKUSJON.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1 ANALYSE AV UTTRYKKNIVÅENE AV TAM-RESEPTORER.....</b>	<b>53</b>
<b>5.2 STUDIENS BEGRENSNINGER.....</b>	<b>58</b>
<b>6. KONKLUSJON.....</b>	<b>62</b>
<b>7. REFERANSER.....</b>	<b>63</b>

## SAMMENDRAG

**Hensikt:** Studien sammenlignet TAM-reseptoruttrykk i labiale spyttkjertler mellom pasienter med primært Sjögrens syndrom og kontroller med sicca symptomer for å identifisere potensiell svekkelse av apoptotisk cellefjerning hos pasienter med primært Sjögrens syndrom.

**Metode:** I denne studien ble immunhistokjemi brukt til å evaluere uttrykket av TAM-reseptorer og deres ligand Gas6 i spyttkjertelvev hos både pasienter og kontroller. Antistoffer ble anvendt for å identifisere spesifikke immunceller. I tillegg ble Hamamatsu Nanozoomer-XR benyttet for å ta høyoppløselige bilder av vevsseksjonene, og QuPath ble brukt for å kvantifisere uttrykket av TAM-reseptorer og Gas6 i immuncellene.

**Resultater:** Det ble påvist en signifikant høyere frekvens av makrofager (CD68+ celler) og dendritiske celler (identifisert ved hjelp av CD11c og CD370) i spyttkjertlene til pSjS-pasienter sammenlignet med sicca-kontroller. Det ble også observert betydelige forskjeller i frekvensen av TAM-reseptorer og Gas6 mellom disse analysegruppene. Dendritiske celler uttrykte Axl og Tyro3, mens makrofager ikke gjorde det. Generelt ble de høyeste uttrykksnivåene påvist for Tyro3, etterfulgt Gas6 som hadde lignende uttrykksnivåer, mens det laveste uttrykksnivået ble sett for Mer. Selv om uttrykket av Axl ikke var statistisk signifikant, ble det observert et høyere uttrykk av Axl hos pSjS-pasienter enn sicca-kontroller. Analysen avdekket også en betydelig variasjon i den positive prosentandelen av immunceller og TAM-reseptorer innen hver analysegruppe.

**Konklusjon:** Studien viste høyere uttrykk av TAM-reseptorer i labiale spyttkjertler hos pasienter med primært Sjögrens syndrom sammenlignet med sicca-kontroller. Dette kan antyde at det antageligvis ikke foreligger et problem i opprydding av apoptotiske celler i spyttkjertlene hos pSjS-pasienter. Makrofager viste ikke uttrykk av Tyro3 og Axl, mens DC uttrykte begge reseptorene. Videre forskning er nødvendig for å forstå TAM-reseptor funksjonen bedre, aktiviteten og dens potensielle rolle i spyttkjertler hos pasienter med pSjS. Enkeltfarging av vevsseksjoner kan begrense påliteligheten av identifiseringen av signaler i påfølgende seksjoner, og ytterligere metoder og teknikker er nødvendig for å validere og bekrefte funnene.

## FORORD

Først og fremst ønsker jeg å uttrykke min dype takknemlighet overfor mine veiledere **Silke Appel, Hanne Borge** og **Brith Bergum** for deres uforbeholdne støtte og veiledning gjennom hele min masteroppgave. **Silke**, takk for din dedikasjon til mitt arbeid, som tydelig kom til uttrykk gjennom din tilgjengelighet til enhver tid og din evne til å utfordre meg til å yte mitt beste. **Hanne**, takk for din villighet til å hjelpe meg når jeg trengte det. Selv om jeg var din første student å veilede, følte det aldri slik, da du bestitter ekspertise som fikk meg til å føle meg trygg og ivaretatt. **Brith**, takk for at du var med i oppstarten min ved Broegelmanns Forskningslaboratorium før du gikk ut i mammafermisjon.

En spesiell takk rettes også til **Kathrine Skarstein** og **Tamandeep Kaur Bharaj** for å ha bidratt med pasientmaterialet som var essensielt for gjennomføringen av min masteroppgave.

Jeg er takknemlig overfor **Irene Sarkar**, som tidligere har arbeidet med et lignende emne. Jeg benyttet hennes data for å sammenligne og validere mine funn, og hennes innsikt var uvurderlig for meg.

Jeg vil rette en stor takk til **Kjerstin Jakobsen**, som tok ansvar for en betydelig del av de praktiske aspektene ved oppgaven. **Marianne**, takk for din hjelp med ulike oppgaver og alltid med et stort smil.

Takk til alle ved **Broegelmanns Forskningslaboratorium** for deres assistanse og støtte i løpet av dette året. Takk til **Senter for farmasi (UiB)** for deres økonomiske støtte som gjorde dette prosjektet mulig.

Til mine farmasistudenter vil jeg si takk for fem fantastiske og minnerike år. **Michael, Suzette** og **Redate** deres engasjement i laboratoriet og ærlige samtaler har vært svært verdsatt.

Til slutt vil jeg sende en hjertelig takk til min familie som alltid har oppmuntret og støttet meg i løpet av disse fem årene. Takk for at dere alltid har fått meg til å tro på meg selv.

Og så sist, men ikke minst, inspirert av Snoop Dogg, vil jeg si: «I Wanna Thank Me, for believing in me». Så takk, **meg**, for å ha vært en trofast partner i denne ville farmasiverdenen og for å alltid ha ryggen min. Du er en ekte legende!

## **FORKORTELSER**

ACR	American College of Rheumatology
AECG	American-European Consensus Group
ANA	Antinukleære antistoffer
APC	Antigenpresenterende celler
cDC1	Konvensjonelle dendritiske celler type 1
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dendritiske celler
EGM	Ekstraglandulære manifestasjon(er)
ESSDAI	EULAR Sjögrens syndrom sykdomsaktivitetsindeks
ESSPRI	EULAR Sjögrens syndrom pasientrapportert indeks
EULAR	European Alliance of Associations for Rheumatology
FFPE	Formalinfiksert parafinnstøpt (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded)
FS	Fokus score
Gas6	Vekststopp-spesifikt 6 (Growth arrest-specific 6)
GC	Germinalsenter (Germinal center)
HLA	Humane leukocyt-antigener
HRP	Pepperrotperoksidase (Horseradish peroxidase)
IF	Immunfluorescens
IFN	Interferon
IHC	Immunhistokjemi (Immunohistochemistry)
IL	Interleukin
MHC	Vevsforlikelighetsantigenkompleks (Major histocompatibility complex)
Min	Minutt(er)
PBMC	Perifere mononukleære celler fra blod (Peripheral blood mononuclear cell)
pDC	Plasmacytoide dendritiske celler
ProS	Protein S
pSjS	Primært Sjögrens syndrom
RA	Revmatoid artritt
RF	Revmatoid faktor
ROI	Region av interesse
RT	Romtemperatur
RTK	Reseptortyrosinkinaser

SLE	Systemisk lupus erythematosus
SjS	Sjögrens syndrom
SSA	Sjögrens syndrom antigen A
SSB	Sjögrens syndrom antigen B
Tfh	Follikulære T-hjelpeceller
Th17	T-hjelpeceller 17
TLR	Toll-lignende-reseptor

# 1. INTRODUKSJON

## 1.1 SJÖGRENS SYNDROM

Sjögrens syndrom (SjS) er en kronisk, inflammatorisk og revmatisk autoimmun sykdom som hovedsakelig rammer eksokrine kjertellev som spytt- og tårekjertler. Vedvarende og progressive fokale mononukleære celleinfiltrater er et av de viktigste histopatologiske kjennetegnene på sykdommen. Dette er noe som kan forårsake tørrhet i munn (xerostomia) og øyne (keratoconjunctivitis sicca) (1). Dessuten kan en rekke systemiske manifestasjoner forekomme, som kan involvere nesten ethvert organsystem. Dette gjør at sykdommen er preget av pleomorfe kliniske manifestasjoner som fører til at fenotype og alvorlighetsgraden kan i stor grad variere fra en pasient til en annen. SjS kan defineres som primært Sjögrens syndrom (pSjS) eller sekundær Sjögrens syndrom (sSjS), avhengig av om det oppstår alene eller i forbindelse med andre systemiske autoimmune og revmatiske sykdommer. Disse inkluderer revmatoid artritt (RA) hos 20 – 30 % av pasientene, systemisk lupus erythematosus (SLE) hos 15 – 36 % av pasientene, eller begrenset og diffus systemisk sklerose hos 11 – 24 % av pasientene (2).

Studier av kjertellev i små spyttkjertler, kliniske symptomer og laboratorietester har avslørt en sykdomsheterogenitet hos pasienter med pSjS, noe som viser ulike nivåer av kjertelatrofi og erstatning av andre celler med fettvev. For å beskrive antall fokale infiltrater kan fokus score (FS) bidra til å kategorisere pasienter ytterligere, når det gjelder alvorlighetsgraden av de fokale infiltratene. Fokus defineres som en avgrenset tett ansamling av minst 50 mononukleære inflammasjonsceller i spyttkjertelvevet. FS defineres som antall foci per 4 mm<sup>2</sup> kjertellev (3). Høyere FS-verdi har vært korrelert med alvorlig sykdom og assosiert med forekomsten av fokale infiltrater som ligner på germinalsenter (GC) strukturene i sekundære lymfoide organer med en lys og mørk sone (3, 4). Slike infiltrater kalles GC-lignende strukturer, pga. sine ektopiske lokasjon i spyttkjertlene, og de er rapportert hos 25 – 30 % av pasientene med pSjS (5, 6). Forekomst av GC-lignende strukturer i diagnostiske labiale spyttkjertelbiopsier er ofte assosiert med produksjon av immunoglobuliner og avvikende autoantistoffer (7), samt en økt risiko for utvikling av lymfom (5, 8). De vanligste autoantistoffene retter seg mot autoantigenene Sjögrens syndrom antigen A (Ro/SSA) og Sjögrens syndrom antigen B (La/SSB). Autoantistoffer spiller en sentral rolle i pSjS og kan være involvert i dets patogenese (9). Opptil 70 % av pasientene er positive for anti-Ro/SSA, og opptil 40 % er positive for anti-La/SSB (10). Med hensyn til klinisk praksis, spiller påvisning av disse autoantistoffene i serum en avgjørende rolle i diagnostisering og klassifisering av pSjS (11).

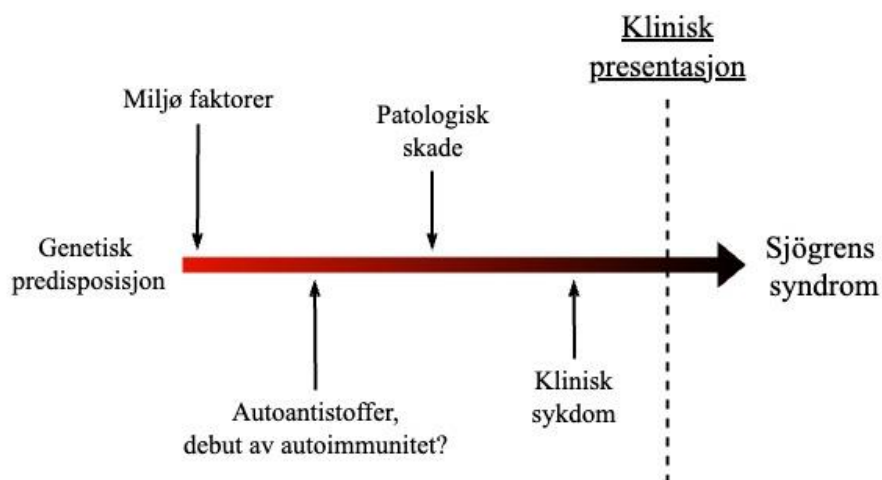


Etiologien og mange aspekter ved patogenesen til pSjS er fortsatt ikke klarlagt, og det finnes ingen enkel diagnostisk test. pSjS er en kronisk, livslang tilstand og det er for øyeblikket ingen kjent kur. Behandlinger er derfor vanligvis rettet mot å lindre symptomer og forbedre livskvaliteten til pasienter (1). Adskillige epidemiologiske studier om pSjS har dokumentert betydelig variasjon i forekomsten av sykdommen på verdensbasis, men det antas likevel en forekomst på omtrent 0,1 – 3 % i den generelle befolkningen (12-15). En markant kjønnsforskjell viser seg å eksistere i forekomsten av pSjS, da kvinner rammes hyppigere enn menn med et forholdstall på 9:1. Tilstanden kan inntreffe hos pasienter i alle aldersgrupper, men har en tendens til å manifestere seg primært i det fjerde til sjette tiår av livet (1, 16). For å få et dypere innblikk i den globale epidemiologien til pSjS, kreves det ytterligere befolkningsbaserte studier som inkluderer en større befolkningsgruppe.

### **1.1.1 ETIOPATOGENESE**

Manglende reaktivitet i immunsystemet mot et antigen etter gjentatt eksponering blir betegnet som «toleranse», mens fravær av respons mot selv-antigener omtales som «selv-toleranse» (17). Denne mekanismen sikrer eliminering av selv-reaktive lymfocytter som potensielt kan utgjøre en trussel for verten. Pga. den stokastiske genereringsprosessen til B- og T-cellereseptorer, kan enkelte lymfocytter med selv-reaktive reseptorer produseres, og disse krever eliminering (17). Sentrale og perifere mekanismer for B- og T-celle toleranse virker sammen for å forhindre utviklingen av autoreaktive B- og T-celler. Svikt i selv-toleransen kan føre til autoimmunitet og inflammatoriske reaksjoner (17). Denne sammenhengen mellom toleranse, eliminering av selv-reaktive lymfocytter og beskyttelse mot autoreaktive celler er avgjørende for å opprettholde immunsystemets normale funksjon (17).

Autoimmune sykdommer er ofte preget av en kompleks og heterogen patofysiologi. Kliniske manifestasjoner oppdages vanligvis etter utvikling av en antatt autoimmun respons over tid, og det kan gå flere år før symptomer oppstår. Etiologien og patogenesen av mange autoimmune sykdommer, inkludert pSjS, er ikke fullt ut forstått. Forskning har indikert at både genetiske- og miljøfaktorer spiller en rolle i patogenesen av SjS og bidrar til sykdomsutviklingen (1, 18). Figur 1 illustrerer den antatte etiologien av sykdommen.



**Figur 1.** Et forenklet syn på sannsynlige etiopatogene hendelser før diagnosen Sjögrens syndrom. Figur og tekst er adaptert fra Jonsson, 2022 (9). Gjengitt med tillatelse fra John Wiley and Sons.

Genetiske assosiasjonsstudier har vist at genetiske faktorer spiller en vesentlig rolle i etiopatogenesisen av pSjS. Den fremste genetiske predisposisjonen for pSjS er knyttet til humant leukocyt-antigen (HLA) klasse II-gener, hvor HLA-DR og HLA-DQ alleler dominerer, men uttrykket av disse genene varierer avhengig av serologisk status og etnisitet (19, 20). CD4+ T-celler binder seg til peptider som presenteres av HLA klasse II-molekyler på overflaten av antigenpresenterende celler (APC) og epitelceller. En betydningsfull egenskap ved pSjS-pasienter er uttrykket av HLA klasse II-antigener på epitelceller, som vanligvis ikke finnes hos friske individer (19). I en nylig publisert artikkel i tidsskriftet *Nature Reviews Rheumatology* (21) gir de en grundig gjennomgang av genetiske og epigenetiske faktorer som kan spille en rolle i patogenesisen av pSjS. Dette inkluderer gener som er involvert i immunsystemet og regulering av betennelse (21).

Miljøfaktorer spiller også en rolle i patogenesisen, spesielt virusinfeksjoner har vært diskutert for å utløse autoimmune reaksjoner. Virus som Hepatitt C, Epstein-Bar-virus og Human T-cellelymfotropt virus type-I har vært implisert i utvikling av pSjS, særlig hos pasienter med anti-Ro/SSA og anti-La/SSB (22, 23). Bakterier har også blitt foreslått å være involvert i patogenesisen av pSjS, f.eks. kronisk bakteriell infeksjon fra *Helicobacter pylori* (24). Hos genetisk disponerte individer kan en initial virusinfeksjon i spyttkjertlene forstyrre kjertelepitelceller, og dette kan føre til en forsterket produksjon av interferon (IFN), spesielt IFN- $\alpha$ , av plasmacytoide dendrittiske celler (pDC) (22). Som et resultat av den forsterkede IFN-produksjonen og forstyrrelsen av kjertelepitelceller, dannes det et inflammatorisk mikromiljø.

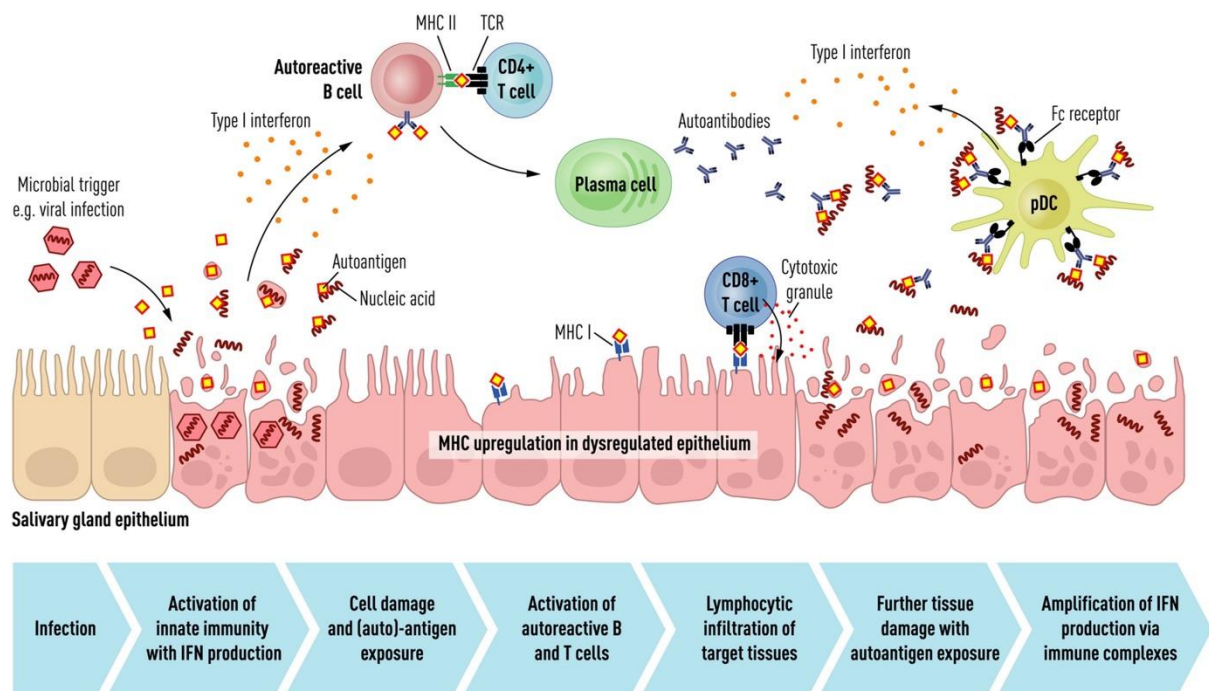
I dette mikromiljøet blir SSA- og SSB-autoantigener eksponert på de døende cellene (22). Disse autoantigenene er små ribonukleoproteinpartikler som normalt er lokalisert inne i cellene (25). Når de antigenene blir eksponert i døende celler, blir de gjenkjent av immunsystemet som potensielle mål for immunrespons. Når APC behandler og presenterer de selvantigenene sammen med virale antigener, kan det føre til aktivering av autoreaktive T- og B-celler, og påfølgende aktivering av plasmaceller til å produsere autoantistoffer (22). Autoreaktive T-celler kan skille ut cytotoksiske granuler som kan forsterke vevsskade. Dette kan føre til ytterligere forstyrrelse av epitelet og forsterke eksponeringen av autoantigener (22). Autoantistoffene som produseres kan danne immunkomplekser med deres beslektede autoantigener og binde seg til pDC via Fc-reseptorene for IgG, noe som fører til en forsterket produksjon av type I IFN (22). Type I IFN, som er produsert som respons på autoimmune stimuli, kan igjen fremme differensiering og aktivering av autoreaktive B-celler og bidra til produksjonen av autoantistoffer (22).

Det er rapportert om en mulig potensiell sammenheng mellom flere infeksjoner og utvikling av seropositive pSjS-pasienter (26), men det er fortsatt uklart om det er en direkte sammenheng mellom infeksjoner og autoantistoffproduksjon. En utfordring med å undersøke denne sammenhengen er at blodprøver vanligvis tas etter at infeksjonen allerede har oppstått, noe som begrenser muligheten for å fastslå kausale forhold (26).

Dysfunksjon i spyttkjertlene ved pSjS kan også skyldes en rekke immunologiske faktorer, inkludert produksjon av cytokiner og oppreguleringer av adhesjonsmolekyler på epitelcellene. Dette resulterer i tiltrekning og opphold av lymfocytter og dendritiske celler i spyttkjertlene. Stimulering av pDC via type I IFN-systemet blir påvist i spyttkjertelvevet hos pSjS-pasienter, og økt frigjøring av IFN- $\alpha$  bidrar til videre retensjon av lymfocytter i vevet (27).

En av de foreslåtte mekanismene bak pSjS er autoimmun epitelitt, som referer til en feilaktig immunrespons mot epitelceller i spyttkjertlene (28). Nylig forskning har vist at epitelceller i eksokrine kjertler og slimhinner kan etterligne rollen til ikke-profesjonelle antigenpresenterende celler, som kan presentere uvanlige autoantigener for autoreaktive T-celler (28-30). Denne mekanismen indikerer at epitelcellene spiller en viktig rolle i patogenesen av SjS, både som mål for den dysfunksjonelle immunresponsen og som promotør for immunsystemets dysregulering. Sammenhengen mellom medfødte immunresponser og aktivering av adaptive immunceller kan også forklares ved denne hypotesen (31).

Denne hypotesen er i samsvar med infeksjonshypotesen, som begge forklarer mulige mekanismer bak patogenesen av pSjS, med fokus på en dysfunksjonell immunrespons og aktivering av autoreaktive celler. På denne måten kan det være en mulig sammenheng mellom de to hypotesene, hvor en feilaktig immunrespons mot epitelceller kan føre til produksjon av autoantistoffer, muligens etter aktivering av autoreaktive celler som følge av mikrobielle antigener. Fortsettelsen av forskningen på den potensielle sammenhengen vil kunne gi viktig innsikt i utviklingen og behandlingen av Sjögrens syndrom. Den foreslåtte sykdomsmodellen for SjS er vist i Figur 2.



**Figur 2. Sykdomsmodell for primært Sjögrens syndrom.** Mikrobielle triggere, som virusinfeksjoner, initierer forstyrrelse av spyttkjertelepitelet og induserer produksjon av type I IFN, og skaper dermed et inflammatorisk mikromiljø med autoantigener frigjort og eksponert på døende celler. Antigenpresenterende celler behandler og presenterer deretter virale og selvantigener, noe som fører til aktivering av autoreaktive T- og B-celler og påfølgende differensiering og aktivering av autoantistoffproduserende plasmaceller. Autoreaktive T-celler induserer vevsskade via sekresjon av cytotoksiske granuler, og forstyrrer dermed epitelet ytterligere og forårsaker forsterket eksponering av autoantigener. Immunkomplekser dannet mellom autoantistoffer og autoantigener binder reseptorer på pDC, noe som resulterer i økt type I IFN-produksjon. I sin tur driver type I IFN autoantistoffproduksjon gjennom å fremme differensiering og aktivering av de autoreaktive B-cellene. Gjennom denne prosessen skapes en selvopprettende syklus av autoimmunitet. IFN, interferon; pDC, plasmacytoide dendrittiske celler; MHC, vevsforlikelighetsantigenkompleks; TCR, T-cellerreseptor. Figur og tekst adaptert fra Björk *et al.*, 2020 (22). Gjengitt med tillatelse fra John Wiley and Sons.

### 1.1.2 KLINISKE MANIFESTASJONER

Det kliniske glandulære manifestasjoner er dominert av tørrhetsfenomener i munn og øyne, som er kjent som keratokonjunktivitt sicca og xerostomi. Disse er forårsaket av ødeleggelse av betent vev og atrofi i spyttkjertler og kjertler i øynene (32). Annet enn det åpenbare ubehaget munntørrhet medfører, kan dette øke risikoen for flere tilstander, inkludert tannkaries, oral candidainfeksjon, angular chelitis, heshet i stemmen, samt hovne spyttkjertler (33, 34). Øyetørrhet skaper en ond sirkel med en kronisk og økende lokal inflammasjon i og rundt øyet. Inflammasjonen vil ofte påvirke meibomske kjertler i øvre og nedre øyelokk som er ansvarlig for produksjon av lipider (35). Nedsatt produksjon av tårevæske via tårekjertler og lipider fra meibomske kjertler forårsaker tørrhet, kløe, rødhet, brennende følelse og varierende synsskarphet. Komplikasjonen ved å ha tørre øyne kan øke risiko for hornhinnesår eller infeksjoner som blefaritt (35, 36).

Det er en stor variasjon i utvikling av ekstraglandulære manifestasjoner (EGM) hos pSjS-pasienter, med opptil 70 % som utvikler flere av disse manifestasjonene, enten før eller etter pSjS-diagnosen (37). De vanligste og svekkende systemiske symptomer er fatigue, artralgi og myalgi. Gastrointestinale manifestasjoner observeres ofte hos pSjS-pasienter og årsaken er redusert mengde væske med enzymer fra gastrointestinale kjertler, bl.a. pankreas. Manifestasjoner ses også i lunger, nyrer, hud og nerver (16). Hos ca. 5 % av pasienter med pSjS foreligger nyresykdom (38). Tubulointerstitiell nefritt og glomerulonefritt er to av de hyppigste nyresykdommene, men det finnes et mangfoldig spekter av kliniske manifestasjoner (38). Hud manifestasjoner er også vanlig hos ca. 50 % av pasienter, særlig tørr hud (xerodermi) og purpura (39). Opptil 7 – 8 % sliter med nevrologiske manifestasjoner som ataksi, nevropati og kognitiv svikt som er en vesentlig utfordring som er korrelert med sykdomsaktiviteten (40). Flere utførte studier har vist at ved pSjS har man en høyere risiko for betennelsesforandringer i skjoldbruskkjertelen (thyroidea), som kan medføre autoimmune tyroid sykdommer, spesielt Hashimotos tyreoiditt (37). Et av de mest dødelige utfallene av pSjS er utvikling av B-celle non-Hodgkins lymfom. I en genetisk analyse ble det observert at 25 % av pasienter med pSjS hadde GC-lignende strukturer ved diagnosetidspunktet. Seks av de syv pasientene som senere utviklet non-Hodgkins lymfom hadde GC-lignende strukturer ved diagnosetidspunktet (41). Dette funnet har senere blitt bekreftet i flere studier, der de har vist til at tilstedeværelsen av ektopiske GC-lignende strukturer i biopsivev fra små labiale spyttkjertler er assosiert med økt risiko for lymfom hos pasienter med pSjS (8).

De autoantistoffene som hyppigst påvises hos pSjS-pasienter er anti-nukleære antistoffer (ANA), anti-Ro 60/SSA, anti-Ro 52/SSA og anti-La/SSB (42). Andre autoantistoffer som har blitt assosiert med pSjS inkluderer revmatoid faktor (RF) og anti-muskarin acetylkolin M3-reseptor antistoffer (10). Anti-Ro/SSA og anti-La/SSB er serologiske funn som er blant de mest karakteristiske for pSjS, og som oftest produseres flere år før kliniske symptomer oppstår (43). Anti-SSA kan ofte påvises alene, mens anti-SSB sees oftest sammen med anti-SSA antistoffer (10). Disse autoantistoffene er sterkt assosiert med risikoen for å utvikle pSjS, spesielt ved tidlig debut av sykdommen og alvorlig sykdomsforløp, og har en høyere innvirkning på spyttkjertelfunksjon sammenlignet med seronegative pasienter (10, 42).

### **1.1.3 KLASIFISERINGSKRITERIER**

Dagens klassifisering av pSjS gjøres på grunnlag av retningslinjer fra 2016 fra både American College of Rheumatology (ACR) og European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) (44), som er oppsumert i Tabell 1. For vurdering av sykdomsaktiviteten ved pSjS er det utviklet to indekser: EULAR Sjögrens syndrom pasientrapportert indeks (ESSPRI) og EULAR Sjögrens syndrom sykdomsaktivitetsindeks (ESSDAI). ESSPRI inkluderer subjektive symptomer rapportert av pasienten, mens ESSDAI inkluderer objektive symptomer rapportert av helsepersonell (45, 46). Tidligere kriterier fra American-European Consensus Group (AECG) i 2002 inkluderte også subjektive symptomer, men ACR/EULAR-kriteriene er begrenset til objektive målbare forhold (47).

Men forutsetningen for at pasienten skal gå til stadiet med kliniske undersøkelser er øye- eller munntørrhet. Dette defineres som positiv respons på minst ett av følgende spørsmål om inklusjonskriterier i Tabell 2. Det er derimot satt opp eksklusjonskriterier som utelukker pSjS-diagnose, inkludert tidligere diagnose av andre tilstander som kan ha overlappende kliniske egenskaper eller interferere med kliniske undersøkelser for pSjS, f.eks. strålebehandling av hode og nakke, aktiv hepatitt C-infeksjon, AIDS, sarkoidose, amyloidose, graft versus host sykdom, og IgG4-relatert sykdom (44).

Formålet med de nye kriteriene fra 2016 er å kunne diagnostisere pSjS mer presist og skille det bedre fra andre sykdomstilstander som kan ligne på den autoimmune sykdommen (44). Den histopatologiske undersøkelsen utføres av en patolog for å klassifisere FS til eventuelle fokale infiltrater, som skårer 3. Tilstedeværelsen av spesifikke autoantistoffer for SjS i blodprøven til pasienter skårer også 3. Ocular staining score indikerer skade i øynenes epitel, mengde

tårevæske måles ved Schirmer-test, og strømningshastigheten av spytt testes med sialometri for å overvåke abnormitetene i sekresjon fra spyttkjertlene, hver av testene skårer 1. En samlet skår på fire eller høyere ( $\geq 4$ ) for disse kriteriene er nødvendig for å stille en sikker diagnose av pSjS.

**Tabell 1.** 2016 ACR/EULAR klassifiseringskriterier. Fra Shiboski *et al.*, 2017 (44).

Element	Poeng/skår
Spyttkjertel med fokalt infiltrat og FS $\geq 1$ foci/4 mm <sup>2</sup>	3
Positiv anti-Ro/SSA	3
Okular Staining score $\geq 5$ (eller van Bijsterveld score $\geq 4$ ) i minst 1 øye *	1
Schirmers test $\leq 5$ mm/5 minutter i minst 1 øye *	1
Ustimulert sialometri $\leq 0,1$ ml/minutt *	1

\*Pasienter som behandles med antikolinerge medikamenter bør vurderes etter et tilstrekkelig intervall uten disse medikamenter, fordi disse medikamentene kan være et gyldig mål på oral og okulær tørrhet.

**Tabell 2.** Inklusjonskriterie (innkomstkriterier), hvis pasient svarer «Ja» på minst ett av spørsmålene. Fra Shiboski *et al.*, 2017 (44).

Spørsmål om inklusjonskriterier	
1)	Har du hatt daglig, vedvarende plagsomme tørre øyne i minst 3 måneder?
2)	Har du hatt gjentakende følelse av sand eller grus i øynene?
3)	Bruker du kunstig tårevæske minst tre ganger daglig?
4)	Har du hatt daglig følelse av tørr munn i minst tre måneder?
5)	Må du ofte drikke for å svelge tørre matvarer?

#### 1.1.4 BEHANDLING

Behandling av pSjS deles hovedsakelig i symptomlindrende og sykdomsmodifiserende behandling, for det er foreløpig ingen kur eller behandling for denne sykdommen. Pasienter har ofte behov for oppfølging fra øyeleger og tannleger, og kan ha nytte av videre oppfølging fra spesialister ved systemisk involvering.

Tørrhet i øynene skaper en ond sirkel med økende og vedvarende lokal inflammasjon i og rundt øyet. Tåreerstatningsvæsker kan virke symptomlindrende og fuktighetsgivende, mens øyedråper med ikke-steroid antiinflammatoriske legemidler kan ha effekt på tørre øyne, men dette er ikke vanlig i praksis (48, 49). Ciklosporin øyedråper kan være et alternativ for pasienter med alvorlige okulære tegn relatert til betennelse (50). Pasienter som ikke responderer på øyedråper kan dra nytte av en nærmere undersøkelse hos øyelege, som kan anbefale behandlingsalternativer som «SmartPlug». Denne enheten består av en liten silikonplugg som plasseres i øyets tårekanal, og har til hensikt å øke retensjonen av tårer på overflaten av øyet for å lindre symptomene assosiert med tørrhet i øynene (51).

Ved munntørrhet anbefales det å benytte ikke-medikamentell behandling og god munnhygiene. Dette innebærer å øke væskeinntaket, unngå mat og drikke som kan fremskynde symptomene på tørrhet. For å stimulere pasientens egenproduksjon av spytt, kan sugetabletter som inneholder fluorid eller tyggegummi være et godt førstevalg. Videre kan også saliv-erstatningsmidler, som erstatningsvæsker og fuktighetskremer, bidra til å lindre tørrhet og beskytte mot skade. Det anbefales også at pasienter med pSjS har regelmessige kontroller hos en odontolog, grunnet betydelig kariestendens, periodontitt og orale infeksjoner (32).

Andre kroppsområder som er rammet av tørrhet kan behandles med fuktighetsgivende kremer og salver, og tørr skjede kan behandles med ikke-hormonelle smøremidler eller vaginal østrogenkrem (52). Farmakologisk behandling med muskarin agonister som pilokarpin (Salagen) og cevimelin kan forsøkes hos pasienter med store tørrhetsplager, men medisinen bør brukes med forsiktighet pga. betydelige bivirkninger (53).

Systemisk behandling kan være nødvendig for pasienter med ekstraglandulære systemiske trekk. Sykdomsmodifiserende behandling kan bidra til å forhindre senkomplikasjoner og skade på organer og vev. Kliniske erfaringer viser at få pasienter med høy systemisk symptombyrde responderer på sykdomsmodifiserende medikamenter, inkludert biologiske preparater. Kortikosteroid (Prednisolon), hydroksyklorokin (Plaquenil) og immunsuppressive medikamenter som metotreksat (Metex) kan ha effekt på enkelte ekstraglandulære



manifestasjoner som muskel- og leddsmerter. Disse kan også forsøkes ved andre manifestasjoner, selv om evidens for effekt er da lavere (2, 54).

EULAR har nylig lansert evidens- og konsensusbaserte anbefalinger for behandling av pSjS med lokale og systemiske medikamenter (55). I de fleste tilfeller fant gruppen at det er lav evidens for bruk av immunsuppresjon, og at biologisk behandling ikke har vist seg å ha tilsvarende effektivitet som ved behandling av andre autoimmune sykdommer (55).

Biologiske preparater har begrenset effekt når det gjelder å behandle pSjS, med unntak av en mindre randomisert studie der noen positive effekter på stimulert spyttsekresjon og reduksjon av fatigue/tretthet ble observert (56, 57). Det kan være flere årsaker til den begrensede effekten av biologiske preparater. En av hovedårsakene er pasientens heterogenitet, og derfor stratifisering av pasienter i undergrupper er viktig for å skille mellom responderende og ikke-responderende terapier. En annen grunn kan være mangelen på gode og tilstrekkelige responskriterier for å måle en remisjon.

Nåværende terapeutiske anbefalingene baserer seg dessverre hovedsakelig på effekter sett for andre autoimmune systemiske sykdommer som RA og SLE. De fleste studier innen pSjS er randomiserte kliniske studier som bare varer i en kort periode og de fleste behandlingsforslagene har sikkerhetsproblemer i form av uønskede bivirkninger. Disse midlene bør derfor monitoreres nøye med tanke på effekten og mulige bivirkninger i forhold til mengden og alvorlighetsgraden av EGM (58).

Flere studier har blitt utført på rituximab (anti-CD20), en B-celle hemmer, i behandling av pasienter med pSjS. Disse studiene har konkludert med at rituximab ikke gir noe klinisk nytteverdi for pSjS-pasienter (59, 60). Det må bemerkes også at det er bekymringer knyttet til sikkerheten ved bruk av rituximab, spesielt i forhold til infeksjonsrisiko (59).

For tiden pågår det to viktige kliniske utprøvinger som utforsker bruk av leflunomid og hydroksyklorokin som kombinasjonsbehandling, samt iscalimab (en anti-CD40 behandling), i separate studier som er oppført i *EU Clinical Trials Register* (61, 62). Studien om kombinasjonsbehandlingen med leflunomid og hydroksyklorokin viser foreløpige resultater som tyder på at behandlingen er trygg og gir en klinisk respons med redusert ESSDAI hos pasientene (62). Det er viktig å merke seg at studien fortsatt er under utprøving, og ytterligere data og større deltakergrupper vil være nødvendig for å trekke endelige konklusjoner. Den pågående studien om iscalimab har nylig startet og undersøker sikkerhet og effekt av flere doser av iscalimab administrert subkutant i to ulike populasjoner av pasienter med pSjS, også oppført i *Eu Clinical Trials Register* (61).

## 1.2 HISTOPATOLOGI I PSJS

Histopatologiske trekk i spyttkjertlene til pasienter med pSjS gir verdifull innsikt i sykdommens patofysiologi. En betydelig histopatologisk kjennetegn ved pSjS er lymfocytinfiltrasjon i spyttkjertlerne, karakterisert av foci og eventuell atrofi og destruksjon av kjertelvevet i små spyttkjertler (Figur 3A). Dette skyldes at de infiltrerende lymfocytene, spesielt CD4<sup>+</sup> T-celler som produserer cytokiner, og B-celler som produserer autoantistoffer, kan fremme en inflammatorisk respons og bidra til skade spyttkjertelepitelet, acinære celler, dukter, blodkar og nervefibre. Videre kan den inflammatoriske responsen også føre til fibrose og redusert sekresjon av spytt.

De mest fremtredende T-cellene i forbindelse med pSjS er CD4<sup>+</sup> T-celler, samt underpopulasjonene follikulære T-hjelpeceller (Tfh) og T-hjelpeceller 17 (Th17) (63). Tfh-celler spiller en viktig rolle i GC-reaksjoner, og aktiverer B-celler for å produsere antistoffer (64). Nivåene av Tfh-celler i perifert blod, som også er bekreftet i vev, kan indikere sykdomsaktivitet (65). Th17-celler og dets signaturcytokin interleukin (IL)-17 er påvist i spyttkjertelvev hos pSjS-pasienter (63) og oppdagelsen av Th17 har vært knyttet til flere inflammatoriske og autoimmune sykdommer (66).

B-celleaggregater kan observeres i spyttkjertelvev av pSjS-pasienter, både med og uten GC-lignende strukturer, men mengden øker ved tilstedeværelse av slike strukturer (67). Blant ulike subtyper av B-celler som er identifisert, er hukommelses B-celler vanligere i spyttkjertelvev sammenlignet med perifert blod. En økning i antall CD27-positive plasmaceller i spyttkjertelvevet hos pSjS-pasienter er også vanlig (68). En avvikende regulering av B-celler er også observert, spesielt en overekspressjon av B-celleaktiverende faktor, som er uttrykt både i fokale infiltrater og GC-lignende strukturer (67).

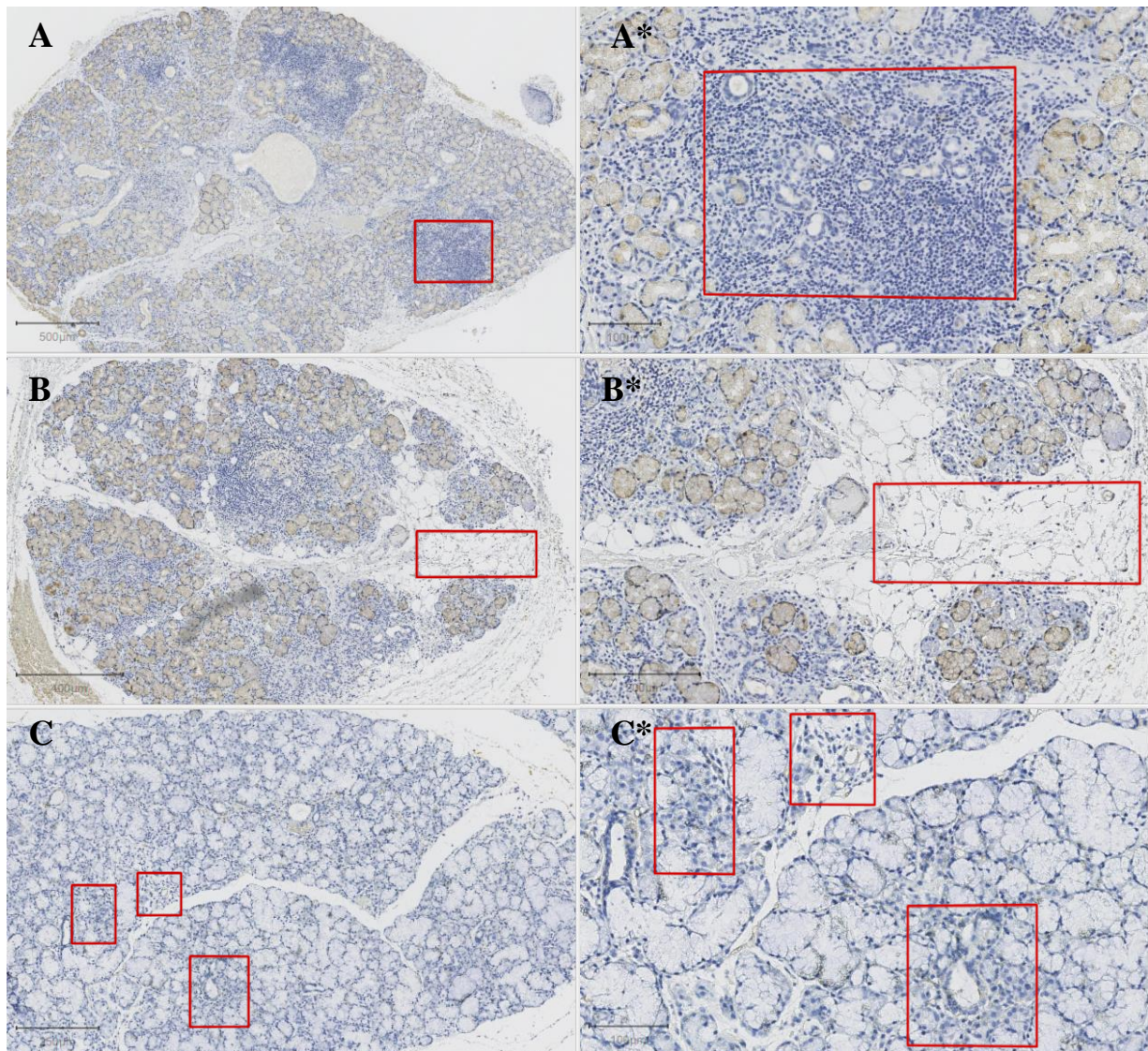
Histopatologisk karakteriseres GC-lignende strukturer av aggregater av B- og T-celler, CD21-positive follikulære DC og aktiverte epitelceller (9). Ved bruk av FS for pasientklassifisering, er gjennomsnittlig FS høyere hos pasienter med GC-lignende strukturer sammenlignet med de uten (9). Figur 3 viser eksempler på spyttkjertelbiopsier med forskjellig FS.

Ved histologisk evaluering av biopsiprøver fra pSjS-pasienter viser det seg en økt grad av atrofiske spyttkjertelendestykker samt fettinfiltrasjon sammenlignet med sicca-kontroller (69, 70). Økning i fettvevserstatning er spesielt merkbar hos pasienter som tester seropositive for autoantistoffer. Adipocytter har blitt identifisert i nærheten av områder med høye nivåer av den proinflammatoriske cytokinen IL-6, og dette kan indikere involvering av fettvev i

inflammasjonen ved pSjS, siden IL-6 er en vanlig mediator i inflammatoriske prosesser (69). Til tross for disse funnene kreves det ytterligere funksjonelle studier for å avdekke det underliggende mekanismene for økningen i fettvevserstatning ved pSjS og ikke minst undersøke spyttkjertelens mikromiljø ytterligere.

Over 50% av pSjS-pasientene har en signatur for IFN type I, og disse har vanligvis høyere skår på ESSDAI, samt økte nivåer av autoantistoffer, revmatoid faktor (RF) og IgG. I tillegg har de reduserte nivåer av lymfocytter og nøytrofiler i blod (71). Aktivering av type I IFN-systemet fører til en kompleks kaskade av signalmolekyler som er sterkt assosiert med aktivering av immunsystemet, inflammatoriske responser og spesielt vern mot virale infeksjoner (72). IFN-signaturen stimulerer videre visse immunceller, spesielt dendrittiske celler (DC), men også B- og T-celler. pDC befinner seg normalt i sirkulasjonen og sekundære lymfoide organer og det er uklart om det er pDC som driver IFN-uttrykket, eller om andre faktorer som apoptotiske celler spiller en rolle (31).

Histopatologisk analyse av spyttkjertelbiopsier blir evaluert og diagnostisert av oral patologer, der de graderer FS. Biopsien anses som positiv ved  $FS \geq 1$ . Ved evaluering av FS inkluderes ikke fettvev i måling av totalt kjertelareal (73). I enkelte biopsier kan forholdsvis store områder av kjertelvevet være erstattet av fettvev slik Figur 3B viser (4). Enkelte patologiske funn viser at de fleste individer med tørrhetsrelaterte symptomer i øyne og munn i sicca-kontrollgrupper har unormalt spyttkjertelvev med milde tegn på betennelse (44, 74). Figur 3C gir en nærmere illustrasjon av små infiltrasjoner av betennelsesceller i vev fra spyttkjertel hos en sicca-kontroll. Tilsvarende er det ikke alle pasientene i pSjS-gruppen som har ødelagte spyttkjertler. Det er derfor et stort behov for en «gullstandard» for diagnostikk og klassifisering av pSjS. For tiden er spyttkjertelbiopsi fra underleppen det beste alternativet tilgjengelig (44). I tillegg til de ovennevnte funnene, er det også blitt påvist lignende resultater i denne studien som er vist under i Figur 3.



**Figur 3. Histologiske vevssnitt fra spyttkjertelbiopsier fra pSjS-pasienter (A og B) og sicca-kontroll (C).** 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)-fargete seksjoner fra spyttkjertelvev av (A) pasient 6 med FS = 2 og GC+, (B) pasient 7 med FS = 9 og GC+, og (C) sicca-kontroll. (A\*) forstørret bilde av markerte område i (A) viser et fokalt infiltrat av > 50 celler/mm<sup>2</sup> rundt utførselsganger og med nærliggende normale acinære endestykker. (B\*) forstørret bilde av markerte område i (B) viser betydelig med fettinfiltrasjon og tap av spyttkjertelendestykker med gjenværende utførselsganger. Fettvev erstatter store deler av kjertelvevet, noe som gjør diagnostikken utfordrende ettersom representativt spyttkjertelvev reduseres. (C\*) forstørret bilde av tre markerte områder i (C) viser små immuncelleinfiltrater rundt utførselsganger og acinier. Dette er et mildt tegn på betennelse i spyttkjertelvevet til sicca-kontrollen.

### 1.3 TAM-RESEPTORER

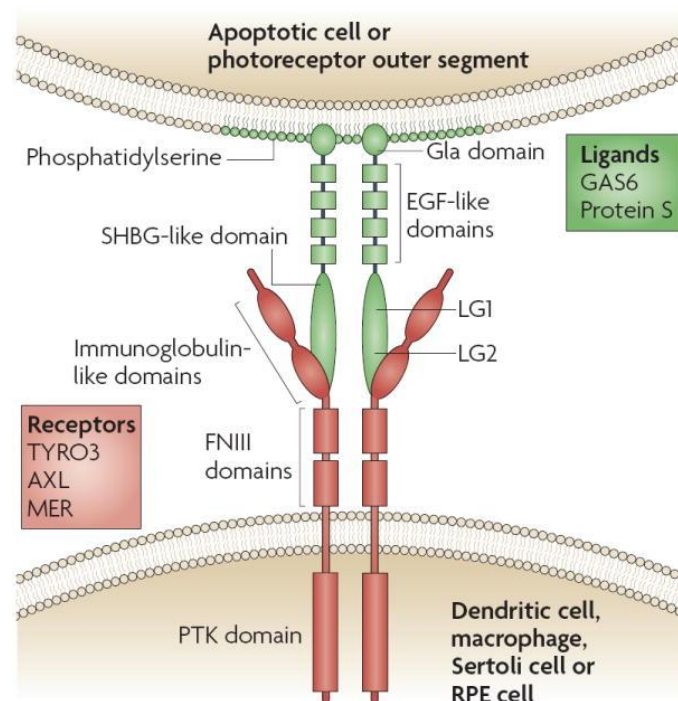
En vesentlig mekanisme for å opprettholde immunologisk homeostase er apoptose, også kjent som programmert celledød. Apoptose er en kontinuerlig prosess som er viktig å aktiv fjerne apoptotiske avfall for å opprettholde vevshomeostase. Efferocytose, prosessen med å fjerne døde celler, reguleres av cellenes eksponering av et sett med «finn meg», «spis meg» og «tolerer meg» signaler, som gjør det mulig for nøytrofiler, DC og makrofager å fagocyttere døende celler. Effektiv fjerning av døde celler av fagocytter er avgjørende for å opprettholde immunsystemets toleranse for selv-antigener. Dette forhindrer frigjøring av auto-antigener fra døde celler og kan dermed undertrykke uønsket autoreaktivitet av immunsystemet (75).

TAM-reseptorer spiller en viktig rolle i å opprettholde denne balansen ved å regulere apoptose og fagocytose av apoptotiske celler og dermed bidra til å forebygge autoimmune sykdommer (76). Tyro3, Axl og Mer er medlemmer av TAM-familien, en gruppe reseptortyrosinkinaser (RTK). Disse reseptorene samhandler med sine ligander, inkludert growth arrest-specific 6 (Gas6) og protein S (ProS). Som andre RTK mottar TAM-reseptorer ekstracellulære signaler som fører til autofosforylering av tyrosinrester, rekruttering av signalmolekyler og intracellulære transkripsjonelle endringer. Aktivisering av TAM-reseptorer kan regulere inflammatoriske cytokinfrigjøring, efferocytose, celleproliferasjon, overlevelse og blodplatestabilisering i immun-, reproduksjons- og nervesystemet (77). Svekkelse av TAM-signalisering kan føre til akkumulering av apoptotiske substanser, frigjøring av auto-antigener, betennelse, undertrykking av toleranse og økt risiko for autoimmunitet. TAM-reseptorer uttrykkes hovedsakelig på fagocytter i sammenheng med immunsystemet, men kan også være tilstede på noen lymfoide populasjoner (78).

TAM-reseptorer er beslektet gjennom både sekvens- og funksjonelle homologier. Hvert medlem består av to ekstracellulære immunoglobulin (Ig)-lignende domener ved den aminoterminalen enden, to fibronectin type III (FNIII)-repetisjoner, et hydrofobt transmembrandomene og et intracellulært proteintyrosinkinase (PTK)-domene ved den karboksyterminalen enden (78). Deres ligander, Gas6 og ProS er strukturelt homologe proteiner, som fungerer som brodannende molekyler mellom TAM-reseptorene og apoptotiske celler (Figur 4). Mens Gas6 er en potent ligand for alle tre reseptorene, kan ProS bare binde seg til Tyro3 og Mer. Binding av ligander til TAM-reseptorer utløser fosforyleringskaskader i de intracellulære domenene av reseptorene. Dette fører til aktivisering av flere signalveier, inkludert PI3K/Akt og MAPK/ERK, som regulerer flere cellulære prosesser, inkludert overlevelse, apoptose, celleproliferasjon og

cytokinproduksjon. Konsekvensene av denne aktiveringen kan varieres avhengig av typen celle og konteksten der signalene blir mottatt (79).

Strukturelt består Gas6 og ProS av to laminindomener som utgjør det karboksyterminale kjønnshormonbindende globulin (SHBG)-lignende domenet. Laminindomenet binder seg til immunoglobulin domenet til TAM-reseptoren. Dette forårsaker dimerisering og aktivering av reseptoren. Gla-domenene befinner seg ved aminoterminalen til ligandene, og det er fire epidermale vekstfaktorrelaterte domener (epidermal growth factor, EGF) mellom Gla- og laminindomenene. Gla-domenene er preget av en tett konsentrasjon av glutaminsyrerester (77).



**Figur 4. TAM-reseptorer og deres ligander.** Tyro3 (også kjent som BRT, DTK, RSE, SKY og TIF), Axl (også kjent som ARK, TYRO7 og UFO) og Mer (også kjent som EYK, NYM og TYRO12) er reseptorproteintyrosinkinaser (PTK) som uttrykkes av dendritiske celler, makrofager og umodne naturlige drepeceller i immunsystemet, Sertoli-celler i testiklene, retinale pigmentepitelceller (RPE) i øyet og flere andre celletyper. TAM-reseptordimerer binder seg til deres to ligander, Gas6 og protein S, gjennom interaksjon mellom de to N-terminale immunoglobulin-lignende domene til reseptorene og de to C-terminale laminin G (LG) regionene, som sammen utgjør SHBG-domenet (kjønnshormonbindende globulin), av liganden. Via deres N-terminale Gla-domener binder Gas6 og protein S seg til fosfatidylserin som vises på den ekstracellulære overflaten av plasmamembranene til apoptotiske celler eller på de ytre segmentene av fotoreseptorer. EGF, epidermal vekstfaktor; FNIII, fibronektin type III. Figur og tekst fra Lemke og Rothlin, 2008 (79). Gjengitt med tillatelse fra Springer Nature.

## 1.4 UTVALGTE IMMUNCELLER

Makrofager, dendritiske celler (DC) og konvensjonelle dendritiske celler type 1 (cDC1) er utvalgte immunceller som er inkludert i denne studien pga. deres betydelige uttrykksnivå av TAM-reseptorer på deres plasmamembran (76, 80). Disse immuncellene er spesielt kjent for deres sentrale roller i fagocytose av apoptotiske celler (efferocytose) og modulering av type I IFN signalering (77).

Makrofager er myeloid-differensierte immunceller som er spesialisert for fagocytose og antigenpresentasjon. DC er viktige for antigenpresentasjon, aktivering av T-celle-responsen og initiering av adaptiv immunitet. cDC1 er spesielt involvert i krysspresentasjon av antigener til CD8<sup>+</sup> T-celler, som kan spille en rolle i ødeleggelsen av epitelceller og utvikling av autoimmunrespons (22). For påvisning av makrofager er anti-CD68 antistoff brukt, mens anti-CD11c antistoff er anvendt for deteksjon av DC, og både anti-CD11c og anti-CD370 antistoffer er benyttet for påvisning av cDC1 (Tabell 4).

I labiale spyttkjertler hos pSjS-pasienter er det observert en økning i antall makrofager og dendritiske celler, inkludert cDC1, sammenlignet med friske kontroller (81). Når TAM-reseptorer binder til liganden Gas6, fører det til aktivering av intracellulære signalveier som regulerer en rekke cellulære funksjoner, inkludert overlevelse, differensiering, migrering og fagocytose (79). Nylige studier har identifisert TAM-reseptorer som viktige faktorer i å regulere funksjonen til makrofager og DC i autoimmune sykdommer. TAM-reseptorer hemmer immunresponsen og bidrar til å begrense betennelse og vevsskade (76).

## **2. MÅL FOR STUDIEN**

Målet i denne studien var å sammenligne spyttkjertelvev fra pSjS-pasienter og sicca-kontroller for å evaluere uttrykket av TAM-reseptorer og deres ligand Gas6 i immunceller. Formålet var å identifisere potensiell svekkelse av apoptotisk cellefjerning hos disse pasientene.

## **3. MATERIALER OG METODER**

### **3.1 STUDIEPOPULASJON**

Studien benyttet små labiale spyttkjertelbiopsier fra 9 pasienter med pSjS og 4 kontrollpersoner uten SjS (non-SjS). De sistnevnte vil heretter bli omtalt som «sicca-kontroller». Disse kontrollene ble inkludert for å sammenligne med pasientene, og hadde symptomer på tørrhet (sicca symptomer), men oppfylte ikke kriteriene for å bli diagnostisert med SjS. Kliniske opplysninger for sicca-kontrollgruppen var ikke tilgjengelig. Alle biopsier ble tatt for diagnostisk prosedyre ved avdeling for øre-nese-hals i Haukeland universitetssjukehus, Bergen mellom 1989 og 2020. Alle pSjS-pasienter oppfylte AECG-kriteriene (47). På grunn av ytterligere revidering av kriteriene ble alle pasienter re-klassifisert med de reviderte 2016 ACR/EULAR klassifiseringskriteriene (44). Alle pasientene oppfylte også 2016 klassifiseringskriteriene uten å ha ekstra autoimmune sykdommer eller lymfom. I løpet av prosjektet ble pasient 1 underlagt en re-evaluering som avdekket at pasientens FS var under 1 ( $FS < 1$ ). Det ble oppdaget at pasienten ikke oppfylte kriteriene for å bli klassifisert som en pSjS-pasient. Imidlertid ble pasienten likevel beholdt i pasientkohorten basert på en tidligere klinisk diagnose av Sjögrens syndrom (Tabell 3). Denne viktige informasjonen om pasient 1 ble oppdaget i etterkant av alle analysene. Pasient 1 er derfor markert i alle analyseresultatene for å reflektere denne etterfølgende innsikten.

Fritt informert samtykke ble innhentet fra alle deltakerne og studien ble godkjent av Regionale komiteer fra medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, Vest-Norge (REK vest) (#2009/686).



**Tabell 1.** Kohortegenskaper.

Parameter	ID	FS	GC	Salivasekresjon (ml/ 5 min)	SSA	SSB	ANA	RF
<b>Ro+/La+</b>	8	3	0	1	+	+	+	-
	7	9	1	*	+	+	+	-
	2	4	0	*	+	+	-	+
<b>Ro+/La-</b>	5	1	0	1,2	+	-	+	-
	6	2	1	1,2	+	-	-	-
<b>Ro-/La-</b>	3	2	1	1,2	-	-	+	-
	4	3	0	3,5	-	-	*	-
<b>FS &lt; 1, Ro+</b>	9	<1	0	3,2	+	-	+	-
<b>FS &lt; 1, Ro-</b>	1**	<1	0	10,8	-	-	+	-

\* Data er ikke tilgjengelig.

\*\* Pasient 1 som tidligere hadde FS = 2, ble gjenstand for en revurdering av biopsien, som indikerte at pasienten hadde en FS < 1. Det bemerkes at pasienten forble en del av kohorten siden pasienten hadde en klinisk diagnose Sjögrens syndrom, men ble identifisert med rødfarge i alle påfølgende dataanalyser som presenteres.

### 3.2 IMMUNHISTOKJEMI

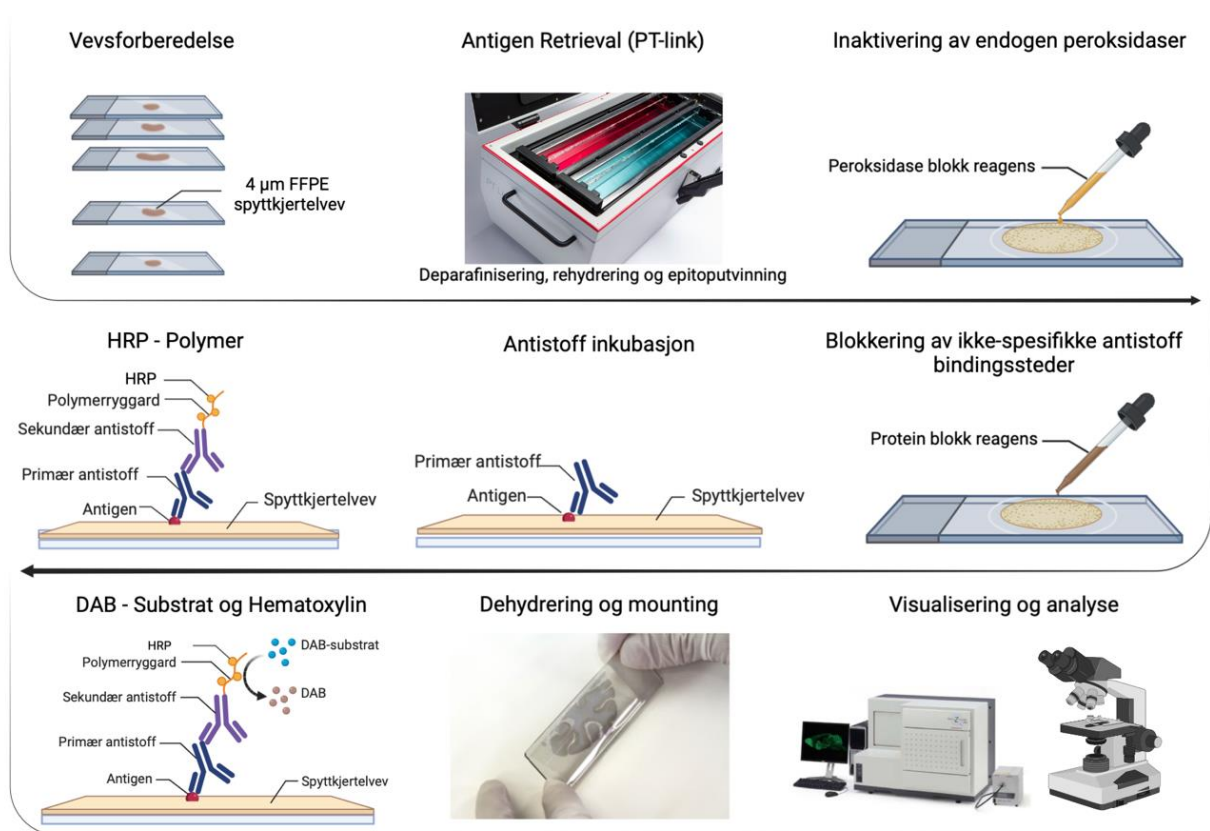
Formalinfixert parafininnstøpt (FFPE) spyttkjertelvev fra både pSjS-pasienter og sicca-kontroller ble kuttet i seksjoner med 4 µm tykkelse ved bruk av et mikrotom (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany), plassert på Superfrost Plus Microscope objektglass, og inkubert ved 56 °C i 1 – 2 timer for å øke bindingskapasiteten ytterligere. Objektglassene ble plassert i antigen retrieval (AR) løsning (1:50 fortyning) i PT-link (Pre-Treatment Module for Tissue Specimens, Agilent Technologis) ved ulike pH, temperatur og tid for hvert antistoff (Tabell 5). Objektglassene ble tatt ut av PT-linken og vasket i vaskebuffer (Tabell 5). Etter vask ble det dannet en hydrofob barriere med en lipofil penn (ImmEdge pen) for å begrense overflødig tap av antistoffløsning og sikre at dets retensjon på vevet, uten avrenning fra objektglasset. Uten den hydrofobe barrieren risikerer man at vevet tørker ut, spesielt ved inkubering over natt. Peroksidase blokk, se Tabell 5, ble påført objektglassene i et fuktekammer, før de ble vasket i 100 ml vaskebuffer i 3 x 5 min på en orbital shaker. Serumblokkering ble utført i et fuktekammer i ulike tidslengde for å forhindre uspesifikk binding av antistoffene, se Tabell 5.

Konsentrasjonene for hvert antistoff var basert på foreslåtte fortynninger fra leverandøren eller testing. Antistoffkonsentrasjonene testet for hvert antistoff er angitt i Tabell 4. Det ble foretatt flere feilsøkingsforsøk for antistoffer som ikke viste lovende resultater i samsvar med de foreslåtte fortynningene fra leverandøren av antistoffer. Eksempel på forskjellige testet konsentrasjoner av ulike antistoffer på små labial spyttkjertelvev med IHC er vist i Tabell 4. Etter at tiden for inkubasjon med serumblokk var over, ble antistoffene påført objektglassene. Antistoff inkubasjonstiden var 1 time for alle antistoffene i romtemperatur (RT), unntatt for Mer som var 1,5 time. Objektglassene ble deretter vasket med vaskebuffer i 3 x 5 min på en orbital shaker, både før og etter påføring av polymer koblet til horseradish peroksidase (HRP). Kromogen DAB ble påført objektglassene og inkubert inne i et avtrekkskap, og overflødig DAB ble vasket av med avionisert vann. Motfarging med Hematoxylin (S3301 Dako) for en visuell kontrast til DAB ble utført i 10 min før vask med avionisert vann. Til slutt ble objektglassene dehydrert i en serie i økende etanolprosent (70 %, 96 %, 96 %, 100 %, 100 %) i 1 min hver, og xylen i 5 min før de ble montert med Eukitt (mounting medium #3989) i et avtrekkskap. Objektglassene ble sendt til skanning etter å ha vært i et avtrekkskap i RT over natt. Figur 5 viser en sekvensiell avbildning av generell arbeidsflyt for IHC.

**Tabell 2.** Liste over mono- og polyklonale antistoffer brukt til IHC-farging av vev fra labiale spyttkjertler.

Antistoff	Vert	Klon	Produsent	Testet konsentrasjon			
				1:25	1:50	1:100*	-
CD68	Mus	PG-M1	Agilent Dako	1:25	1:50	1:100*	-
CD11c	Kanin	Polyklonal	SIGMA-ALDRICH	1:50	1:200*	-	-
CD370	Kanin	Polyklonal	Proteintech	1:50	1:200*	-	-
Tyro3	Mus	OTI4C8	ORIGENE	1:50*		-	-
Mer	Kanin	Polyklonal	Invitrogen	1:50	1:200*	-	-
Axl	Geit	Polyklonal	R&D systems	0,3 µg/ml*	1,0 µg/ml	1,5 µg/ml	3,0 µg/ml
Gas6	Geit	Polyklonal	R&D systems	5 µg/ml*	10 µg/ml	15 µg/ml	-

\* Valgte konsentrasjoner for farging av vevsseksjoner.



**Figur 5. Flytskjema for immunhistokjemi (IHC).** Formalinfiksert parafininnstøpt (FFPE)-spyttkjerteltev fra pSjS-pasienter og sicca-kontroller ble kuttet i 4 µm tykke seksjoner ved hjelp av et mikrotom. Seksjonene ble plassert på Superfrost Plus-mikroskopglass og inkubert ved 56 °C i 1-2 timer for å forbedre bindingskapasiteten. Deretter ble objektglassene behandlet med antigen retrieval-løsning ved ulike pH-verdier, temperaturer og tider for hvert antistoff (Tabell 5). Etter vask ble det påført en hydrofob barriere rundt vevet. Peroksidaseblokkering og serumblokkering ble deretter utført for å redusere uspesifikk binding. Antistoffene ble påført objektglassene og inkubert i angitt tid ved romtemperatur. Etter vasking ble polymer koblet til horseradish peroksidase (HRP) påført og visualisert med DAB-kromogen. Objektglassene ble motfarget med Hematoxylin for kontrast og deretter dehydrert og montert før skanning. Figuren laget med <https://www.biorender.com>.

**Tabell 3.** Oversikt over trinnene og reagensene i IHC-protokoller for alle antistoffene.

Antistoff	CD68	CD370	CD11c	Tyro3	Mer	Axl	Gas6
<b>Trinn og løsninger</b>							
<b>pH/PT-link (Dako EnVision Target retrieval sol pH)</b>	pH = 9 97 ° C / 20 min	pH = 9 97 ° C / 20 min	pH = 6 98 ° C / 28 min	pH = 6 100 ° C / 10 min	pH = 6 97 ° C / 20 min	pH = 6 95 ° C / 10 min	pH = 6 95 ° C / 10 min
<b>Vaske buffer</b>	EnVision FLEX (20x) (3 x 5 min)	EnVision FLEX (20x) (3 x 5 min)	EnVision FLEX (20x) (3 x 5 min)	EnVision FLEX (20x) (3 x 5 min)	EnVision FLEX (20x) (3 x 5 min)	PBS med 0,05 % Tween20 (3 x 10 min)	PBS med 0,05 % Tween20 (3 x 10 min)
<b>Peroксidase blokk</b>	EnVision FLEX Peroксidase block (5 min)	EnVision FLEX Peroксidase block (5 min)	EnVision FLEX Peroксidase block (5 min)	EnVision FLEX Peroксidase block (5 min)	EnVision FLEX Peroксidase block (5 min)	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Methanol (15 min)	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Methanol (15 min)
<b>Protein blokk</b>	3 % BSA i TBS med 5 % geiteseum (10 min)	3 % BSA i TBS med 5 % geiteseum (10 min)	3 % BSA i TBS med 5 % geiteseum (15 min)	3 % BSA i TBS med 5 % geiteseum (10 min)	3 % BSA i TBS med 5 % geiteseum (15 min)	1 % BSA, 10 % Donkey in PBS Tween20 0,05 % (30 min)	1 % BSA, 10 % Donkey in PBS Tween20 0,05 % (30 min)
<b>Antistoff-klon Fortynningsforhold Inkubasjonstid</b>	Mab 1/100 1 time	Rabbit 1/200 1 time	Polyclonal Rabbit IgG 1/200 1 time	OriGene Mab 1/150 1 time	Invitrogen Polyclonal rabbit IgG 1/200 1,5 time	Polyclonal goat IgG 0.3 µl/ml 1 time	Polyclonal goat IgG Gas6 5,0 µl/ml 1 time
<b>Polymer/HRP</b>	EnVision FFLEX HRP (30 min)	EnVision FFLEX HRP (30 min)	EnVision FFLEX HRP (30 min)	EnVision FFLEX HRP (30 min)	EnVision FFLEX HRP (30 min)	VisUCyte HRP polymer Goat IgG ab (30 min)	VisUCyte HRP polymer Goat IgG ab (30 min)
<b>DAB</b>	17 min	13 min	10 min	5 min	10 min	3,5 min	3,5 min

### **3.3 HAMAMATSU NANOZOOMER-XR**

Biopsisnittene ble skannet ved bruk av en Whole Slide Scanning (WSS)-maskin av typen Hamamatsu NanoZoomer-XR etter fullføring av immunhistokjemiske prosesser. WSS-maskiner representerer høyteknologiske digitale mikroskoper som gir høyoppløselige digitale bilder av hele vevsprøven. Dette gjorde det mulig å analysere vevsprøvene digitalt i stedet for tradisjonelle mikroskoper. NanoZoomer-XR er spesielt utviklet for å møte kravene til moderne patologi, forskningslaboratorier og helsepersonell innen diagnostisering av sykdommer. Maskinen opprettholder et skarpt fokus på hele snittet og produserer klare og skarpe bilder. Videre innehar maskinen en automatisk kalibreringsfunksjon som jevnlig utfører rutinemessige kalibreringer av lysintensitet, hvitbalanse og skyggelegging for å sikre den beste bildekvaliteten (82).

Det moderne digitale mikroskopet analyserte snittene med høy presisjon. Snittene ble lastet inn og programvaren startet skanning ved å trykke på batch-knappen. Heretter ble snittene skannet automatisk og lagret i en ønsket mappe. Automatisering av hele prosessen førte til en mer effektiv arbeidsflyt og redusert risiko for menneskelig feil ved å eliminere feilaktig håndtering og/eller subjektive vurderinger. Skanneprosessen tok omtrent 1 min per snitt og de skannede snittene ble vist jevnt og raskt gjennom visningsprogramvaren, NDP.view2. Digitale bilder av vevssnittene ble heretter analysert ved hjelp av analyseprogramvaren QuPath.

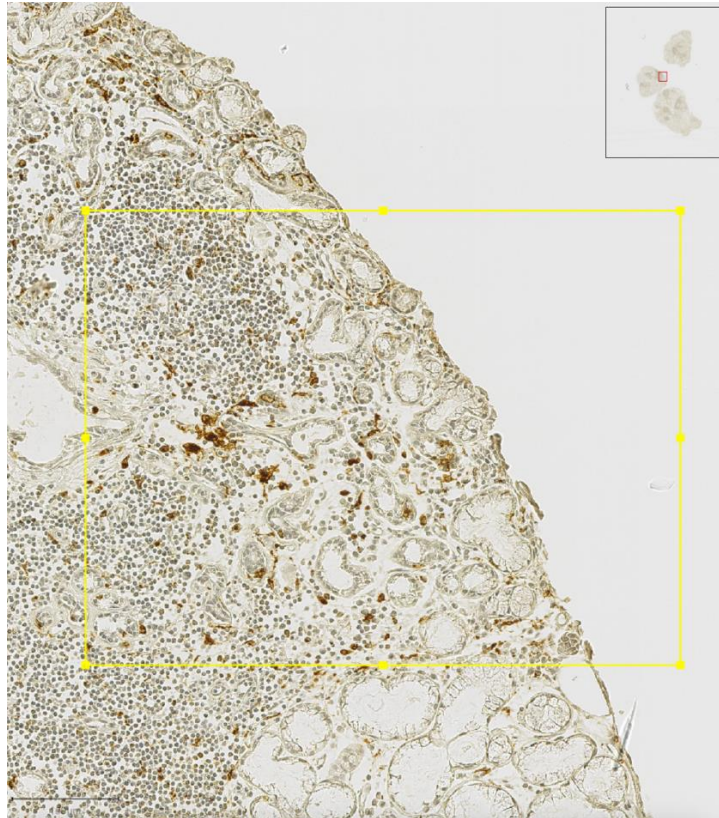
## 3.4 QUPATH

QuPath er en åpen kildekode-programvare for biomedisinsk bildeanalyse. Programvaren er en digital kvantifiseringsprogramvare som brukes i patologisk og biomedisinsk forskning. QuPath ble valgt i denne studien pga. at den tilbyr et omfattende evalueringsverktøy for analyser av biomarkører (83). Ved hjelp av QuPath var det mulig å identifisere og segmentere objekter i spyttkjertelvevet. Flere QuPath-funksjoner (versjon 0.3.2) ble anvendt i denne studien for å analysere spyttkjertelvev av både pSjS-pasienter og sicca-kontroller.

### 3.4.1 OPTIMALISERINGSPROSESS FOR FARGER

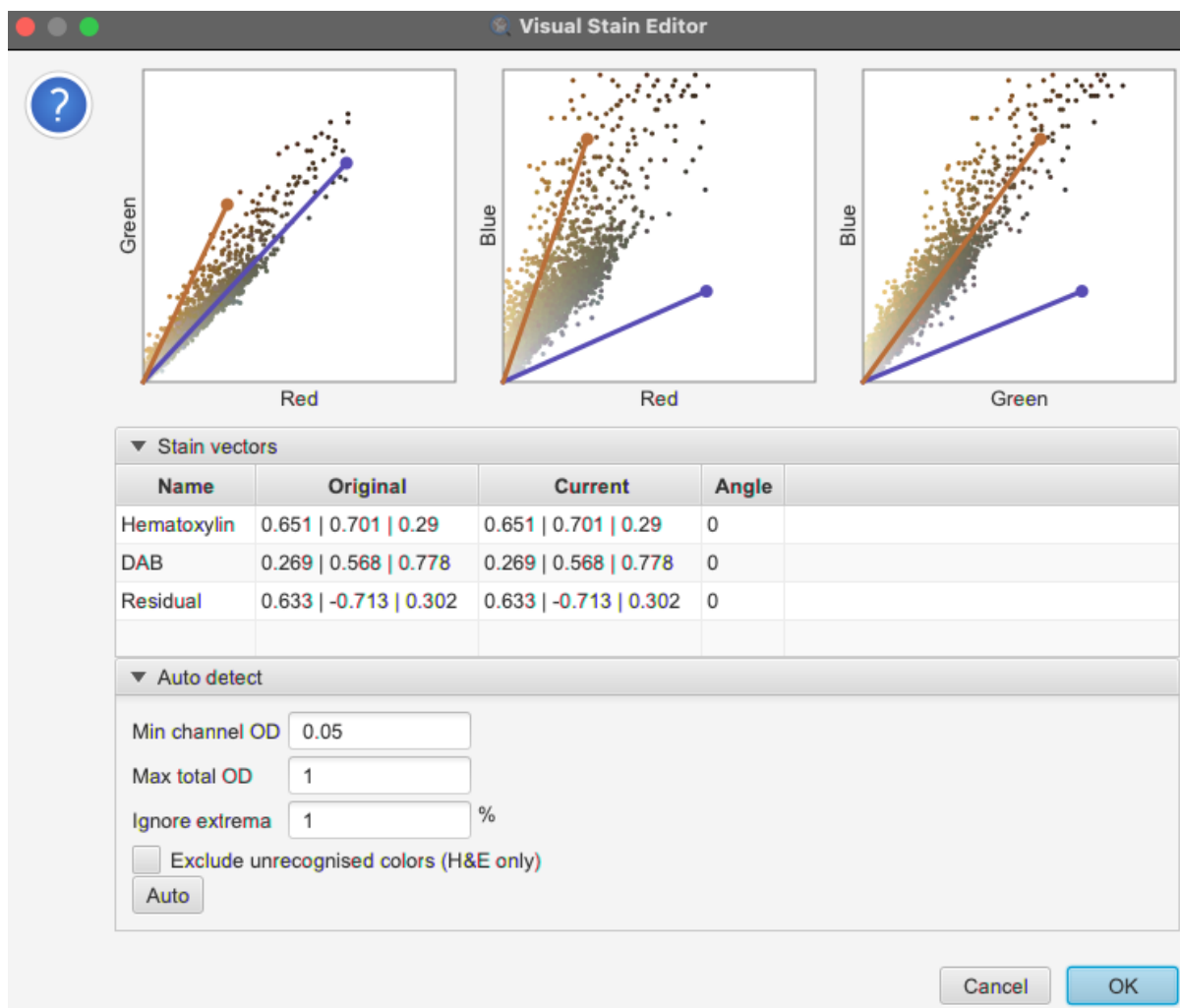
Tilpasninger i QuPath ble utført for å kunne gjennomføre en så presis celledeteksjon som mulig. Dette ble gjort ved å estimere fargevektorer i programvaren. Fargevektorene har en viktig funksjon i fargeutvinning ved å normalisere fargene på de «rene» fargene i et bilde, uavhengig av fargeintensiteten (84). Dette gir en standardisert fremstilling av fargeinformasjonen som kan brukes til å identifisere og kvantifisere spesifikke farger eller fargekombinasjoner i bildet. En tilsvarende fargevektor som representerer bakgrunnen, gir informasjon om hvordan «ingen farge» ser ut og spiller også en vesentlig rolle i beregningene (85). Ved å velge *Brightfield (H-DAB)* som bildetype i QuPath, vil standard fargevektorer for hematoxylin og DAB automatisk benyttes. Selv om implementeringen av denne prosessen ikke alltid er nødvendig for å forbedre fargeadskillelsen i QuPath, var det avgjørende for dette prosjektet. Utførelsen av vevsfarging på visse snitt ble utført av en overingeniør i forskningsgruppen i oktober 2020. Dette resulterte i en lys hematoxylin-kromogen, som skapte utfordringer for korrekt identifisering og gjenkjenning av farger ved bruk av QuPath-programvaren. Selv utførte jeg farging av kontrollgruppen og en del av pasientsnittene i løpet av våren 2023. For å illustrere dette fenomenet, vises eksempler i Figur 20 og 21.

For å forbedre fargeseparasjonen ble det utført en prosedyre for å estimere fargevektorene ved å bruke kommandoen «*Analyze ▸ Preprocessing ▸ Estimate stain vectors*» i QuPath. Prosedyren involverte valg av en representativ region som inneholdt tydelige eksempler på fargene, samt valg av et bakgrunnsområde og tegning av en rektangelanmerkning rundt dette området som er illustrert i Figur 6. Fargeforbedringer som ble utført på vevsseksjoner farget for CD68 er presentert her som illustrasjon. Tilsvarende metode ble anvendt for hvert enkelt antistoff.



**Figur 6.** Pasient ID: 2, Antistoff: CD68. Manuelt valgt område for automatisert fargeestimering som er representativt for spyttkjertelvev, med både DAB- og hematoxylin-kromogen og bakgrunnsområde. Ved hjelp av denne annoteringen ble QuPath begrenset til å kun analysere dette området for telling av positive celler for markøren CD68.

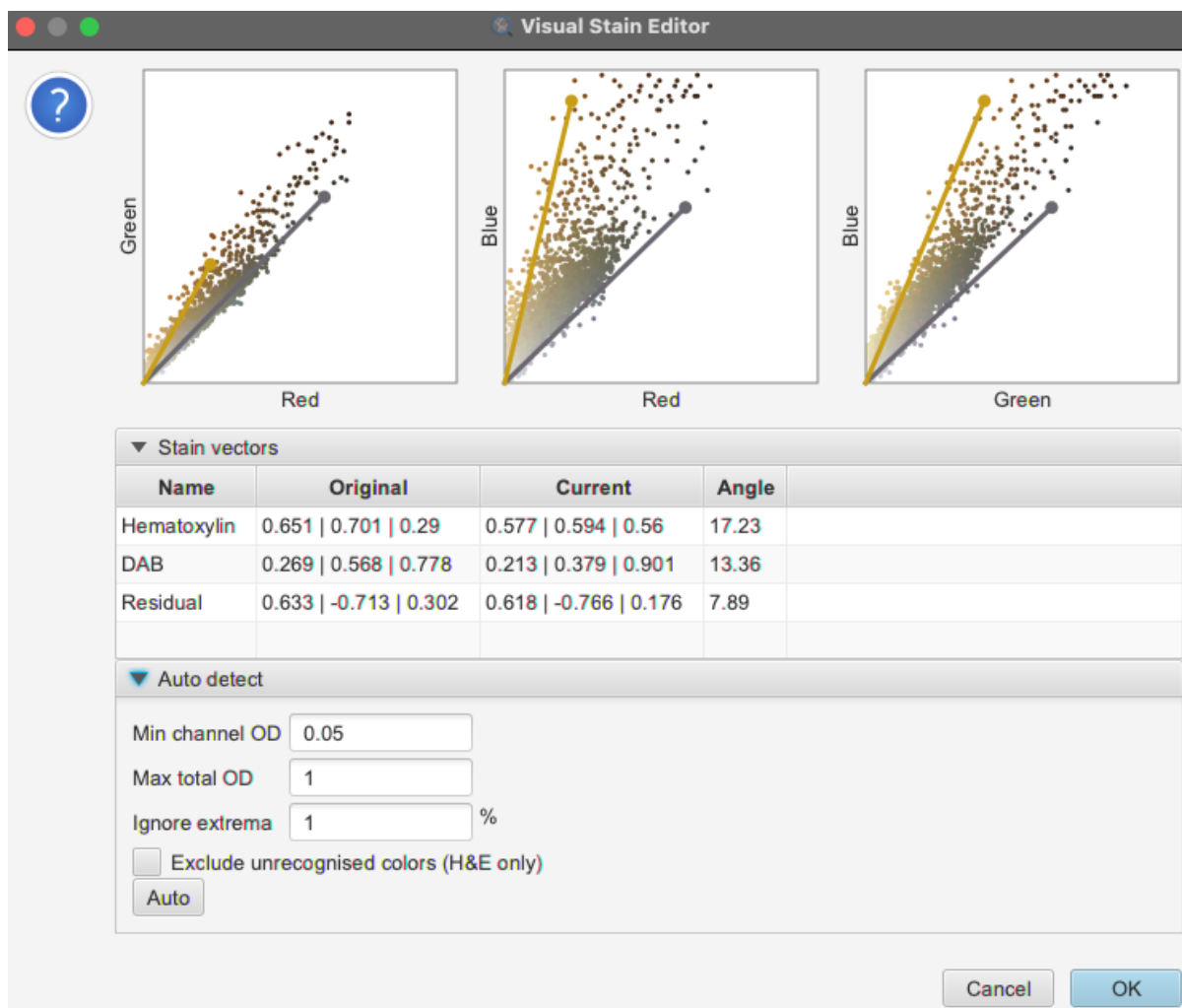
QuPath genererte da spredningsplott for å visualisere forholdet mellom de røde, grønne og blå verdiene for hver piksel vist i Figur 7. Informasjonen ble presentert gjennom tre separate 2D-spredningsplott, hvor hver farge ble systematisk plottet mot en annen farge. I tillegg tegnet QuPath fargede linjer for å indikere de eksisterende fargevektorene. Dette er vist i Figur 7.



**Figur 7. Innledende spredningsplott for fargeestimering.** «Visual Stain Editor» viser en visuell representasjon av fordelingen av farger i et digitalt bilde, basert på to valgte fargekanaler. Hver piksel i figuren representeres av en prikk på spredningsplottet, og fargeintensiteten til pikselen vises ved fargen på prikken. Spredningsplottet ble brukt til å justere fargeestimeringsinnstillingene og forbedre nøyaktigheten i analysen av bildet.

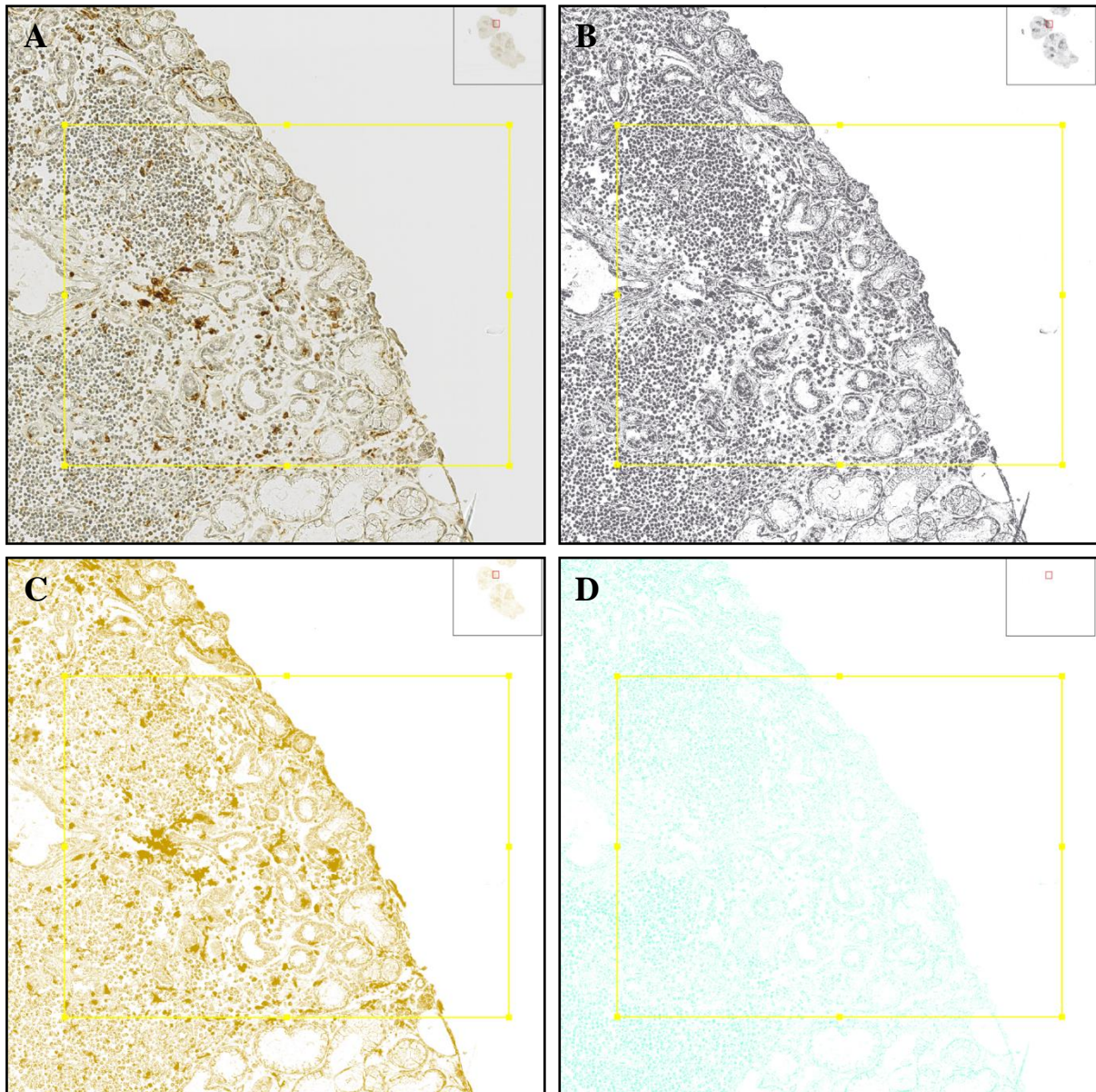
Spredningsplottene for de opprinnelige fargevektorene i eksempelbildet vises i Figur 7. Ideelt sett skulle fargevektorene omkranset de fleste av de spredte punktene tett. Imidlertid var dette ikke tilfelle, da flere punkter syntes å være for langt trukket langs den grønne akse i Figur 7 i forhold til fargevektorene. I tillegg virket vektorene for vidt adskilte i plottet Rød vs. Blå i Figur 7. Vektorene viste seg å relativt nøyaktige, men det var noe rom for forbedring. Ved å trykke på Auto-knappen foretok QuPath en mer effektiv vurdering av fargevektorene basert på den gitte informasjonen i det valgte området. Automatisk tilpasning ble deretter gjennomført og de resulterende endringene ble vist i spredningsplottene i Figur 8.





**Figur 8. Auto-estimerte farger.** Ved å trykke på «Auto»-knappen i figuren, justerte programvaren automatisk fargeestimeringsinnstillingene for å optimalisere fargegjenkjenning og separasjon av ulike vevskomponenter. Figuren viser et fargeseparasjonskart som representerer fordelingen av de ulike fargene i det rektangulære bildeområdet. Fargene er kodet i ulike farger for å skille mellom vevsstrukturer og farget markør i bildet. Ved disse fargeestimeringsinnstillingene kunne nøyaktigheten i videre kvantitative analyser forbedres.

De estimerte vektorene som ble generert, viste denne gangen et mer fornuftig resultat. På dette tidspunktet ble fargene gitt et informativt og unikt navn, og de resulterende fargevektorene ble benyttet i den påfølgende analysen. Originalbildet forble uendret, men fargevektorene i bildepanelet ble oppdatert for å gjenspeile endringene. For å visualisere disse endringene ble lysstyrke/kontrast-metoden benyttet, som kommer frem i Figur 9.



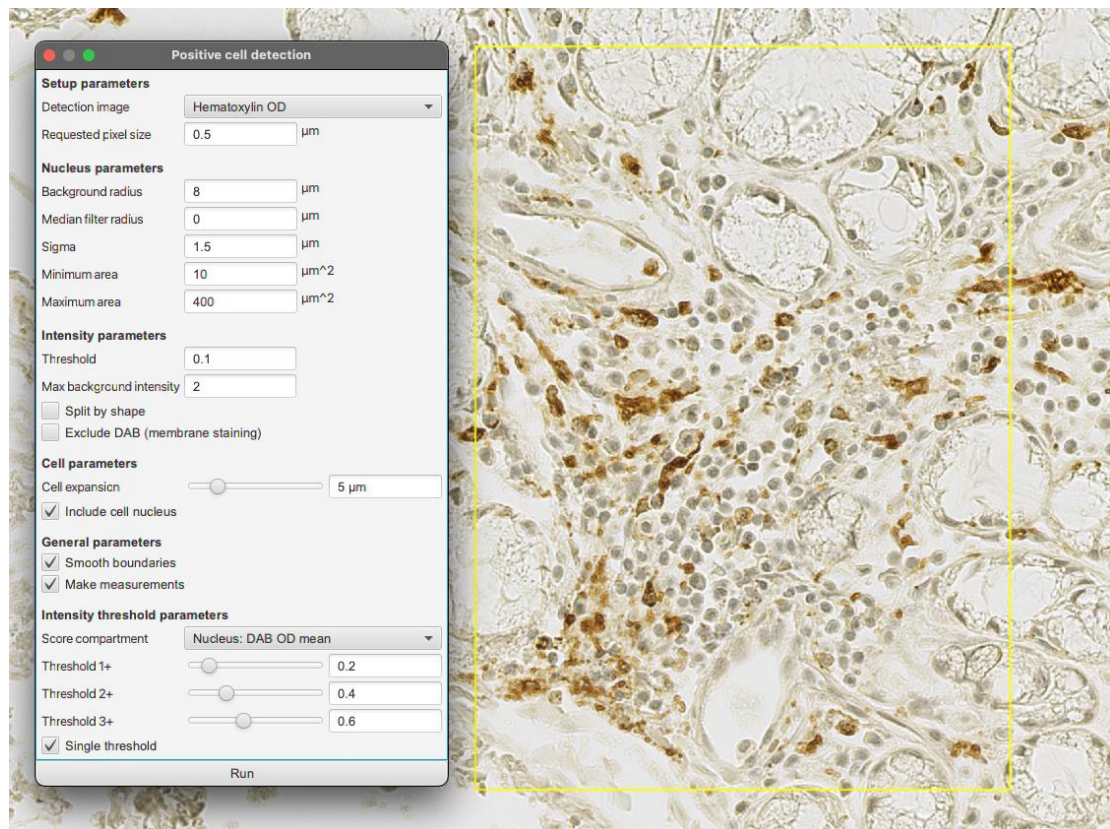
**Figur 9. Visualisering av estimerte farger ved hjelp av lysstyrke/kontrast-verktøyet. A:** Originalbilde, **B:** Hematoxylin, **C:** DAB og **D:** Residualbilde.

### 3.4.2 POSITIV CELLEDETEKSJON

Det ble benyttet en funksjon for å automatisk detektere positive celler i QuPath. Dette ble gjort for å standardisere og automatisere prosessen med å telle celler og objekter, slik at arbeidsbelastningen for manuelt å tegne områder og telle celler inne i disse områdene reduseres. Den digitale tilnærmingen tillot rask og nøyaktig deteksjon av celler, og kunne håndtere et større antall objekter enn manuell telling. Den digitale celledeteksjonsfunksjonen som ble brukt i denne studien, kalles «*Positive cell detection*», og er basert på en bestemt definert terskelverdi

for intensitet av biomarkøren som identifiserer celler. Programvaren kan dermed forbedre identifiseringen av DAB-positive celler ved å bruke denne bestemte terskelverdien. Etterpå måtte en algoritme trenes opp til at QuPath kunne forstå de forskjellige celletypene i vevet. Dette beskrives nærmere i de påfølgende trinnene.

For å optimalisere deteksjonsparameterne i en valgt region, ble det trukket et rektangel i det aktuelle området. Deretter ble kommandoen «*Analyze* ▶ *Cell analysis* ▶ *Positive cell detection*» utført, som åpnet en dialogboks med flere alternativer for å justere hvordan cellene skulle oppdages. Standardverdiene ble brukt som utgangspunkt, da de ofte er tilstrekkelige for å komme i gang med analysen. Nederst i dialogboksen var det alternativer knyttet til klassifiseringen av oppdagede celler som positive eller negative. Figur 10 viser markeringen av en valgt region og dialogboksen av positiv celledeteksjon.



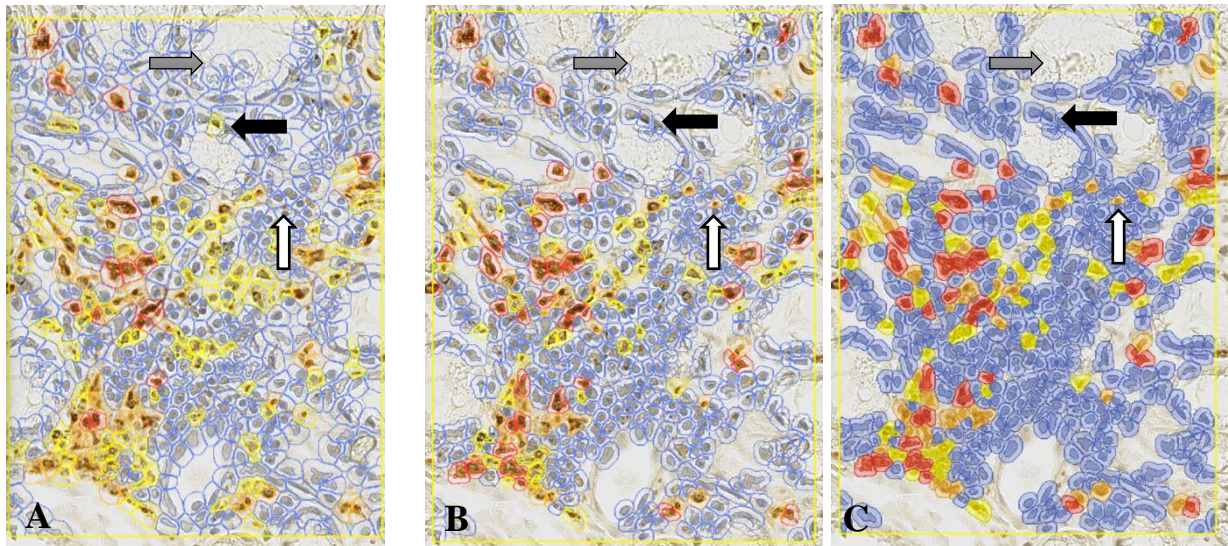
**Figur 10. Dialogboks for positiv celledeteksjon med standardverdiene.** Regionen som ble valgt for analysen inkluderer både CD68+ og CD68- celler i spyttkjertelvev av pasient 2.

Det ble utforsket mulighetene for å optimalisere parameterne for celledeteksjon for alle markører. I oppgaven presenteres et eksempel på optimaliseringsprosessen for CD68 i

spyttkjertelvevet til pasient 2. I dette spesifikke tilfellet hadde bruk av «*Optical density sum*» i stedet for «*hematoxylin OD*» en tendens til å gi bedre resultater, ved å redusere antallet fragmenterte kjerner (Figur 10). Parameterne «*Background radius*», «*minimum area*» og «*maximum area*» ble justert til henholdsvis 5  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}^2$  og 300  $\mu\text{m}^2$ , med tanke på de relativt små cellene i spyttkjertel. Partikler eller rusk med større dimensjoner enn celler vil med disse justeringer ikke bli identifisert som celler ved deteksjonsprosessen. «*Threshold*»-verdien ble økt til 0,2, ettersom flere små ikke-cellestrukturer ble oppdaget som celler. «*Split by shape*» ble valgt, da flere celler kunne oppfattes som en stor celle pga. sammenkoblinger av DAB-kromogen. «*Cell expansion*» ble redusert til 3  $\mu\text{m}$ , ettersom diameteren til cellene var relativt liten. Ettersom markøren av interesse (CD68) var knyttet til hele celle og DAB-kromogenet også kunne være til stede i cellens cytoplasma, ble «*Score compartment*»-verdien endret til «*cell: DAB OD mean*». Dette valget baseres på gjennomsnittlig DAB-kromogenet i hele cellen. Opptil tre ulike terskler kan settes for å klassifisere celler etter fargeintensitet, dvs. negativ (blå), svakt positiv (1+, gult), moderat positiv (2+, oransje) og sterkt positiv (3+, rød). Tabell 6 presenterer de justerte parameterne, og Figur 11 viser resultatene av parameterjusteringen for deteksjon av positive celler.

**Tabell 4.** Justerte parameterne for en optimal positiv celledeteksjon for CD68.

Hovedparameter	Delparameter	Standardverdier	Optimaliserte verdier
<b>Setup parameters</b>	Detection image	Hematoxylin OD	Optical density sum
<b>Nucleus parameters</b>	Background radius	8 $\mu\text{m}$	5 $\mu\text{m}$
	Minimum area	10 $\mu\text{m}^2$	5 $\mu\text{m}^2$
	Maximum area	300 $\mu\text{m}^2$	300 $\mu\text{m}^2$
<b>Intensity parameters</b>	Threshold	0, 1	0,2
	Split by shape	Av	På
<b>Cell parameters</b>	Cell expansion	5 $\mu\text{m}$	3 $\mu\text{m}$
<b>Intensity threshold parameters</b>	Score compartment	Nucleus: DAB OD mean	Cell: DAB OD mean
	Threshold 1+, 2+, 3+	0.2, 0.4, 0.6	0.3, 0.4, 0.5
	Singel threshold	På	Av



**Figur 11. Justeringen av parameterne i QuPath for å oppnå presis celledeteksjon for CD68. A** celledeteksjon med standardverdiene og små endringer. **B** og **C** viser objekter (celler) som ble detektert etter at parameterne ble justert. **C** viser en tydeligere visning av de identifiserte cellene. Justeringen førte til at falske positive ikke lenger ble detektert som celler (grå pil), falske positive celler ble korrigert til å bli oppdaget som negative (svart pil), og celler som tidligere feilaktig ble klassifisert som negative, men som faktisk var positive, ble korrigert og oppdaget som positive celler (hvit pil). Dette førte til en mer presis positiv celledeteksjon.

**Tabell 5. Parameterne for positiv celledeteksjon.** Disse ble justert for å kunne detektere flest mulig positive celler i hvert snitt og samtidig minske sannsynligheten for falsk positiv celledeteksjon. (85)

Positiv celledeteksjonsparametrene		
<b>Setup parameters</b>	Detection image	Transformert bilde som deteksjonen skal brukes på
	Requested pixel size	Pikselstørrelse som deteksjonen skal utføres med. Høyere verdier er sannsynligvis raskere, men kan være mindre nøyaktige; sett $\leq 0$ for å bruke full bildeoppløsning.
<b>Nucleus parameters</b>	Background radius	Radius for bakgrunnsestimering, bør være større enn største kjerneradius, eller $\leq 0$ for å slå av bakgrunnssubtraksjon.
	Median filter radius	Radius av medianfilter brukes til å redusere bildetekstur (jevner intensitetsvibrasjoner)
	Sigma	sigma-verdi for gaussisk filter som brukes til å redusere støy; økning av verdien stopper fragmentering av kjerner, men kan redusere nøyaktigheten av grenser.
	Minimum area	detektert-kjerner med et areal $<$ minimumsareal vil bli forkastet.
	Maximum area	detektert-kjerner med et areal $>$ maksimumsareal vil bli forkastet.
<b>Intensity parameters</b>	Threshold	Intensitetsterskel – detekterte kjerner må ha en gjennomsnittlig intensitet $\geq$ terskel
	Max background intensity	Hvis bakgrunnsradius $> 0$ , vil detekterte kjerner som forekommer på en bakgrunn $>$ maksimal bakgrunnsintensitet bli forkastet.
	Split by shape	Del sammenslåtte oppdagede kjerner basert på form (rundhet)
	Exclude DAB	Avmerk denne, hvis områder med høy DAB-farging ikke skal betraktes som kjerner; nyttig hvis DAB farger cellemembraner.
<b>Cell parameters</b>	Cell expansion	Omfanget som detekterte kjerner skal utvides med for å tilnærme hele cellearealet.
	Include cell nucleus	Hvis cell expansion brukes, inkluderer/ekskluder eventuelt kjernene i de detekterte cellene.
<b>Intensity threshold parameters</b>	Score compartment	Velg intensitetsmålingen til terskel
	Threshold 1+, 2+, 3+	Lav, moderat og høy terskel for positiv intensitet
	Singel threshold	Avmerk denne, hvis en binær kategorisering av positiv og negativ kreves

Etter at positiv celledeteksjon ble utført og objektene ble korrekt identifisert, ble de eksakte deteksjonsresultatene visualisert i vinduet «annotations». Denne boksen, som er avbildet i Figur 12 gir en tydelig og oversiktlig presentasjon av resultatene. Spesifikt ble det oppdaget totalt 539 objekter (celler) i det valgte rektangulære området i Figur 6 og 10. Videre viste resultatene som presenteres i Figur 12 at 23 % av disse oppdagede cellene var klassifisert som positive, og dette gir verdifull innsikt i kvaliteten på de positive cellene som er identifisert.

Key	Value
Image	2, CD68
Name	Image
Num Detections	539
Num 1+	45
Num 2+	37
Num 3+	42
Num Negative	415
Positive %	23.0056

**Figur 12.** Annotasjonsdata for det rektangulære området i Figur 6 og 10, som er knyttet til spyttkjertelvev til pasient 2 og ble farget med anti-CD68. Totalt ble 539 deteksjonsceller identifisert, hvorav 45 var klassifisert som svakt positive (1+, gult), 37 som moderat positive (2+, oransje), 42 som sterkt positive (3+, rødt) og 415 som negative (blått). Den totale andelen av positive celler var 23 %.

Videre ble spyttkjertelvev fra både pasienter og kontroller analysert på samme måte som det rektangulære området i Figur 6. Analysemetoden involverte utførelse av positiv celledeteksjon på markerte regioner av interesse (ROI) i spyttkjertelvevet, som ble behandlet parallelt. ROI ble identifisert ved manuelt å markere dem med QuPaths «Brush»-verktøy. Dette definerte området som skulle undersøkes, mens andre områder ble ekskludert fra analysen, se Figur 10.

### 3.4.3 CELLEKLASSIFISERING

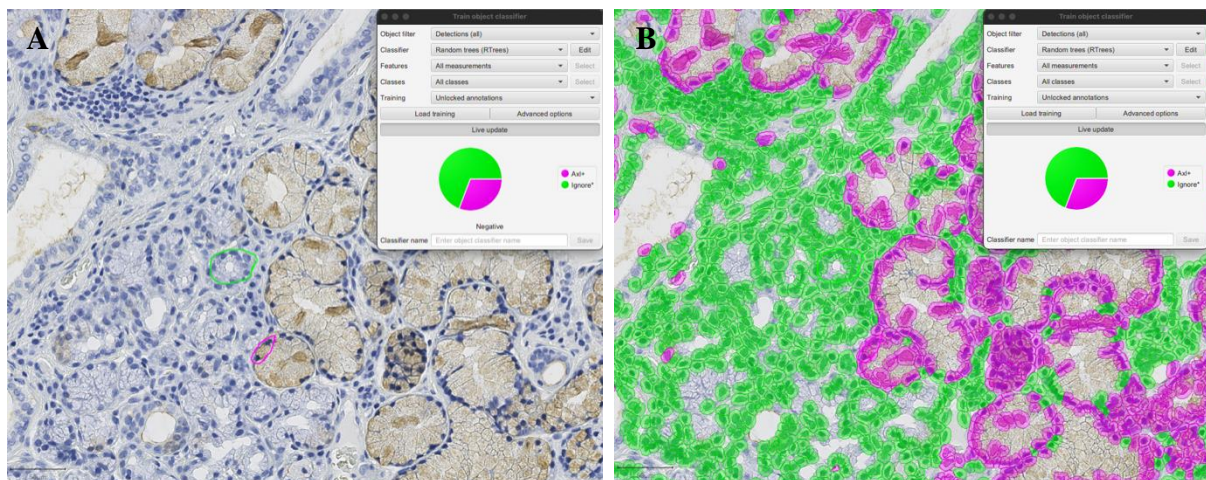
I QuPath kan objekter klassifiseres, og standard klassifisering for alle objekter er null i utgangspunktet, noe som betyr at de er «uklassifiserte». Klassifisering ble utført kun på vevsbilder farget for Axl, ettersom det var vanskelig å bruke bare intensiteten ved positiv celledeteksjon for å detektere positive celler for Axl. Klassifiseringen ble manuelt satt for ulike celler som enten «Axl+» eller «Ignore (Axl-)» ved hjelp av det relativt nylige tillegget i QuPath kalt «*Ignored\* classification*». Dette inkluderte også målinger på samme måte som positiv celledeteksjon.

For å sikre at regionene som var tegnet i Figur 13 kun inkluderte Axl+ celler og ekskluderte andre celletyper som ikke skulle bidra til konvensjonell skåring av målingen, ble de nøye tegnet. QuPath ble trent opp til å skille mellom ulike celletyper. Kommandoen «Analyser ▸

*Celledeteksjon* ▶ *Positiv celledeteksjon*» ble brukt for å identifisere celler på samme måte som positiv celledeteksjon som tidligere ble beskrevet. Men her var det ikke nødvendig å se på fargeintensiteten, da hensikten her var kun å trene QuPath til å gjenkjenne celler. Celler ble deretter oppdaget innenfor hver ROI, og klassifisering ble satt ved å markere flere positive celler for Axl og høyreklikke på valgte regionen og velge klassen som «Axl+», se Figur 13.

For å lage klassifiseringen og se hvor godt QuPath kunne skille cellene, ble kommandoen «*Classify* ▶ *Object classification* ▶ *Train object classifier*» brukt. Ved å trykke på «*Live update*» ville man trene opp en klassifisering som QuPath deretter ville bruke på alle cellene i bildet. Etter at klassifikatoren var tilstrekkelig nøyaktig, ble den lagret ved å oppgi et navn og trykke på «*Save*». Dette tillot å laste den igjen senere via «*Classify* ▶ *Object classification* ▶ *Load object classifier*» for alle andre deteksjoner.

Resultattabeller ble deretter generert på samme måte som positiv celledeteksjon, og denne klassifiseringen ble lagret og brukt på alle andre vevssnittet som ble farget for Axl.



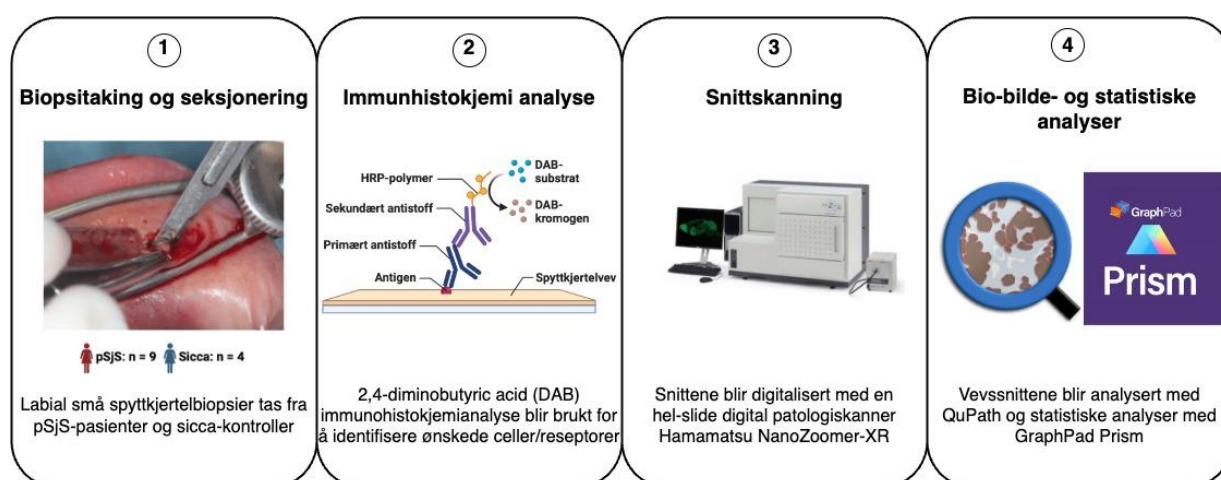
**Figur 13. Treningscelleklassifisering med liveoppdatering.** **A** Celler ble identifisert ved hjelp av celledeteksjon og deretter klassifisert som enten «Axl+» med rosa farge eller «Ignore (Axl-)» med grønn farge. **B** Grønne objekter (celler) er negative for Axl, mens rosa objekter er positive. Sirkeldiagrammet viser forholdet mellom disse to celletypene i det aktuelle ROI. En treningsprosess ble brukt for å forbedre nøyaktigheten i klassifiseringen, og resultatene ble brukt på alle andre vevssnittet som ble farget for Axl.



### 3.5 DATAANALYSE

For å identifisere hvilken immuncelle som uttrykker TAM-reseptorene, ble vevsbildene analysert side om side, slik som vist i figurene 24 – 27. De genererte annoteringsmålingene for hvert vevssnitt ble eksportert som CSV-filer og identifisert med anonymisert pasient-ID. Forbehandling av rådata ble gjort med Microsoft Excel før de ble kategoriseret og overført til den statistiske analyse programvaren, GraphPad Prism v9.5.1, La Jolla, CA, USA.

Non-parametriske tester ble valgt pga. den begrensede utvalgsstørrelsen og med et svært lite antall observasjoner, 9 pasienter i denne studien, kan det være rimelig å anta at dataene ikke er normalfordelte. Konvensjonelle parametriske tester forutsetter normalfordelte data, og kan gi unøyaktige resultater når denne antagelsen ikke er oppfylt. Derfor ble Mann-Whitney U-test brukt for å analysere immuncelle- og TAM-uttrykksnivåer i pasient- og kontrollgrupper. Testen ble også brukt for å sammenligne forskjellene mellom de to uavhengige gruppene med hensyn til en kontinuerlig variabel. Forskjeller ble ansett som statistisk signifikante for p-verdier  $\leq 0,05$ . Alle grafgenereringer ble også utført ved hjelp av GraphPad Prism v9.5.1 (La Jolla, CA, USA). I figur 14 presenteres en skjematisk illustrasjon av arbeidsflyten i denne studien.



**Figur 14. Skjematisk illustrasjon av arbeidsflyten for laboratorieeksperimentene og bildeanalysen.**

Biopsiproedyre og seksjonering ble utført på en kohort bestående av 9 pasienter med primært Sjögrens syndrom og 4 kontroller med sicca-symptomer. Først ble immunhistokjemiske protokoller benyttet for farging av vevssnittene fra spyttkjertelvev. Heretter ble vevssnittene avbildet og digitalisert ved hjelp av Hamamatsu NanoZoomer-XR. Bildeanalyse og kvantifisering av positive celler ble utført ved bruk av QuPath (v 0.3.2), basert på pikselintensitetstærskler og uttrykket av CD-markører. Annotasjonsmålingene ble eksportert som CSV-filer og videre behandlet i Excel-regneark. For å analysere uttrykksnivåer av immunceller og TAM-reseptorer i pasient- og kontrollgrupper, ble Mann-Whitney U-test anvendt med et signifikansnivå satt til p-verdi  $\leq 0,05$ . Statistiske analyser og grafer ble utført ved hjelp av GraphPad Prism (v 9.5.1). Figuren laget med <https://www.biorender.com>.

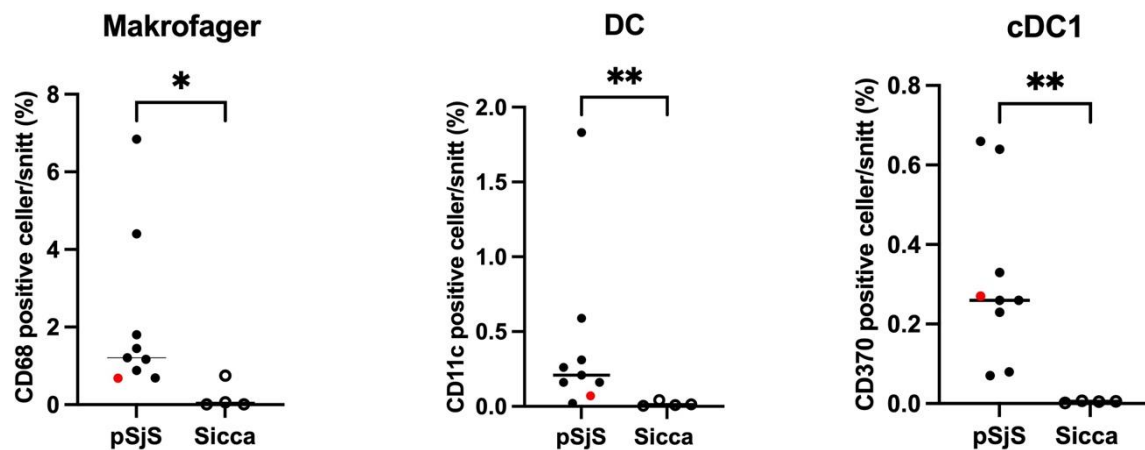
## **4. RESULTATER**

Vev fra små labiale spyttkjertler fra pasienter med pSjS og kontrollgruppen med sicca symptomer ble undersøkt med 7 forskjellige antistoffer (Tabell 4) for å identifisere utvalgte immunceller, TAM-reseptorer og deres ligand. Sammenligninger av frekvenser og lokasjoner av immunceller (makrofager, DC, cDC1), TAM-reseptorer (Tyro3, Mer, Axl) og liganden for TAM-reseptorene (Gas6) ved IHC avslørte forskjeller mellom pasientene og kontrollene.

### **4.1 IMMUNCCELLER I PASIENTER OG SICCA KONTROLLER**

Immuncelleprofilen i vev fra små labiale spyttkjertler av pasienter med pSjS og sicca-kontroller ble sammenlignet ved markering av immunceller ved bruk av IHC. Frekvensen av makrofager, DC og cDC1 i spyttkjertel ble analysert for å undersøke eventuelle forskjeller mellom disse to gruppene. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av Mann-Whitney U-test. Resultatene viste de høyeste uttrykksnivåene for immuncellene makrofager, etterfulgt av dendrittiske celler og type 1 konvensjonelle dendrittiske celler som hadde lignende uttrykksnivåer (Figur 15). Uttrykksnivået av alle tre immuncellene var signifikant høyere hos pSjS-pasienter sammenlignet med sicca-kontroller (Figur 15).

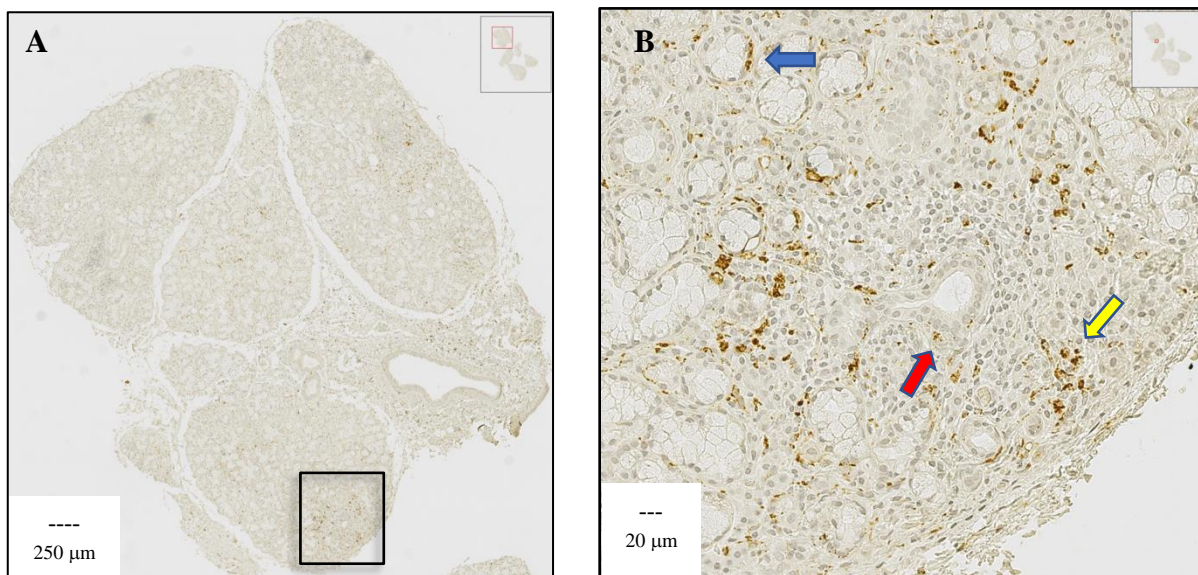
Det ble påvist en vesentlig signifikant høyere frekvens av makrofager (CD68+ celler) i spyttkjertler av pSjS-pasienter sammenlignet med sicca-kontroller ( $p = 0,0112$ , 96 % KI av forskjell = 0,457 til 4,391) (Figur 15). Dessuten hadde DC (CD11c+ celler) og cDC1 (CD11c+ og CD370+ celler) en signifikant høyere frekvens i spyttkjertler av pSjS-pasienter sammenlignet med sicca-kontroller ( $p = 0,0056$ , 96 % KI av forskjell = 0,028 til 0,586 og  $p = 0,0028$ , 96 % KI av forskjell = 0,073 til 0,638 henholdsvis) (Figur 15). Resultatene av analysen viste også en stor variasjon i den positive prosentandelen av immunceller innenfor hver analysegruppe.



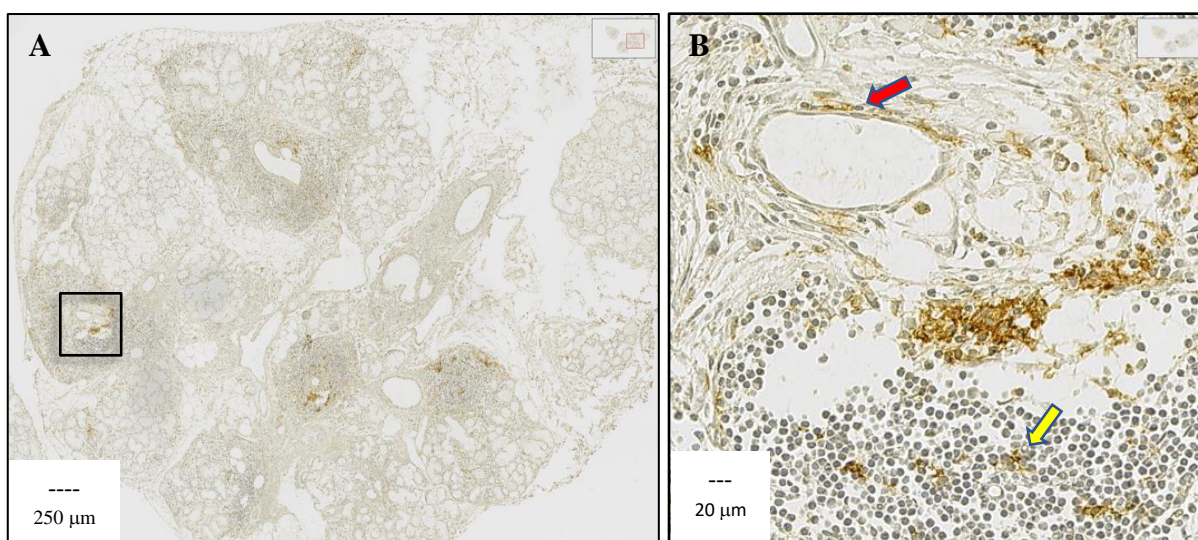
**Figur 15. Sammenligning av uttrykksnivåene til immunceller i vev fra små labiale spyttkjertler til pSjS-pasienter og sicca-kontroller.** Uttrykksnivåer av makrofager, dendritiske celler (DC) og type 1 konvensjonelle dendritiske celler (cDC1) ble identifisert ved IHC og målt ved annotasjonsmålinger i QuPath. Alle sammenligninger ble gjort ved bruk av uparet Mann-Whitney U-test og forskjeller ble ansett som statistisk signifikante for  $p \leq 0,05$ , med signifikante verdier som ble indikert som  $* \leq 0,05$  og  $** \leq 0,01$ . Medianer er angitt. Dataene representerer pSjS-pasienter ( $n = 9$ ) merket med utfylte sirkler og sicca-kontroller ( $n = 4$ ) merket med tomme sirkler. Hver sirkel i diagrammene representerer en pasient i denne sammenhengen og den røde sirkelen representerer Pasient 1 med  $FS < 1$ .

Begge gruppene av pasienter med pSjS og sicca-kontroller viste mononukleære celleinfiltrater i spyttkjertelvev. Frekvensen av makrofager var høyest i infiltrater, som indikerte økt forekomst av makrofager i begge gruppene. Celler som utrykte CD11c og CD370 var også tilstede hovedsakelig i relasjon til de fokale infiltratene. Disse immuncellene ble bemerket som enkeltceller spredt utover det kjertelparenkymet eller som celler samlet som en «cluster» aggregert i lymfepiteliale lesjoner rundt de utførselsganger. Figur 16-18 gir en detaljert visning av lokasjonen til disse immuncellene.

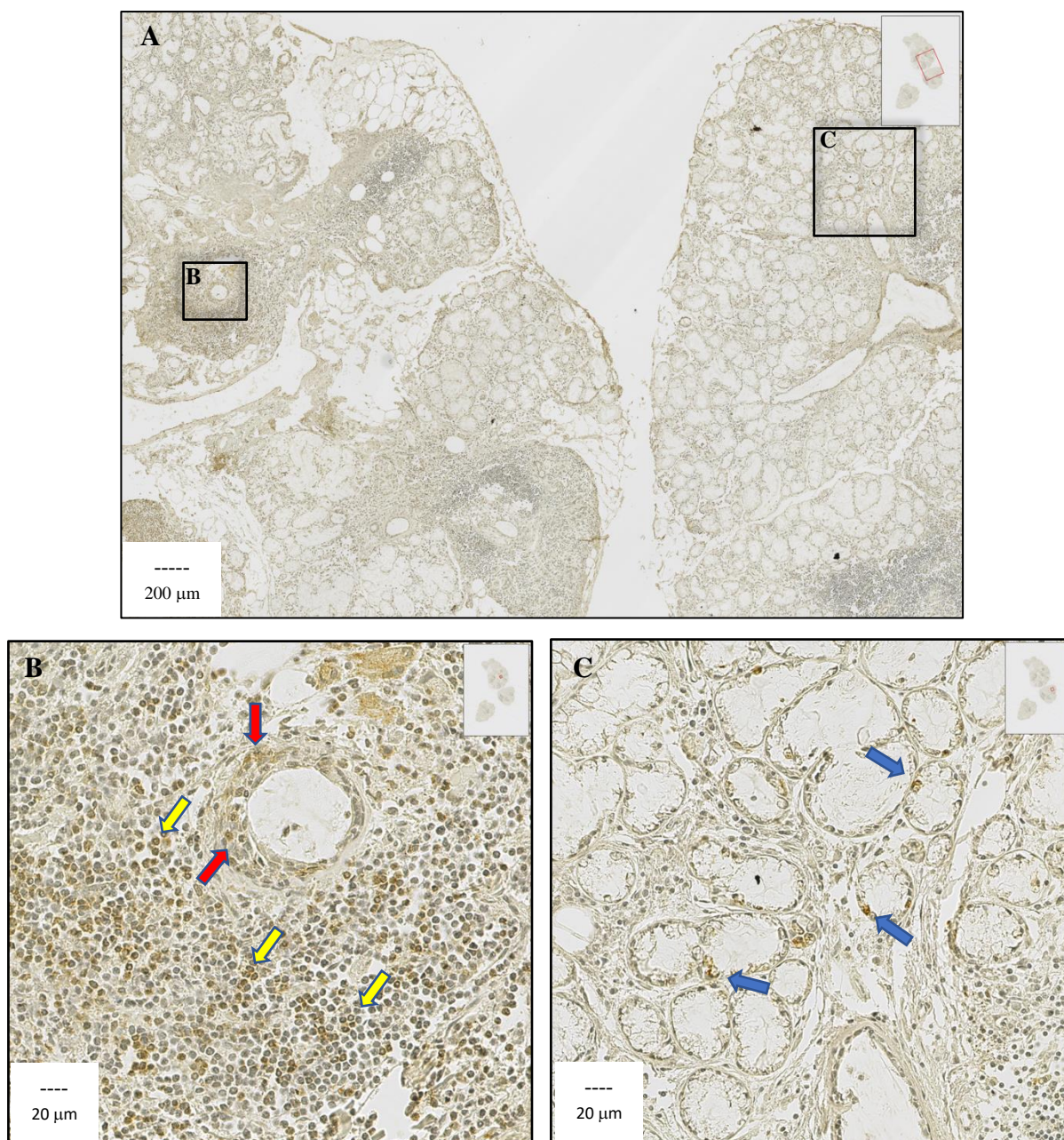
I kontrast til dette viste sicca-kontrollene bare et begrenset antall områder med makrofager og dendritiske celler, primært lokalisert i fokale infiltrater. Positive celler for CD68, CD11c og CD370 var også konstatert som enkeltceller og cluster, men var mer sparsomt distribuert i spyttkjertelvev hos sicca-kontroller.



**Figur 16. CD68 uttrykksmønster i labial spyttkjerteltev fra pSjS-pasient.** Makrofager (CD68+ celler) er hovedsakelig lokalisert i infiltrater (gul pil), utførselsganger (rød pil) og acinier (blå pil). **A** Labial spyttkjerteltev fra pasient 5 med FS = 1. **B** Forstørret bilde av det markerte området i **A**. Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av alle de små spyttkjertlene til Pasient 5 som ble hentet ut under biopsitakningen.



**Figur 17. CD11c uttrykksmønster i labial spyttkjerteltev fra pSjS-pasient.** Dendritiske celler (CD11c+) er hovedsakelig lokalisert i infiltrater (gul pil) og utførselsganger (rød pil). **A** labial spyttkjerteltev fra pasient 2 med FS = 4. **B** forstørret bilde av det markerte området i **A**. Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av alle de små spyttkjertlene til pasient 2 som ble hentet ut under biopsitakningen.



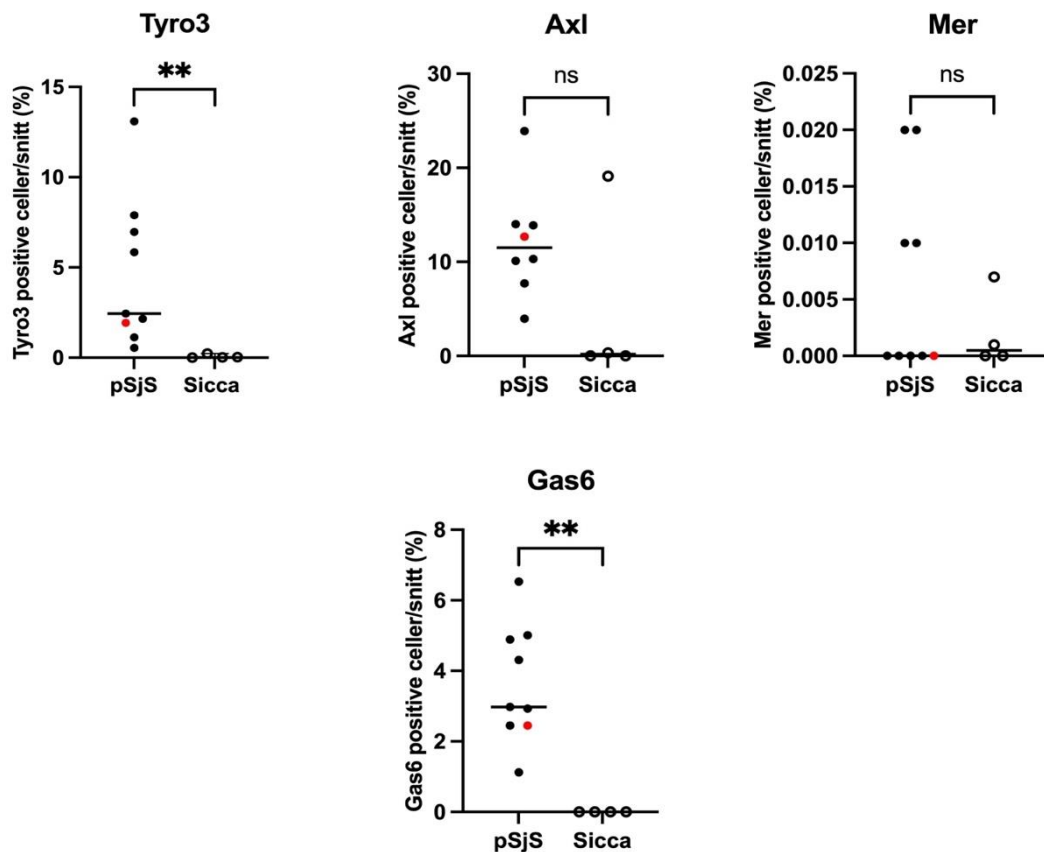
**Figur 18. CD370 uttrykksmønster i labial spyttkjertelvev fra pSS-pasient.** Konvensjonelle dendritiske celler type 1, cDC1, (CD11c+ og CD370+ celler) er hovedsakelig lokalisert i infiltrater (gul pil), utførselsganger (rød pil) og acinier (blå pil). **A** Labial spyttkjertelvev fra pasient 2 med FS = 4. **B** og **C** Forstørret bilde av de markerte områdene i **A**. Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av alle de små spyttkjertlene til pasient 2 som ble hentet ut under biopsitakningen.

## 4.2 TAM-RESEPTORER I PASIENTER OG KONTROLLER

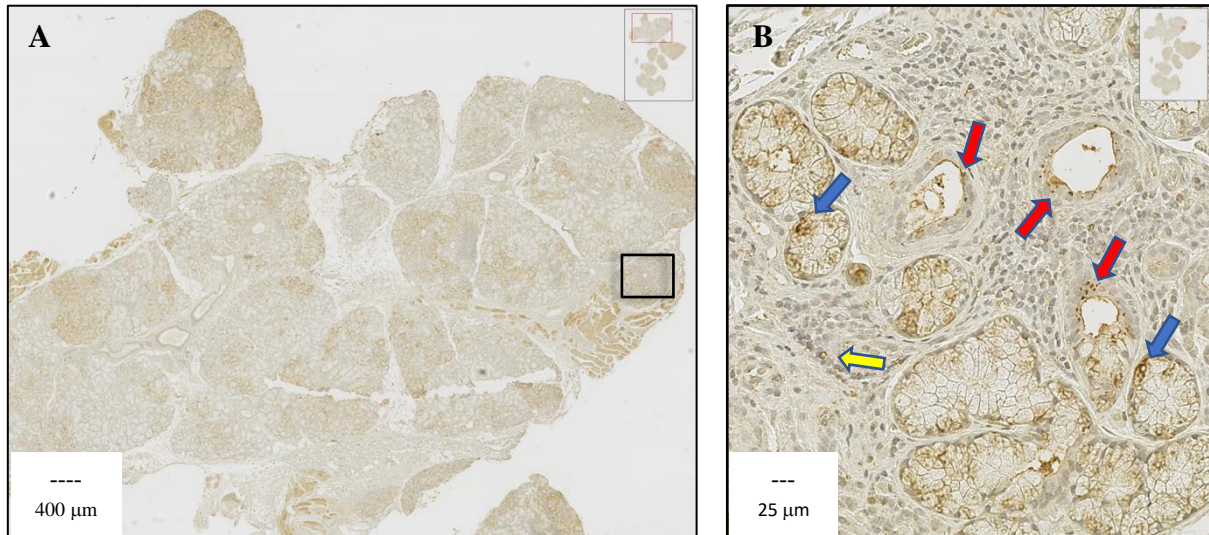
Deretter ble uttrykks-nivåene av TAM-reseptorer og Gas6 analysert i vevsprøver fra små labiale spyttkjertler hos pSjS-pasienter og sicca-kontroller. Det ble observert betydelige forskjeller i frekvensen av TAM-reseptorer og liganden mellom disse analysegruppene. Generelt ble de høyeste uttrykksnivåene påvist for Tyro3 ( $p = 0,0028$ , 96 % KI av forskjell = 0,896 til 7,885), etterfulgt Gas6 ( $p = 0,0028$ , 96 % KI av forskjell = 2,447 til 5,010) som hadde lignende uttrykksnivåer, mens det laveste uttrykksnivået ble sett for Mer ( $p = 0,7357$ , 96 % KI av forskjell = -0,007 til 0,019) (Figur 19). Selv om uttrykket av Axl ikke var statistisk signifikant, ble det observert et høyere uttrykk av Axl hos pSjS-pasienter enn sicca-kontrollene ( $p = 0,1535$ , 96 % KI av forskjell = -6,404 til 14,000). Det er verdt å merke at dataspredningen for Axl var ganske høy, og det nådde ikke statistisk signifikans. Resultatene av analysen viste også en stor variasjon i den positive prosentandelen av TAM-reseptorer innenfor hver analysegruppe.

Immunhistokjemiske analyser av spyttkjertelvev fra pasienter med pSjS avdekket utbredt tilstedeværelse av TAM-reseptorene Tyro3, Axl, Mer samt deres ligand Gas6.

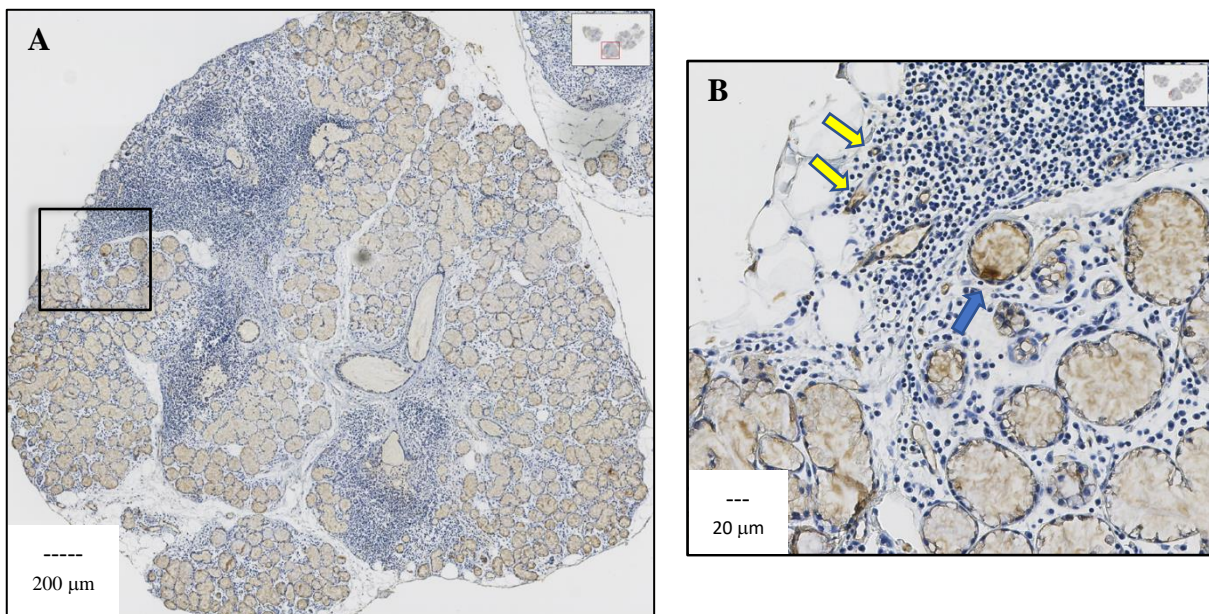
Analyse av vevsprøver viste utbredt tilstedeværelse av Tyro3-reseptoren i både enkeltceller og cluster i både intralobulære- og interlobulære regioner i spyttkjertelvevet. Tyro3-reseptoren var primært uttrykt i acinære celler og betennelsesinfiltrater, moderat i utførselsganger, og i mindre grad i bindevev (Figur 20). Axl-reseptoren var hovedsakelig lokalisert i acinære strukturer, så vel som i mellomstykker (intercalated ducts), sekretrør (striated ducts) og samlerør (extralobular ducts), med en mindre andel som ble observert i betennelsesinfiltrater. Det ble i tillegg observert både enkeltceller og cluster med uttrykk av disse Axl-reseptorene (Figur 21). Mer-reseptoren ble utelukkende påvist i acinære celler, herunder mukøse, serøse og blandede (seromukøse og mukoserøse) acinier. Denne reseptoren ble identifisert i celler innenfor acinære strukturer, og det ble observert variasjon i uttrykksnivå, der noen celler viste lavt uttrykk og andre viste høyt uttrykk (Figur 22). Gas6, liganden for TAM-reseptorene, ble påvist i alle delene av spyttkjertelvevet, både uttrykt i enkeltceller og cluster. Disse var tilstede i sammenheng med inflammatoriske infiltrater, sekretoriske endestykker (acinier), mellomstykker, sekretrør og samlerør hos pasienter med pSjS (Figur 23).



**Figur 19. Sammenligning av uttrykksnivåene til TAM-reseptorene og liganden Gas6 i labial spyttkjertelvev hos pSjS-pasienter og sicca-kontroller.** Uttrykksnivåene av Tyro3, Axl, Mer og Gas6 ble identifisert ved IHC målt ved digital analyse i QuPath-programvaren. Alle sammenligninger ble gjort ved bruk av uparet Mann-Whitney U-test og forskjeller ble ansett som statistisk signifikante for  $p \leq 0,05$ , med signifikante verdier som ble indikert som  $* \leq 0,05$  og  $** \leq 0,01$ . Medianer er angitt. Dataene representerer pSjS-pasienter ( $n = 9$ , bortsett fra Axl med  $n = 8$ ) merket med utfylte sirkler og sicca-kontroller ( $n = 4$ ) merket med tomme sirkler. Hver sirkel i diagrammene representerer en pasient i denne sammenhengen og den røde sirkelen representerer Pasient 1 med FS < 1.

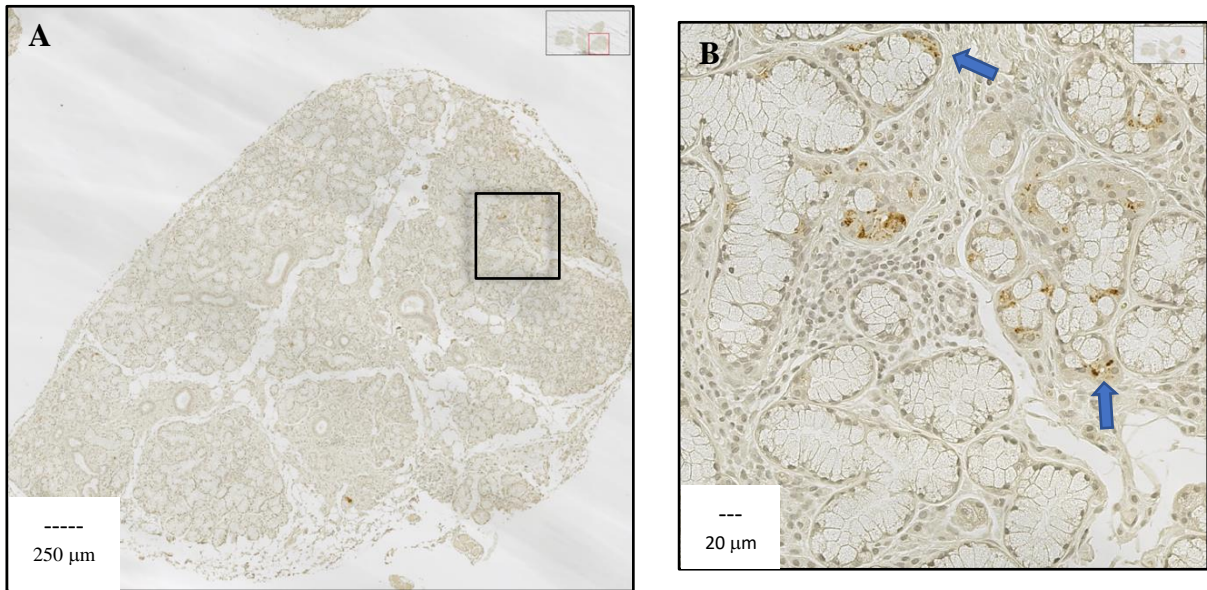


**Figur 20: Tyro3 uttrykksmønster i labial spyttkjerteltev fra pSjS-pasient.** Tyro3 ble hovedsakelig uttrykt i acinier (blå pil), infiltrater (gul pil) og utførselsganger (rød pil). **A** Labial spyttkjerteltev fra pasient 3 med FS = 2 og GC+. **B** Forstørret bilde av det markerte området i **A**. Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av alle de små spyttkjertelene til pasient 3 som ble hentet ut under biopsitakningen.

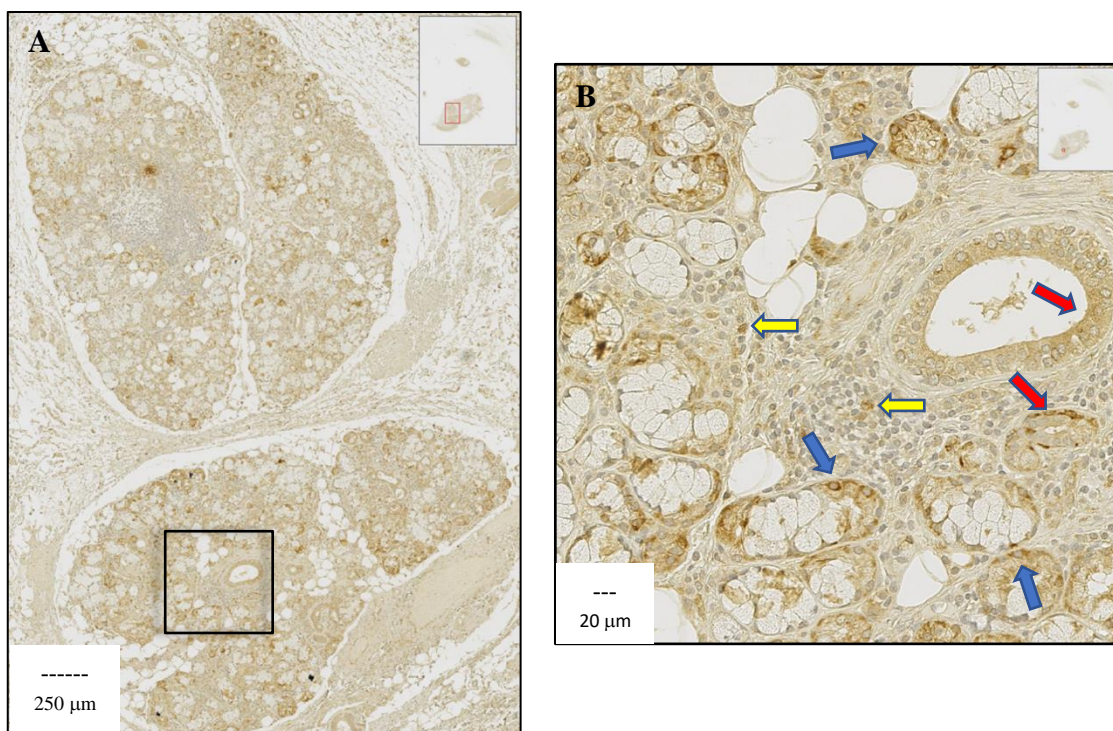


**Figur 21: Axl uttrykksmønster i labial spyttkjerteltev fra pSjS-pasient.** Axl ble hovedsakelig uttrykt i acinier (blå pil), infiltrater (gul pil). **A** Labial spyttkjerteltev fra pasient 2 med FS = 4. **B** Forstørret bilde av det markerte området i **A**. Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av alle de små spyttkjertelene til pasient 2 som ble hentet ut under biopsitakningen. Hematoxylin-kromogen representerer en bedre farge her pga. nyere immunhistokjemisk farging i vår 2023.





**Figur 22: Mer uttrykksmønster i labial spyttkjertelvev fra pSjS-pasient.** Mer ble hovedsakelig uttrykt i acinier (blå pil). **A** Labial spyttkjertelvev fra pasient 5 med FS = 1. **B** Forstørret bilde av det markerte området i **A**. Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av alle de små spyttkjertlene til pasient 5 som ble hentet ut under biopsitakningen.



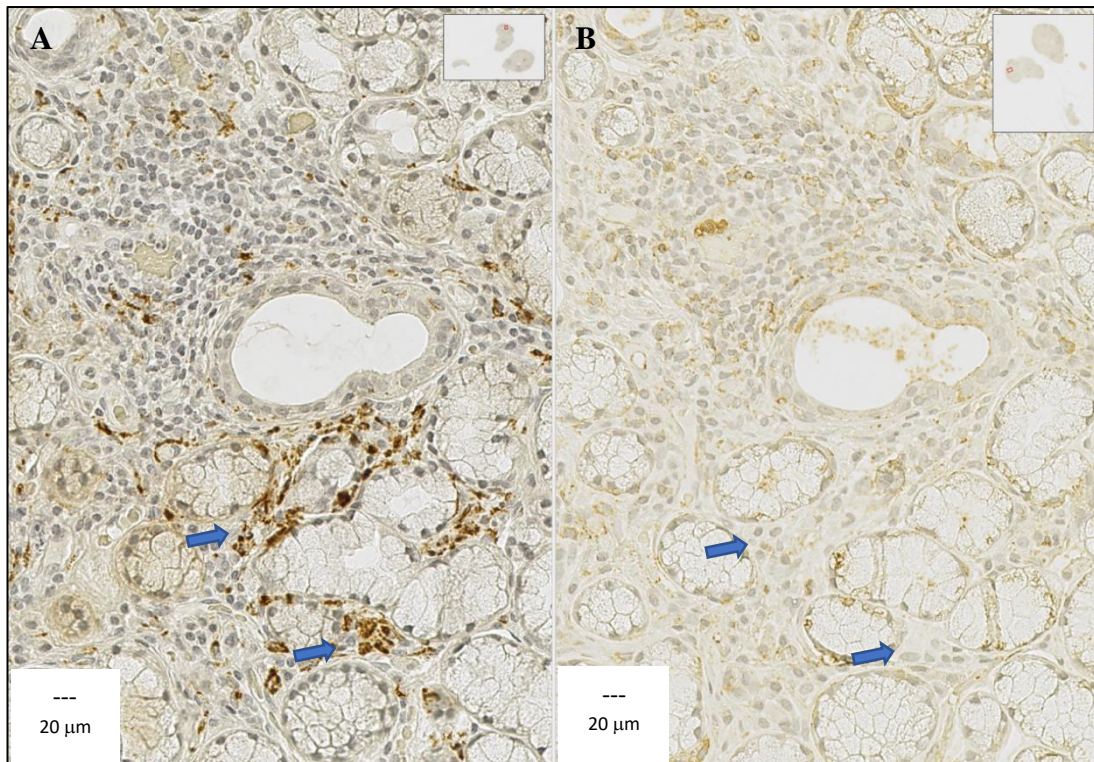
**Figur 23: Gas6 uttrykksmønster i labial spyttkjertelvev fra pSjS-pasient.** Gas6 ble hovedsakelig uttrykt i acinier (blå pil), infiltrater (gul pil) og utførselsganger (rød pil). **A** Labial spyttkjertelvev fra pasient 7 med FS = 9 og GC+. **B** Forstørret bilde av det markerte området i **A**. Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av alle de små spyttkjertlene til pasient 7 som ble hentet ut under biopsitakningen.

### 4.3 IMMUNCELLER SOM UTTRYKKER TAM-RESEPTORER

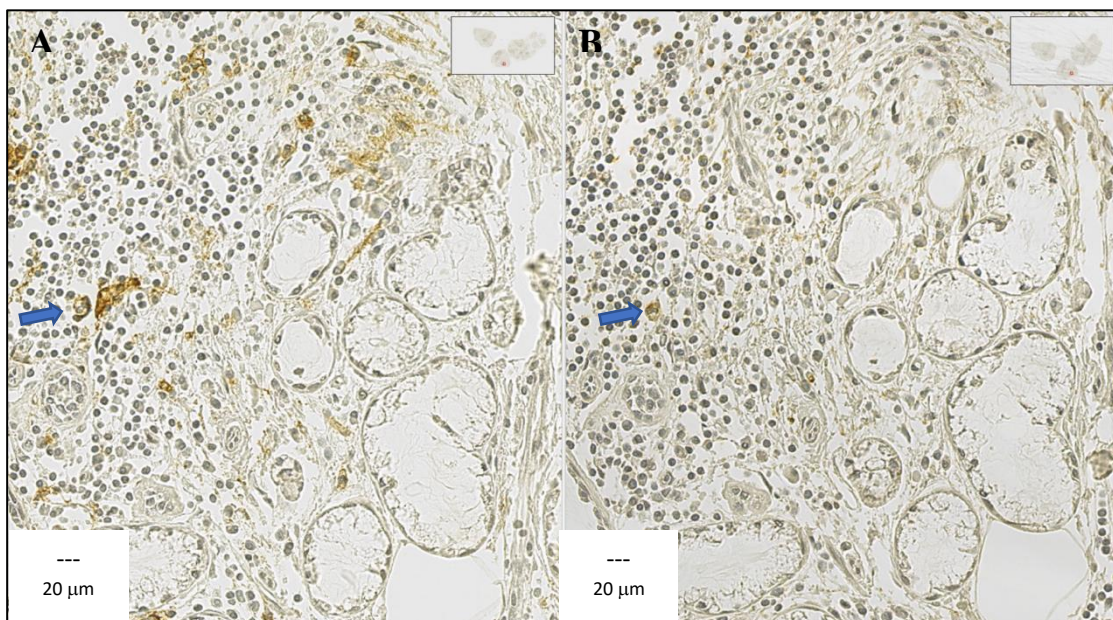
IHC og QuPath ble også tatt i bruk til å undersøke uttrykket av TAM-reseptorer og deres ligand på utvalgte immuncelletyper, nemlig makrofager, DC og cDC1. Dette tillot en karakterisering av overflateuttrykket av disse reseptorene på et cellulært nivå. Det ble observert betydelig variasjon i uttrykket av TAM-reseptorer mellom individene i hver analysegruppe, og både immuncellene og TAM-reseptorene viste lavere uttrykksnivå i kontrollgruppen sammenlignet med pasientgruppen. Videre ble det observert manglende uttrykk av TAM-reseptorene i immuncellene til kontrollgruppen, sannsynligvis pga. det generelt lavere uttrykksnivået av både immuncellene og TAM-reseptorene i denne gruppen.

For å identifisere hvilke immunceller som uttrykker TAM-reseptorene, ble vevsbildene analysert side om side, slik som demonstrert i Figur 24 – 27. Pga. utfordringene med å identifisere de samme cellene på tvers av flere snitt, ble det ikke funnet flere eksempler som bekrefter at en celle som er positiv for en bestemt type immuncelle også er positiv for en spesifikk TAM-reseptor. Dessverre var det ikke mulig å finne sammenlignbare områder for vevssnittene farget med Gas6 for å undersøke hvilke immunceller som uttrykker denne liganden. Pga. det svært lave uttrykksnivået av Mer, var det heller ikke mulig å finne sammenlignbare områder blant vevssnittene. Imidlertid er det inkludert bilder som viser immunceller som ikke uttrykker en bestemt TAM-reseptor. Dette er vist i Figur 24 og 26 som viser at makrofager hverken viser Tyro3 eller Axl. Det vil dermed indikere at Tyro3 eller Axl må uttrykkes av en annen celle. Videre ble det funnet at DC i det minste uttrykker Tyro3 som er vist i Figur 25 og 27.

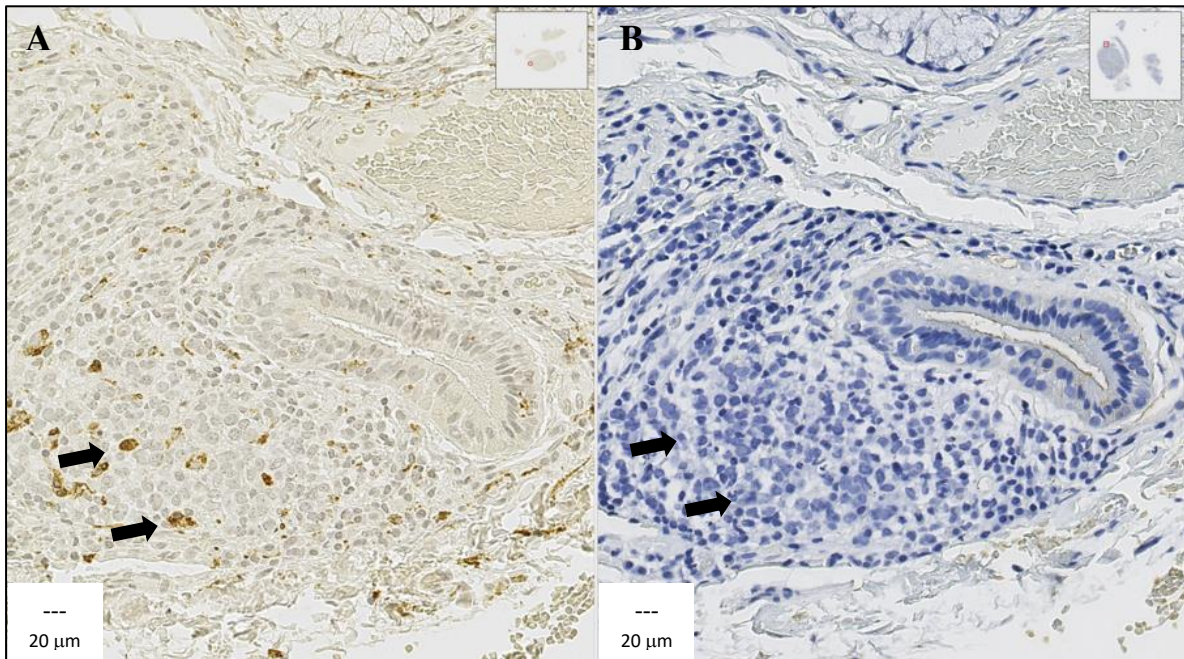
Det observeres en tendens hos noen pasienter at acinier enten har uttrykt Tyro3 eller Axl ved sammenligning av de samme strukturene fra hver farging. Dette fenomenet er presentert i Figur 28 for visuell referanse.



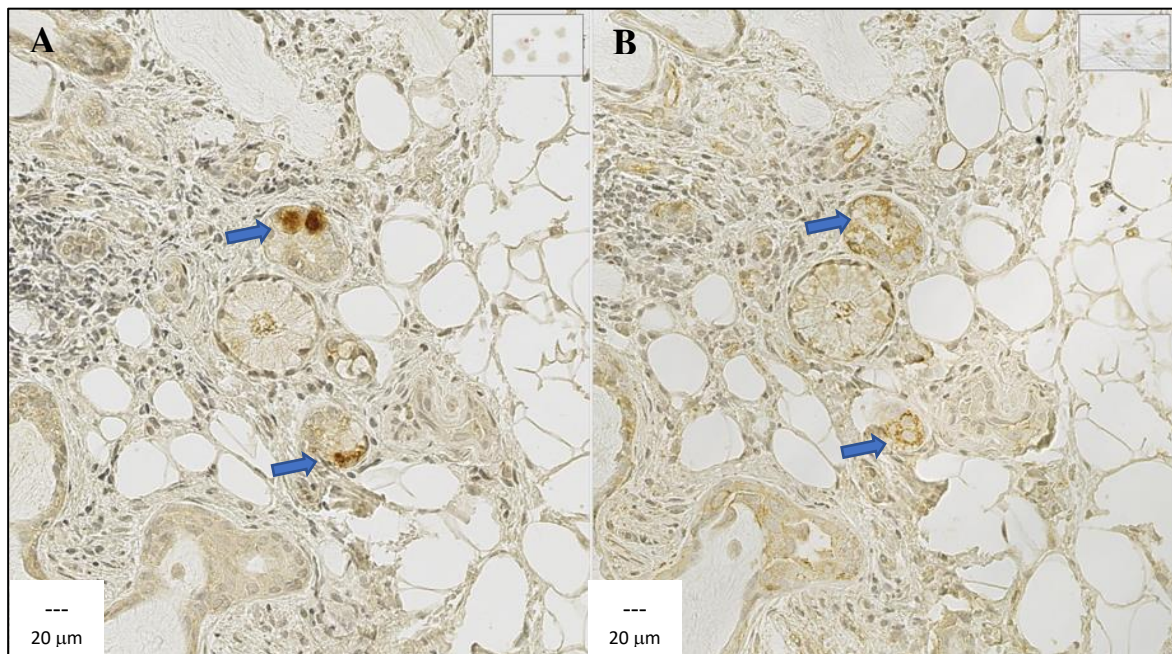
**Figur 24.** DAB-fargete seksjoner av spyttkjertelvev fra pSjS-pasient 6 med FS = 2 og GC+ viser (A) vevsseksjon farget for CD68 og (B) vevsseksjon farget for Tyro3. De blå pilene indikerer at CD68+ makrofager i (A) ikke uttrykker Tyro3 i (B). Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av de små spyttkjertlene til pasient 6 som ble hentet ut under biopsitakningen.



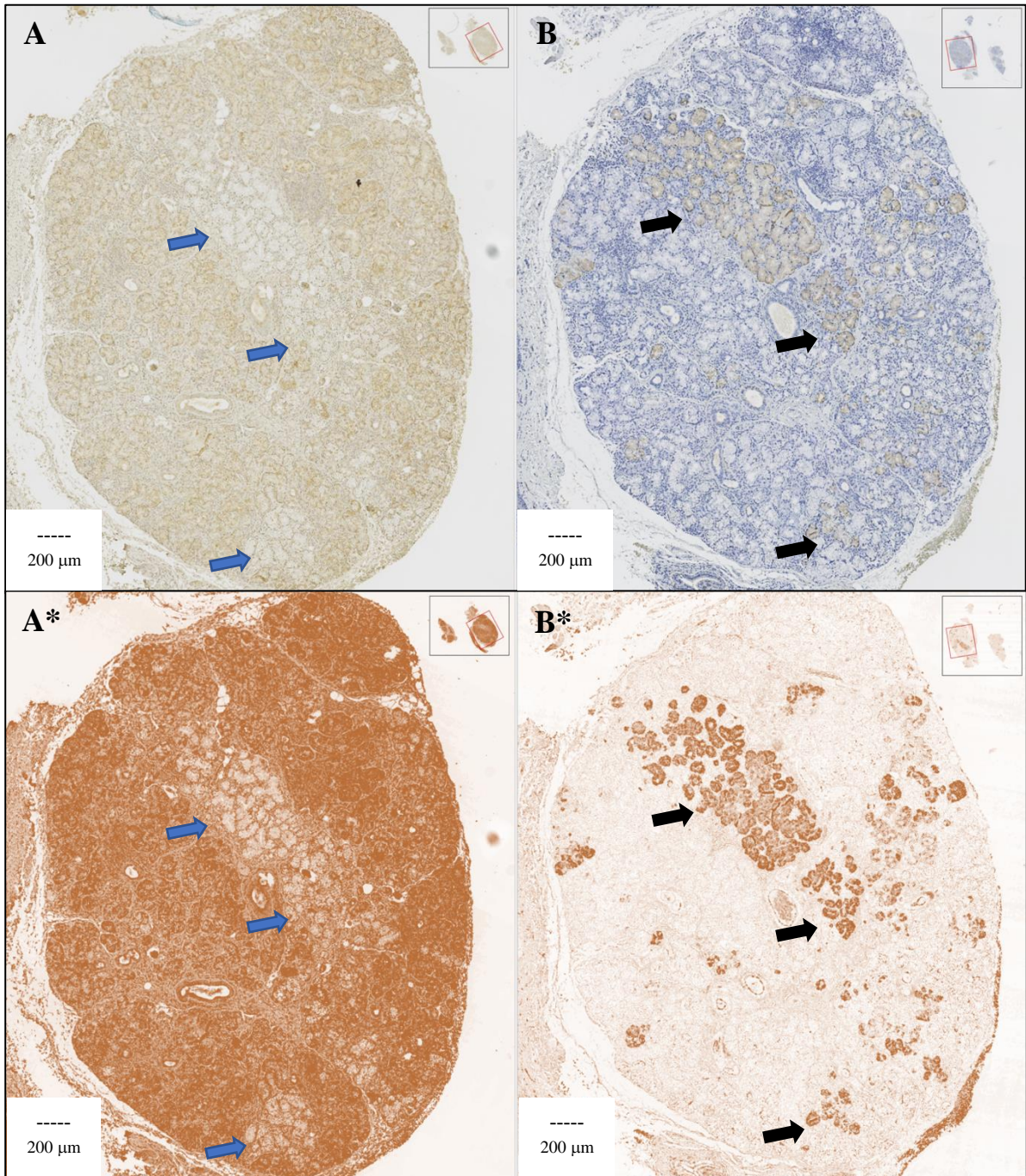
**Figur 25.** DAB-fargete seksjoner av spyttkjertelvev fra pSjS-pasient 2 med FS = 4 viser (A) vevsseksjon farget for CD11c og (B) vevsseksjon farget for Tyro3. Den blå pilen indikerer at CD11c+ dendrittiske celler i (A) uttrykker Tyro3 i (B). Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av de små spyttkjertlene til pasient 2 som ble hentet ut under biopsitakningen.



**Figur 26.** DAB-fargete seksjoner av spyttkjertelvev fra pSjS-pasient 8 med FS = 3 viser (A) vevsseksjon farget for CD68 og (B) vevsseksjon farget for Axl. De blå pilene indikerer at CD68+ makrofager i (A) ikke uttrykker Axl i (B). Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av de små spyttkjertlene til pasient 8 som ble hentet ut under biopsitakningen.



**Figur 27.** DAB-fargete seksjoner av spyttkjertelvev fra pSjS-pasient 4 med FS = 3 viser (A) vevsseksjon farget for CD370 og (B) vevsseksjon farget for Tyro3. De blå pilene indikerer at CD11c+ og CD370+ konvensjonelle dendrittiske celler type 1 i (A) uttrykker Tyro3 i (B). Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av de små spyttkjertlene til pasient 4 som ble hentet ut under biopsitakningen.



**Figur 28.** DAB-fargete seksjoner av spyttkjertelvev fra pSjS-pasient 8 med FS = 3. **(A)** originalbilde av vevsseksjon farget for Tyro3 og **(B)** originalbilde av vevsseksjon farget for Axl. **(A\*)** DAB-bilde av **(A)** og **(B\*)** DAB-bilde av **(B)**. DAB-bildene ble inkludert i figuren å muliggjøre enklere visualisering av DAB+/- acinære strukturer. De blå pilene i **(A)** og **(A\*)** viser Tyro3-negative acinære celler, mens svarte piler i **(B)** og **(B\*)** viser Axl-positive acinære celler i etterfølgende vevssnitt fra samme pasient. Dette viser at Axl og Tyro3 kan muligens ha ulik uttryksprofil i acinære celler i spyttkjertelvevet. Øverst til høyre i figurene presenteres et oversiktsbilde av alle de små spyttkjertelene til pasient 8 som ble hentet ut under biopsitakningen.

## 5. DISKUSJON

Formålet med denne studien var å øke forståelsen av opprydningsproblemer i spyttkjertlene hos pSjS-pasienter. Dette ble oppnådd ved å evaluere graden av TAM-reseptoruttrykk på immunceller i spyttkjertlene fra pSjS-pasienter sammenlignet med sicca-kontroller. Tidligere undersøkelser fra vår forskningsgruppe har fokusert på uttrykket av TAM-reseptorer i perifere mononukleære celler fra blod (PBMC) (80). Det ble valgt å bruke immunmarkører for immunceller som viser høyt uttrykk for TAM-reseptorer og involveres i fagocytose av apoptotiske celler, nemlig makrofager, DC og cDC1 (76). Disse cellene viste også høyest uttrykksnivå for de fleste reseptorene i perifert blod (80). Tidligere forskning har ikke undersøkt uttrykket av TAM-reseptorer i spyttkjertelvev hos pasienter med Sjögrens syndrom.

### 5.1 ANALYSE AV UTTRYKKNIVÅENE AV TAM-RESEPTORER

Nedbryting av vevshomeostase i eksokrine kjertler er en av de viktigste faktorene til den selvoppretholdende autoimmune syklusen som opprettholdes hos pasienter som lider av pSjS. Tap av TAM-signalering kan spille en sentral rolle i å orkestrere denne ubalansen. Tidligere forskning har avdekket at spyttkjertelepitelceller undergår Fas-Fas ligand-mediert apoptose hos pSjS-pasienter (86). Studier med NOD-SCID musemodeller har også bekreftet økt apoptose av kjertelepitelceller ved Fas-Fas ligand-veien (87). Dersom effektiv fjerning av apoptotiske celler ikke forekommer, kan dette resultere i opphopning av slike celler i vevet. Studier har vist at i perifert blod hos pasienter med pSjS, fører denne opphopningen til aktivering av den nekrotiske banen, som kan ytterligere forverre det inflammatoriske og autoimmune miljøet karakteristisk for pSjS-pasienter (88). Defekter i TAM-uttrykket hos de infiltrerende fagocytene kan derfor være direkte knyttet til vevsdestruksjon og kjerteldystrofi.

I denne studien ble uttrykksnivåene til TAM-reseptorene og Gas6 undersøkt i vevsprøver fra små labiale spyttkjertler hos pasienter med pSjS og sicca-kontroller. Det ble observert høyere uttrykksnivåer av alle TAM-reseptorene og Gas6 i spyttkjertlene til pSjS-pasienter sammenlignet med kontroller. Imidlertid var det kun de høyere nivåene av Tyro3 og Gas6 som også var statistisk signifikante. Funnet antyder at TAM-reseptorene uttrykkes i spyttkjertelvev av pSjS-pasienter. Tidligere studier har vist at TAM-reseptorer kan hemme proinflammatoriske cytokiner og stimulere produksjonen av anti-inflammatoriske cytokiner og ikke minst regulering av adaptiv immunitet (89). Funnet indikerer derfor at høyere uttrykk av TAM-reseptorer i spyttkjertelvevet til pSjS-pasienter kan være en respons på behovet for å redusere den inflammatoriske belastningen i vevet ved effektiv fjerning av apoptotisk celledetritus.

For å sammenligne uttrykksnivåene av TAM-reseptorer med den tidligere studien utført av Sarkar *et al.*, (80) er det av betydning å notere at mRNA-nivåene i PBMC hos pSjS-pasienter viste et lavere uttrykk av Tyro3 og Mer sammenlignet med friske kontroller. På protein-nivå var det høyest uttrykk av Mer, spesielt i intermedierende og ikke-klassiske monocytter, mens det var lavere uttrykk i klassiske monocytter. Uttrykket av alle tre TAM-reseptorene var lavere i pasienter enn i kontroller i de fleste celletypene som ble analysert, med unntak av B-celler som hadde litt økt uttrykk av Tyro3 og ikke-klassiske monocytter og cDC2, som hadde litt økt uttrykk av Mer. Videre ble det ikke påvist noen signifikante forskjeller i plasmakonsentrasjoner av løselige TAM-reseptorer (sTyro3, sAxl, sMer) og Gas6 mellom pasienter og kontroller. Selv om forskjellene ikke var statistisk signifikant, ble det observert en økende plasmanivåer av sMer og sGas6 hos pSjS-pasienter (80). Basert på alle utførte analyser, antydte forskningsgruppen en mulig defekt/avvik i fjerning av apoptotiske celler hos pasienter. Disse funnene var i overensstemmelse med resultatene fra en annen studie utført av Qin *et al.*, (90).

Sammenligningen av funnene i foreliggende studie indikerer en forskjell i uttrykksnivåene av TAM-reseptorer mellom spyttkjertler og plasma/PBMC hos pasienter med pSjS og tilhørende kontrollgrupper. Det er viktig å merke at foreliggende studien benyttet personer med sicca-symptomer som kontroller, mens studien av Sarkar inkluderte friske individer som kontrollgruppe (80). Det høyere uttrykksnivået av TAM-reseptorene i spyttkjertlene tyder på en mulig forhøyet involvering av disse reseptorene i spyttkjertelvevet hos pSjS-pasienter, spesielt med hensyn til responsen på apoptotiske celledbris og reduksjon av inflammatorisk belastning (77). På den annen side kan det lavere mRNA-uttrykksnivået av TAM-reseptorer i PBMC indikere en potensiell dysregulering eller forstyrrelse i produksjon av disse reseptorene hos pSjS-pasienter (90).

Den observerte forskjellen i uttrykksnivåene av TAM-reseptorer mellom spyttkjertlene og PBMC/plasma kan være forklart av flere faktorer, herunder lokal betennelse og autoimmun aktivitet i spyttkjertelvevet, samt mulige forstyrrelser i den systemiske sirkulasjon av løselige TAM-reseptorer hos pasientene (80, 90).

Dysregulering eller forstyrrelse av TAM-reseptorer hos pasienter med pSjS kan medføre betydelige konsekvenser. Primært, kan det resultere i svekket fjerning av apoptotiske celler, hvilket gir opphav til akkumulering og inflammatoriske prosesser (77). Sekundært, kan det øke risikoen for økt autoimmun aktivitet og bidra til utvikling eller forverring av autoimmune reaksjoner. Til sist, kan dysreguleringen påvirke den inflammatoriske responsen, potensielt underminere immunsystemets evne til å kontrollere betennelse og dermed føre til kronisk betennelse og vevsskade (77).

Samlet sett indikerer disse funnene en kompleks regulering og involvering av TAM-reseptorer blant pasienter med pSjS. Videre forskning er nødvendig for å forstå de underliggende mekanismene og potensielle kliniske implikasjoner av disse forskjellene i uttrykket av TAM-reseptorer i ulike vevs- og væskebestanddelene.

Tidligere studier har hovedsakelig fokusert på uttrykket av TAM-reseptorer på transkripsjonsnivå eller i plasma. Imidlertid har forskningsgruppen utforsket uttrykksfrekvensen av TAM-reseptorer på forskjellige cellepopulasjoner i PBMC ved bruk av flow cytometri, noe som ikke tidligere er blitt undersøkt (80). Fagocytceller i immunsystemet, spesielt monocytt-/makrofaglinjer og DC, har vist seg å ha det høyeste uttrykket av TAM-reseptorer (78, 80).

I den tidligere studien viste DC-undergrupper høyeste uttrykksnivå for Axl, mens monocytene hadde høyest positivitet for Mer (80). Dette er den første rapporten som dokumenterer en slik variasjon i reseptoruttrykket blant forskjellige fagocyttopopulasjoner hos mennesker. Tidligere rapporter har vært basert på forskning utført i KO-musemodeller, f.eks. Seits *et al.*, som demonstrerte at Mer er sentral for makrofagenes apoptotiske evner, mens DC først og fremst er avhengige av Axl og Tyro3 for sine apoptotiske funksjoner (77, 91). Funnene i foreliggende studien støtter disse funnene, der det ble påvist at makrofager ikke uttrykker Axl. Dette indikerer at en annen celletype må uttrykke denne reseptoren i spyttkjertlene, mens dendritiske celler i subgruppen cDC1 uttrykker Tyro3.

Det er bemerkelsesverdig at det er ingen signifikant forskjell i uttrykksnivåene av Mer mellom pasienter og kontroller. Dette funnet antyder at makrofager muligens har vanskeligheter med å uttrykke sine Mer-reseptorer tilstrekkelig. Mer-reseptoren hadde det høyeste uttrykksnivået i PBMC hos pSjS-pasienter (77, 80), mens reseptoren hadde det laveste uttrykksnivået i spyttkjertelvevet til pSjS-pasienter. På den annen side hadde Tyro3 det laveste uttrykksnivået i PBMC hos pasienter (77, 80), mens det høyeste uttrykksnivået i spyttkjertlene til pSjS-pasienter. Dette indikerer at DC hadde høyere uttrykksnivå, men fraværet av Mer påvirker efferocytose negativt i spyttkjertelvevet. Dette skjer samtidig som makrofager viste det høyeste uttrykket av de utvalgte immuncellene (Figur 15), og samtidig er makrofager kjent for å være blant de tidligste immuncellene i infiltratene i spyttkjertlene til NOD-mus, før ankomsten av DC, B- og T-lymfocytter (92). Dessuten har makrofaginfiltrasjon vært positivt korrelert med sykdomsprogresjon (93). Disse tre reseptorene samarbeider ofte for å regulere cellulære prosesser, men Mer-reseptoren fungerer som en regulator for de andre to reseptorene og bidrar



til å opprettholde balansen mellom deres aktivering og deaktivering (94, 95). Uten Mer-reseptoren kan det oppstå en ubalanse i denne prosessen, noe som kan føre til dysfunksjon i cellulære prosesser som er avhengig av Tyro3 og Axl (77, 96). Det er verdt å merke seg at Tyro3 og Axl fortsatt kan utføre noen av sine funksjoner i fravær av Mer-reseptoren, men denne mangelen kan påvirke deres effektivitet og nøyaktighet. Derfor kan en mangel på Mer ha konsekvenser for cellulære og immunresponsfunksjoner (94, 95). Mer-reseptoren, men ikke Tyro3 og Axl, ser ut til å ha størst bidrag til oppreguleringen av hepatocytvekstfaktor, som er en viktig faktor for vevsreparasjon. Mer-reseptoren er derfor mer ansvarlig for å skape et antiinflammatorisk og reparerende miljø rundt områder med apoptose og for å gjenopprette vevshomeostase (97). I denne studien har ikke funksjonen og/eller aktivitetsnivået til TAM-reseptorer blitt undersøkt. Imidlertid er forståelsen av både funksjonen og aktivitetsnivået til cellene som uttrykker TAM-reseptorer, samt funksjonen til selve TAM-reseptorene, viktig for fremtidige undersøkelser.

Tilsvarende gjelder for PBMC, der Mer-reseptoren hadde høyere uttrykksnivå, mens Tyro3/Axl-reseptorene hadde lavere nivå hos pSjS-pasienter, noe som kan svekke efferocytosen i blodet (91). Det er derfor essensielt å merke seg at Axl og Tyro3 er kritiske for DC-mediert efferocytose, mens Mer er avgjørende for makrofag-efferocytose. Samlet sett indikerer funnene at uttrykket av TAM-reseptorer varierer mellom ulike vevs- og cellepopulasjoner hos pSjS-pasienter, noe som kan ha implikasjoner for apoptotisk cellefjerning og immunresponsen i sykdommen.

Et annet interessant funn i denne studien viser mulige forskjeller i uttrykket av Axl og Tyro3 i acinære celler i spyttkjertelvevet. Som vist i Figur 28, observerte vi at noen acinære celler hovedsakelig uttrykte Axl, mens andre hovedsakelig uttrykte Tyro3 hos noen pasienter. Acinære celler som uttrykker Axl kan ha en spesifikk rolle i apoptotisk celleopprydding og regulering av inflammatoriske prosesser, mens de som uttrykker Tyro3 kan ha en annen funksjon i disse prosessene. Det er viktig å merke seg at på grunn av det begrensede antallet pasienter og bruk av IHC-metoden, kan vi ikke fastslå disse observasjonene. De er kun inkludert som funn i denne studien og krever ytterligere forskning for å kunne bekreftes. Det er allikevel viktig å merke seg at kompleksiteten og mangfoldet i uttrykket av TAM-reseptorer i acinære celler fortsatt er et aktivt forskningsområde (77), og ytterligere studier vil bidra til å avklare de spesifikke subpopulasjonene av acinære celler og deres respektive roller i efferocytose og inflammatorisk respons.

Studien har påvist en betydelig variasjon i uttrykket av TAM-reseptorene blant hver av analysegruppene, pasienter og kontroller. Enkelte pasienter kan ha høyere uttrykk av bestemte TAM-reseptorer. En av sicca-kontrollene har vist høyere uttrykk av Axl i spyttkjertelvevet enn de andre kontrollene, og til og med høyere enn noen av pasientene (Figur 19). Det er derfor behov for videre forskning for å undersøke om det er en årsakssammenheng mellom høyere uttrykksnivå av TAM-reseptorer og funksjonaliteten. Kliniske data fra sicca-kontrollene er dessverre ikke tilgjengelig, for det ville være av interesse å undersøke hvilke kliniske egenskaper denne kontrollgruppen har. Basert på analysen av de kliniske dataene til de inkluderte pasientene i Tabell 3, ser det ikke ut til å være noen signifikant sammenheng mellom TAM-reseptorene og kliniske variabler som FS, GC-lignende strukturer, stimulert salivasekresjon, SSA, SSB og RF. Dette ble konkludert etter en regresjonsanalyse der disse faktorene ble analysert mot TAM-reseptor prosentandeler. Det faktum at det ikke var noen klar korrelasjon mellom uttrykksnivåene av TAM-reseptorene og kliniske opplysninger tyder på at andre faktorer kan spille en rolle i sykdomsutviklingen, f.eks. genetiske faktorer eller andre biomarkører som påvirker sykdomsprogresjonen. Selv om det ikke ble funnet noe klar korrelasjon mellom uttrykksnivåene av TAM-reseptorer og kliniske opplysninger, kan dette funnet likevel gi viktig informasjon om funksjon av TAM-reseptorene i SjS. Videre forskning kan undersøke om det er subgrupper av pasienter med spesifikke sammensetninger av TAM-reseptorer som har mer alvorlige former for sykdommen. Det er også viktig å merke seg at heterogeniteten til pSjS kan gjøre det utfordrende å tolke resultater fra forskjellige studier og sammenligne uttrykksnivåene av TAM-reseptorer mellom forskjellige grupper av pasienter. Dette understreker også behovet for standardiserte protokoller og større samarbeid på tvers av forskingsgrupper for å bedre forstå sykdommen. På samme måte er diagnostisering og klassifisering av pasienter utfordrende. Pasient 1 ble først klassifisert som pSjS-pasient med FS = 2, men ble senere omklassifisert til ikke-pSjS-pasient med FS < 1, pga. at spyttkjertelen ble skåret ned i blokken. Remisjonspapirene indikerte at pasienten oppfylte verken de nye eller gamle diagnosekriteriene for Sjögrens syndrom (SjS), men hadde fått en klinisk diagnose basert på symptomer som tørrhet i øynene og munnen, samt lave tårernivåer i prøvene. Selv om diagnosen senere ble endret, er det viktig å anerkjenne at det kan være utfordrende å stille en klinisk diagnose av SjS på grunn av mangfoldet av symptomer og varierende alvorlighetsgrad blant pasientene. Dette viser behovet for bedre diagnostiske og klassifiseringskriterier.

Den vanskelige diagnostiseringen og klassifiseringen av pSjS er et viktig tema i feltet, og det er flere faktorer som kan påvirke en nøyaktig diagnose. En av de viktigste faktorene er

mangelen på standardiserte diagnostiske og klassifiseringskriterier, noe som kan føre til variasjoner i diagnostisering og klassifisering fra kliniker til kliniker. Dette kan igjen føre til misdiagnostisering eller feilklassifisering av pasienter, som vist i tilfellet med Pasient 1. En annen faktor som kan påvirke diagnosen er mangelen på spesifikke biologiske markører for sykdommen. Selv om det finnes en rekke kliniske og laboratoriemessige tester som kan brukes for å diagnostisere og klassifisere pSjS, er det ingen spesifikke tester som kan bekrefte sykdommen med 100% sikkerhet. Dette gjør det utfordrende å stille en nøyaktig diagnose, spesielt i tilfeller der pasienten har milde eller atypiske symptomer. Det er også viktig å merke seg at pasienter med pSjS kan ha en rekke andre autoimmune sykdommer som kan overlape med symptomene på pSjS, og dette kan gjøre diagnosen enda mer komplisert. For å forbedre diagnostiseringen og klassifiseringen av pSjS er det derfor behov for bedre standardiserte diagnostiske og klassifiseringskriterier, samt utvikling av spesifikke biologiske markører for sykdommen.

## **5.2 STUDIENS BEGRENSNINGER**

I dette prosjektet ble det anvendt IHC som metode for å identifisere immunceller og uttrykk av TAM-reseptorer. Metoden ble valgt fordi den er enkel, rask og rimelig, og kan utføres med standardiserte reagenser og vanlige laboratorieutstyr. Dette gjør den tilgjengelig og kostnadseffektiv. IHC enkeltfarging gir høy oppløsning i vev, og gir mulighet for identifisering av subcellulære lokaliseringer og morfologiske trekk ved proteinuttrykket. Dette gir presis lokaliseringinformasjon om proteinuttrykket i forhold til vevets anatomiske strukturer (98). Teknikken gir også permanent farging av vevet som kan analyseres igjen ved senere anledninger og eventuelt skannes og analyseres i digitale programvarer. I tillegg er det enkelt å sammenligne resultater med andre studier som bruker IHC, noe som gjør det mulig å validere resultater på tvers av studier. Valget av IHC som metode i dette prosjektet var derfor basert på dens praktiske fordeler og nytteverdi for studien av immunceller og TAM-reseptorer i spyttkjertelvev.

Etter å ha utført analyser av snittene ved hjelp av immunhistokjemi og skanning, observerte vi begrensninger ved IHC-metoden. Pga. disse begrensningene kan ikke IHC betraktes som en fullstendig adekvat metode for å undersøke uttrykket av TAM-reseptorer i immunceller. Det er av betydelig viktighet å påpeke at enkeltfarging på etterfølgende snitt ikke utgjør den mest hensiktsmessige metoden for å evaluere uttrykk av TAM-reseptorer på immunceller. Dette

skyldes at det kan være vanskelig å identifisere de samme cellene på tvers av flere snitt, og det kan også være utfordrende å se om det er samme celle som er positiv for en type immuncelle, også er positiv for en bestemt TAM-reseptor. Det kan eksempelvis forekomme at en celle som viser positivitet for makrofager på ett snitt, ikke nødvendigvis er synlig på et annet snitt som er farget for Axl. Konsekvensen av dette er at man kan risikere å overse vesentlige sammenhenger mellom TAM-reseptoruttrykk og immuncellefenotyper.

IHC-teknikken kunne ha vært mer egnet for dette formålet ved å benytte en dobbel-/trippelmerkingsteknikk. En fordel med dobbel- eller trippel farging inkluderer mer pålitelige resultater sammenlignet med enkeltfarging på etterfølgende snitter (99). Dette skyldes bruk av flere antistoffer samtidig på samme vevssnitt, noe som gjør det enklere å identifisere flere celler. I tillegg kan denne metoden være tidsbesparende og mer kostnadseffektivt. Imidlertid kan utfordringene med å optimalisere protokollen og tolke overlappende signaler og uspesifikke bindinger øke risikoen for falske positive resultater. Simultan anvendelse av flere antistoffer kan potensielt føre til kryssbindinger, noe som kan medføre tap av spesifisitet og pålitelighet i resultatene, ettersom det kan gi opphav til interferens mellom antistoffene (99). Digitale analysemetoder som QuPath kan brukes til å analysere resultatene, men det krever avansert analyse og er tidskrevende. Selv om dobbel- eller trippel farging i IHC kan være en nyttig teknikk for å undersøke uttrykket av TAM-reseptorer i immunceller, krever det forsiktig validering og kontroll for å sikre nøyaktige resultater.

Immunofluorescens (IF)-teknikken kan være et kraftig verktøy for å undersøke immuncelleuttrykk av TAM-reseptorer i spyttkjertelvev. Fordeler inkluderer høy sensitivitet og evnen til å visualisere både lokalisering og kvantifisering av proteiner i vevsprøver. Imidlertid kan det være utfordrende å optimalisere protokollen for å sikre spesifisitet og unngå uspesifikk binding, inkludert bleaching. Det oppstår når fluoroforer mister sin fluorescens under eksitasjon av lys. Dette kan redusere signalet og gjøre det vanskeligere å visualisere proteinuttrykk i vevsprøver. Det kan også være en utfordring å tolke og analysere resultatene når man arbeider med flere farger. Immunofluorescens kan dessuten være tidkrevende og kostbart, og det kan være nødvendig med betydelig ekspertise og avansert utstyr for å utføre analysen. Det er også viktig å merke seg at resultatene kan påvirkes av faktorer som vevsfixering og antigenutvinning, og at det kan være utfordrende å arbeide med små vevsprøver eller når vevet har høy autofluorescens (100). Samlet sett kan immunofluorescens-teknikken være en kraftig metode for å undersøke immuncelleuttrykk av TAM-reseptorer i spyttkjertelvev, men det

krever forsiktig validering og kontroll for å sikre nøyaktige og pålitelige resultater, inkludert optimalisering av protokollen for å unngå bleaching (101).

Flow cytometri er en rask og følsom teknikk for å analysere flere parametere samtidig og identifisere forskjellige celletyper i en prøve. Fordelene ved å bruke denne teknikken inkluderer høy hastighet, høy følsomhet og muligheten til å analysere flere celler samtidig sammenlignet med IHC og IF teknikker (102). Flow cytometri er en lysbasert teknikk som kvantifiserer og karakteriserer celler basert på spesifikke markører. Sammenlignet med IHC, hvor tolkningen av resultatene kan være subjektiv og avhengig av observatørens erfaring og skjønn, gir flow cytometri vanligvis mer objektive og kvantitative resultater (102). Ulempene inkluderer behovet for enkeltcelle suspensjon, noe som kan være utfordrende når man arbeider med vevsprøver. En potensiell ulempe med bruk av flow cytometri for dette prosjektet er at fremstilling av en enkelcellesuspensjon fører til tap av informasjon om den opprinnelige lokaliseringen av cellene i vevet (102). F.eks. kan det være umulig å vite om en makrofag som er identifisert i en enkelcellesuspensjon, befant seg midt i et inflammatorisk infiltrat eller langt ute i periferien av vevet.

Hyperion, Imaging Mass Cytometry system, gir muligheten for en mer detaljert og høyoppløselig visualisering av immuncellepopulasjoner og uttrykk av TAM-reseptorer i spyttkjertelvev (103). Det er imidlertid viktig å merke seg at bruk av Hyperion er forbundet med høyere kostnader og krever spesialkompetanse for analysere de store datamengdene som produseres av systemet (103). Bruken av Hyperion-teknologien gir betydelige fordeler ved sin evne til samtidig fargelegging og deteksjon av et bredt spekter av markører på ett vevssnitt og kan benyttes på flere pasienter samtidig i samme seanse (103). Denne avanserte tilnærmingen muliggjør identifisering og karakterisering av ulike celletyper som uttrykker TAM-reseptorer, samt studier av interaksjoner og forhold mellom disse celletypene. Ved å kombinere markører for TAM-reseptorer med markører for andre celletyper og apoptotiske markører, kan man undersøke nærliggende celletyper. Dette gir muligheten til å studere potensielle sammenhenger mellom apoptotiske celler og uttrykket av TAM-reseptorer. Dette gir verdifull innsikt i mikromiljøet og komplekse celleinteraksjoner i spyttkjertelvevet hos pasienter med pSjS. Hyperion-teknologien tillater også inkludering av markører for funksjonelle molekyler, som phosphorylte proteiner. Dette gir en dypere forståelse av både funksjonen og aktivitetsnivået til cellene som uttrykker TAM-reseptorer, samt funksjonen til selve TAM-reseptorene. En slik integrert tilnærming gir en mer helhetlig kartlegging av signalveier og biologiske prosesser som

er involvert i patogenesen og funksjonen til spyttkjertelvevet. For å oppnå pålitelige resultater med prosjektets formål er Hyperion bedre egnet for å undersøke uttrykket av TAM-reseptorer i detalj og analysere deres rolle i sykdomsutvikling i spyttkjertler.

QuPath gir mulighet for automatisert celledeteksjon ved bruk av ulike algoritmer. Digitalisering av vevsprøver blir stadig mer relevant innen patologisk diagnostikk. Flere patologiske avdelinger, inkludert avdeling for patologi ved Haukeland Universitetssjukehus, hvor jeg skannet vevsprøvene i dette prosjektet, har begynt å implementere digital patologi i diagnostikk (104-106). Ved å kombinere digitale analyseverktøy (ImmunoRatio, Fiji, QuPath o.l.) og tilhørende algoritmer kan analysen av vevsprøver automatiseres, noe som reduserer arbeidsbelastningen og øker effektiviteten (107-109).

Bruken av positiv celledeteksjon og celleklassifisering i QuPath har positive effekter. Algoritmene i QuPath er designet for nøyaktig gjenkjenning av positive celler og klassifisering basert på morfologi- eller fargeegenskaper. Dette gir pålitelige resultater og reduserer samtidig subjektivitet i tolkningen (110). Positiv celledeteksjon, celleklassifisering og annotasjonsmålinger gir også kvantitative data, som andelen positive celler i forhold til totalt antall celler. Dette bidrar til å avdekke mønstre eller avvik i prøvene (84).

Det er viktig å være oppmerksom på at ytelsen til positiv celledeteksjon og celleklassifisering avhenger av valgte algoritmer. Ingen algoritme er perfekt, og det kan forekomme unøyaktigheter eller feil i resultatene. Det er derfor nødvendig å optimalisere algoritmene ved hjelp av treningsdata og grundig verifisere resultatene. Det er også viktig å være oppmerksom på muligheten for falske positive og falske negative resultater. Slike feil kan skyldes variasjoner i farging og celleutseende, samt kompleksiteten i vevsstrukturer (110).

En begrensning med vår studie er det lave antallet deltakere, med 9 pasienter med primært Sjögrens syndrom og 4 kontroller med sicca-symptomer. Pasientgruppen med pSjS i denne kohorten viser en heterogenitet i henhold til deres kliniske egenskaper. Kohortegenskapene i Tabell 3 viser at pasientene kan deles inn i tre grupper basert på deres Ro/La-status. Tre pasienter var RO+/La+, tre pasienter var Ro+/La-, og tre pasienter var Ro-/La-. Det er også viktig å merke seg at pasientene hadde forskjellige FS, glandulær klinisk karakteristikk (GC), forskjellige nivåer av stimulert salivasekresjon og ulike laboratorieresultater. For å sikre større pålitelighet og robusthet i analysene bør fremtidige studier inkludere større kohorter av

deltakere og en homogen pasientpopulasjon. Pasient 1 kan ha en innvirkning på resultatene, spesielt hvis resultatene skal sammenlignes med andre studier eller ønsker å generalisere resultatene til en større populasjon.

I denne studien valgte vi å ikke inkludere en av TAM-ligandene, ProS, da den ikke er unik for TAM-familien. ProS spiller en viktig rolle som antikoagulant og kan også ha involvering i komplement systemet (111). På grunn av Gas6 sin evne til å binde seg til alle tre TAM-reseptorene, mens ProS kun binder seg til Tyro3 og Mer, men ikke til Axl, ble Gas6 valgt for denne studien. Likevel ville det være interessant å utforske rollen til ProS hos pasienter med pSjS, da dette representerer et fremtidsperspektiv for vårt arbeid.

## **6. KONKLUSJON**

I denne studien ble vevsseksjoner fra labiale spyttkjertler undersøkt ved bruk av IHC og QuPath. Målet var å evaluere uttrykket av TAM-reseptorer hos pasienter med pSjS og sicca-kontroller, samt identifisere hvilke av de valgte immuncellene som uttrykker disse reseptorene. Resultatene indikerte en høyere frekvens av TAM-reseptoruttrykk i pasientgruppen sammenlignet med kontrollgruppen. Det høyere uttrykket av disse reseptorene antyder at det ikke foreligger et problem i forbindelse med opprydding av apoptotiske celler i spyttkjertlene hos pSjS-pasienter. Videre ble det observert at makrofager ikke uttrykte Tyro3 og Axl, mens DC faktisk uttrykte begge disse reseptorene, noe som er konsistent med tidligere forskningsfunn. Dette tyder på at makrofager kan være mindre avhengige av Tyro3 og Axl for efferocytose, mens DC er mer avhengige av disse reseptorene for denne funksjonen. Videre forskning er imidlertid nødvendig for å oppnå en grundigere forståelse av de eksakte mekanismene som regulerer TAM-reseptor aktiviteten og dens potensielle rolle i pSjS. Det er viktig å påpeke at de valgte metodene antageligvis ikke er optimalt egnet for dette formålet, og derfor bør resultatene tolkes med nødvendig forsiktighet. Videre bør det tas hensyn til at enkeltfarging av vevsseksjoner kan ha begrensninger når det gjelder å sikre at det påviste signalet i påfølgende seksjoner faktisk stammer fra samme celle som ble identifisert i den foregående seksjonen.

## 7. REFERANSER

1. Jonsson R, Vogelsang P, Volchenkov R, Espinosa A, Wahren-Herlenius M, Appel S. The complexity of Sjögren's syndrome: Novel aspects on pathogenesis. *Immunology Letters*. 2011;141(1):1-9.
2. Stefanski AL, Tomiak C, Pleyer U, Dietrich T, Burmester GR, Dörner T. The Diagnosis and Treatment of Sjögren's Syndrome. *Dtsches Arzteblatt International*. 2017;114(20):354-61.
3. Bharaj TK, Aqrawi LA, Fromreide S, Jonsson R, Brun JG, Appel S, et al. Inflammatory Stratification in Primary Sjögren's Syndrome Reveals Novel Immune Cell Alterations in Patients' Minor Salivary Glands. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:701581.
4. Fisher BA, Jonsson R, Daniels T, Bombardieri M, Brown RM, Morgan P, et al. Standardisation of labial salivary gland histopathology in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. *Annals of The Rheumatic Diseases*. 2017;76(7):1161-8.
5. Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, Nordmark G, Warfvinge G, Liedholm R, et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Annals of Rheumatic Diseases*. 2011;70(8):1363-8.
6. Jonsson MV, Skarstein K, Jonsson R, Brun JG. Serological implications of germinal center-like structures in primary Sjögren's syndrome. *The Journal of Rheumatology*. 2007;34(10):2044-9.
7. He J, Jin Y, Zhang X, Zhou Y, Li R, Dai Y, et al. Characteristics of germinal center-like structures in patients with Sjögren's syndrome. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2017;20(2):245-51.
8. Sène D, Ismael S, Forien M, Charlotte F, Kaci R, Cacoub P, et al. Ectopic Germinal Center-Like Structures in Minor Salivary Gland Biopsy Tissue Predict Lymphoma Occurrence in Patients With Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis & Rheumatology*. 2018;70(9):1481-8.
9. Jonsson R. Disease mechanisms in Sjögren's syndrome: What do we know? *Scandinavian Journal of Immunology*. 2022;95(3):e13145.
10. Fayyaz A, Kurien BT, Scofield RH. Autoantibodies in Sjögren's Syndrome. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2016;42(3):419-34.
11. Jonsson R, Brokstad KA, Jonsson MV, Delaleu N, Skarstein K. Current concepts on Sjögren's syndrome - classification criteria and biomarkers. *European Journal of Oral Sciences*. 2018;126 Suppl 1(Suppl Suppl 1):37-48.



12. 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. *Annals of The Rheumatic Diseases*. 2015;74(11):1983-9.
13. 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. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2011;40(3):221-4.
14. Birlik M, Akar S, Gurler O, Sari I, Birlik B, Sarioglu S, et al. Prevalence of primary Sjogren's syndrome in Turkey: a population-based epidemiological study. *International Journal of Clinical Practice*. 2009;63(6):954-61.
15. Alamanos Y, Tsifetaki N, Voulgari PV, Venetsanopoulou AI, Siozos C, Drosos AA. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome in north-west Greece, 1982-2003. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(2):187-91.
16. Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjögren syndrome. *Archives of Internal Medicine*. 2004;164(12):1275-84.
17. Abbas AK. Basic Immunology : Functions and Disorders of the Immune System. 6 ed: Elsevier - Health Sciences Division; 2019. 336 p.
18. Tian Y, Yang H, Liu N, Li Y, Chen J. Advances in Pathogenesis of Sjögren's Syndrome. *Journal of Immunology Research*. 2021;2021:5928232.
19. Kang HI, Fei HM, Saito I, Sawada S, Chen SL, Yi D, et al. Comparison of HLA class II genes in Caucasoid, Chinese, and Japanese patients with primary Sjögren's syndrome. *The Journal of Immunology*. 1993;150(8 Pt 1):3615-23.
20. Nair JJ, Singh TP. Sjogren's syndrome: Review of the aetiology, Pathophysiology & Potential therapeutic interventions. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2017;9(4):e584-e9.
21. Thorlacius GE, Björk A, Wahren-Herlenius M. Genetics and epigenetics of primary Sjögren syndrome: implications for future therapies. *Nature Reviews Rheumatology*. 2023;19(5):288-306.
22. Björk A, Mofors J, Wahren-Herlenius M. Environmental factors in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Journal of Internal Medicine*. 2020;287(5):475-92.
23. Nakamura H, Kawakami A. What is the evidence for Sjögren's syndrome being triggered by viral infection? Subplot: infections that cause clinical features of Sjögren's syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*. 2016;28(4):390-7.

24. Etchegaray-Morales I, Jiménez-Herrera EA, Mendoza-Pinto C, Rojas-Villarraga A, Macías-Díaz S, Osorio-Peña Á D, et al. Helicobacter pylori and its association with autoimmune diseases: systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjögren syndrome. *Journal of Translational Autoimmunity*. 2021;4:100135.
25. Yoshimi R, Ueda A, Ozato K, Ishigatsubo Y. Clinical and pathological roles of Ro/SSA autoantibody system. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012:606195.
26. Mofors J, Arkema EV, Björk A, Westermark L, Kvarnström M, Forsblad-d'Elia H, et al. Infections increase the risk of developing Sjögren's syndrome. *Journal of Internal Medicine*. 2019;285(6):670-80.
27. Voulgarelis M, Tzioufas AG. Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjögren's syndrome. *Nature Reviews Rheumatology*. 2010;6(9):529-37.
28. Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1994;72(2):162-5.
29. Brito-Zerón P, Baldini C, Bootsma H, Bowman SJ, Jonsson R, Mariette X, et al. Sjögren syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2:16047.
30. Selmi C, Gershwin ME. Chronic Autoimmune Epithelitis in Sjögren's Syndrome and Primary Biliary Cholangitis: A Comprehensive Review. *Rheumatology and Therapy*. 2017;4(2):263-79.
31. Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(8):2770-5.
32. Negrini S, Emmi G, Greco M, Borro M, Sardanelli F, Murdaca G, et al. Sjögren's syndrome: a systemic autoimmune disease. *Clinical Experimental Medicine*. 2022;22(1):9-25.
33. Berman N, Vivino F, Baker J, Dunham J, Pinto A. Risk factors for caries development in primary Sjogren syndrome. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology*. 2019;128(2):117-22.
34. Wu SY, Wu CY, Chen MH, Huang HY, Chen YH, Tsao YP, et al. Periodontal conditions in patients with Sjögren's syndrome: A meta-analysis. *Journal of Dental Sciences*. 2021;16(4):1222-32.
35. Zi C, Huang Q, Ren Y, Yao H, He T, Gao Y. Meibomian gland dysfunction and primary Sjögren's syndrome dry eye: a protocol for systematic review and meta-analysis. *British Medical journal* 2021;11(12):e048336.

36. Bjordal O, Norheim KB, Rødahl E, Jonsson R, Omdal R. Primary Sjögren's syndrome and the eye. *Survry og Ophthalmology*. 2020;65(2):119-32.
37. Tincani A, Andreoli L, Cavazzana I, Doria A, Favero M, Fenini MG, et al. Novel aspects of Sjögren's syndrome in 2012. *BMC Medicine*. 2013;11:93.
38. Aiyegbusi O, McGregor L, McGeoch L, Kipgen D, Geddes CC, Stevens KI. Renal Disease in Primary Sjögren's Syndrome. *Rheumatology and Therapy*. 2021;8(1):63-80.
39. Fox RI, Liu AY. Sjögren's syndrome in dermatology. *Clinics in Dermatology*. 2006;24(5):393-413.
40. Seeliger T, Jacobsen L, Hendel M, Bönig L, Kristian Prenzler NK, Thiele T, et al. Cognitive impairment in patients with Neuro-Sjögren. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2020;7(8):1352-9.
41. Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, Nordmark G, Warfvinge G, Liedholm R, et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome. *Annals of The Rheumatic Diseases*. 2011;70(8):1363-8.
42. Theander E, Jonsson R, Sjöström B, Brokstad K, Olsson P, Henriksson G. Prediction of Sjögren's Syndrome Years Before Diagnosis and Identification of Patients With Early Onset and Severe Disease Course by Autoantibody Profiling. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(9):2427-36.
43. Jonsson R, Theander E, Sjöström B, Brokstad K, Henriksson G. Autoantibodies present before symptom onset in primary Sjögren syndrome. *JAMA Network*. 2013;310(17):1854-5.
44. 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. *Arthritis & Rheumatology*. 2017;69(1):35-45.
45. Seror R, Ravaud P, Mariette X, Bootsma H, Theander E, Hansen A, et al. EULAR Sjogren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): development of a consensus patient index for primary Sjogren's syndrome. *Annals of The Rheumatic Diseases*. 2011;70(6):968-72.
46. Seror R, Bootsma H, Saraux A, Bowman SJ, Theander E, Brun JG, et al. Defining disease activity states and clinically meaningful improvement in primary Sjögren's syndrome with EULAR primary Sjögren's syndrome disease activity (ESSDAI) and patient-reported indexes (ESSPRI). *Annals of The Rheumatic Diseases*. 2016;75(2):382-9.

47. 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. *Annals of The Rheumatic Diseases*. 2002;61(6):554-8.
48. Ali Y, Lehmuusaari K. Industrial perspective in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006;58(11):1258-68.
49. Aragona P, Stilo A, Ferreri F, Mabruci M. Effects of the topical treatment with NSAIDs on corneal sensitivity and ocular surface of Sjögren's syndrome patients. *Eye (Lond)*. 2005;19(5):535-9.
50. Deveci H, Kobak S. The efficacy of topical 0.05 % cyclosporine A in patients with dry eye disease associated with Sjögren's syndrome. *International Ophthalmology*. 2014;34(5):1043-8.
51. Egrilmez S, Aslan F, Karabulut G, Kabasakal Y, Yagci A. Clinical efficacy of the SmartPlug™ in the treatment of primary Sjogren's syndrome with keratoconjunctivitis sicca: one-year follow-up study. *Rheumatology International*. 2011;31(12):1567-70.
52. Price EJ, Rauz S, Tappuni AR, Sutcliffe N, Hackett KL, Barone F, et al. The British Society for Rheumatology guideline for the management of adults with primary Sjögren's Syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(10):1643-7.
53. Freige C, Ford C. CADTH Rapid Response Reports. Pilocarpine for Sjögren's Syndrome-Induced Dry Mouth and Dry Eyes: A Review of Clinical Effectiveness, Cost-Effectiveness, and Guidelines. Ottawa (ON): *Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health*; 2020.
54. Manfrè V, Cafaro G, Riccucci I, Zabotti A, Perricone C, Bootsma H, et al. One year in review 2020: comorbidities, diagnosis and treatment of primary Sjögren's syndrome. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2020;38 Suppl 126(4):10-22.
55. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Bombardieri S, Bootsma H, De Vita S, Dörner T, et al. EULAR recommendations for the management of Sjögren's syndrome with topical and systemic therapies. *Annals of The Rheumatic Diseases*. 2020;79(1):3-18.
56. Dass S, Bowman SJ, Vital EM, Ikeda K, Pease CT, Hamburger J, et al. Reduction of fatigue in Sjögren syndrome with rituximab: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Annals of The Rheumatic Diseases*. 2008;67(11):1541-4.
57. Bowman SJ, Everett CC, O'Dwyer JL, Emery P, Pitzalis C, Ng WF, et al. Randomized Controlled Trial of Rituximab and Cost-Effectiveness Analysis in Treating Fatigue and Oral Dryness in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis & Rheumatology*. 2017;69(7):1440-50.

58. Chu LL, Cui K, Pope JE. Meta-Analysis of Treatment for Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Care & Research (Hoboken)*. 2020;72(7):1011-21.
59. Bootsma H, Kroese FGM, Vissink A. Editorial: Rituximab in the Treatment of Sjögren's Syndrome: Is It the Right or Wrong Drug? *Arthritis & Rheumatology*. 2017;69(7):1346-9.
60. Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's Syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2018;378(10):931-9.
61. Fisher BA, Szanto A, Ng W-F, Bombardieri M, Posch MG, Papas AS, et al. Assessment of the anti-CD40 antibody iscalimab in patients with primary Sjögren's syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *The Lancet Rheumatology*. 2020;2(3):e142-e52.
62. Eefje Hanna Martine van der Heijden, Sofie Liny Marie Blokland, Maarten Reinier Hillen, Ana Paula Pinheiro Lopes, Frédérique Marie van Vliet-Moret, Prof Antoine Johan Wilhelm Peter Rosenberg, et al. Leflunomide–hydroxychloroquine combination therapy in patients with primary Sjögren's syndrome (RepurpSS-I): a placebo-controlled, double-blinded, randomised clinical trial. *The Lancet Rheumatology*. 2020;2.
63. Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S. Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *The Journal of Immunology*. 2008;181(4):2898-906.
64. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-42.
65. Fonseca VR, Romão VC, Agua-Doce A, Santos M, López-Presa D, Ferreira AC, et al. The Ratio of Blood T Follicular Regulatory Cells to T Follicular Helper Cells Marks Ectopic Lymphoid Structure Formation While Activated Follicular Helper T Cells Indicate Disease Activity in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis & Rheumatology*. 2018;70(5):774-84.
66. Sallusto F, Lanzavecchia A. Human Th17 cells in infection and autoimmunity. *Microbes and Infection*. 2009;11(5):620-4.
67. Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K, Brokstad KA, Hjelmström P, Wahren-Herlenius M, et al. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(11):3187-201.
68. Hansen A, Lipsky PE, Dörner T. B cells in Sjögren's syndrome: indications for disturbed selection and differentiation in ectopic lymphoid tissue. *Arthritis Research & Therapy*. 2007;9(4):218.

69. Skarstein K, Aqrabi LA, Øijordsbakken G, Jonsson R, Jensen JL. Adipose tissue is prominent in salivary glands of Sjögren's syndrome patients and appears to influence the microenvironment in these organs. *Autoimmunity*. 2016;49(5):338-46.
70. Aqrabi LA, Galtung HK, Guerreiro EM, Øvstebø R, Thiede B, Utheim TP, et al. Proteomic and histopathological characterisation of sicca subjects and primary Sjögren's syndrome patients reveals promising tear, saliva and extracellular vesicle disease biomarkers. *Arthritis Research & Therapy*. 2019;21(1):181.
71. Brkic Z, Maria NI, van Helden-Meeuwsen CG, van de Merwe JP, van Daele PL, Dalm VA, et al. Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjogren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2013;72(5):728-35.
72. Nordmark G, Eloranta ML, Ronnblom L. Primary Sjögren's syndrome and the type I interferon system. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012;13(10):2054-62.
73. Fisher BA, Jonsson R, Daniels T, Bombardieri M, Brown RM, Morgan P, et al. Standardisation of labial salivary gland histopathology in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. *Annals of Rheumatic Diseases*. 2017;76(7):1161-8.
74. Samuelsen T, Aqrabi L, Skarstein K, Jensen J. Evaluering av spyttkjertel biopsier ved utredning av Sjögrens syndrom Evaluering av spyttkjertel biopsier ved utredning av Sjögrens syndrom. *The Norwegian Dental Journal*. 2022.
75. Abdolmaleki F, Farahani N, Gheibi Hayat SM, Pirro M, Bianconi V, Barreto GE, et al. The Role of Efferocytosis in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1645.
76. Rothlin CV, Lemke G. TAM receptor signaling and autoimmune disease. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(6):740-6.
77. Witas R, Peck AB, Ambrus JL, Nguyen CQ. Sjogren's Syndrome and TAM Receptors: A Possible Contribution to Disease Onset. *Journal of Immunology Research*. 2019;2019:4813795.
78. Rothlin CV, Carrera-Silva EA, Bosurgi L, Ghosh S. TAM receptor signaling in immune homeostasis. *Annual Review of Immunology*. 2015;33:355-91.
79. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(5):327-36.
80. Sarkar I, Universitetet i Bergen Klinisk i. Towards stratification of patients with Sjögren's syndrome : single cell analyses and immune profiling. Bergen, Norway: *University of Bergen*; 2020.

81. Vogelsang P. Dendritic cells in Sjögren's syndrome. Bergen: *University of Bergen*; 2010.
82. Hamamatsu. Whole Slide Imaging - WSI 2022 [Available from: <https://nanozoomer.hamamatsu.com/jp/en.html>].
83. Hein AL, Mukherjee M, Talmon GA, Natarajan SK, Nordgren TM, Lyden E, et al. QuPath Digital Immunohistochemical Analysis of Placental Tissue. *Journal of Pathology Informatics*. 2021;12:40.
84. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*. 2017;7(1):16878.
85. QuPath. Cell detection [updated 2023. Available from: [https://qupath.readthedocs.io/en/0.4/docs/tutorials/cell\\_detection.html](https://qupath.readthedocs.io/en/0.4/docs/tutorials/cell_detection.html)].
86. Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T, Liu GT, D'Souza E, McGuff HS, et al. Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatology*. 1997;40(1):87-97.
87. Kong L, Robinson CP, Peck AB, Vela-Roch N, Sakata KM, Dang H, et al. Inappropriate apoptosis of salivary and lacrimal gland epithelium of immunodeficient NOD-scid mice. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 1998;16(6):675-81.
88. Fragoulis GE, Vakrakou AG, Papadopoulou A, Germenis A, Kanavakis E, Moutsopoulos HM, et al. Impaired degradation and aberrant phagocytosis of necrotic cell debris in the peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome. *Journal of Autoimmunity*. 2015;56:12-22.
89. Vago JP, Amaral FA, van de Loo FAJ. Resolving inflammation by TAM receptor activation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2021;227:107893.
90. Qin B, Wang J, Ma N, Yang M, Fu H, Liang Y, et al. The association of Tyro3/Axl/Mer signaling with inflammatory response, disease activity in patients with primary Sjögren's syndrome. *Joint Bone Spine*. 2015;82(4):258-63.
91. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *The Journal of Immunology*. 2007;178(9):5635-42.
92. Roescher N, Lodde BM, Vosters JL, Tak PP, Catalan MA, Illei GG, et al. Temporal changes in salivary glands of non-obese diabetic mice as a model for Sjögren's syndrome. *Oral Diseases*. 2012;18(1):96-106.

93. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *Journal of Autoimmunity*. 2010;34(4):400-7.
94. Mahajan NP, Earp HS. An SH2 domain-dependent, phosphotyrosine-independent interaction between Vav1 and the Mer receptor tyrosine kinase: a mechanism for localizing guanine nucleotide-exchange factor action. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(43):42596-603.
95. Wu Y, Singh S, Georgescu MM, Birge RB. A role for Mer tyrosine kinase in alphavbeta5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *Journal of Cell Science*. 2005;118(Pt 3):539-53.
96. Lew ED, Oh J, Burrola PG, Lax I, Zagórska A, Través PG, et al. Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *Elife*. 2014;3.
97. Park HJ, Baen JY, Lee YJ, Choi YH, Kang JL. The TAM-family receptor Mer mediates production of HGF through the RhoA-dependent pathway in response to apoptotic cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2012;23(16):3254-65.
98. Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, Ng HHM, Wu D, Wee YTF, et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Communications* 2020;40(4):135-53.
99. Lloyd CM, Phillips AR, Cooper GJ, Dunbar PR. Three-colour fluorescence immunohistochemistry reveals the diversity of cells staining for macrophage markers in murine spleen and liver. *Journal of Immunological Methods*. 2008;334(1-2):70-81.
100. Donaldson JG. Immunofluorescence Staining. *Current Protocols in Cell Biology*. 2015;69:4.3.1-4.3.7.
101. Sun Y, Ip P, Chakrabarty A. Simple Elimination of Background Fluorescence in Formalin-Fixed Human Brain Tissue for Immunofluorescence Microscopy. *Journal of Visualized Experiments*. 2017(127).
102. Mingueneau M, Boudaoud S, Haskett S, Reynolds TL, Nocturne G, Norton E, et al. Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjögren's signature correlating with disease activity and glandular inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;137(6):1809-21.e12.
103. Glasson Y, Chépeaux LA, Dumé AS, Lafont V, Faget J, Bonnefoy N, et al. Single-cell high-dimensional imaging mass cytometry: one step beyond in oncology. *Seminars in Immunopathology*. 2023;45(1):17-28.



104. Brit Jorunn Svanes EK, Erlend Skorpetteit Aga. Nye skjermar skal gjere det raskare å oppdage kreft: *NRK*; 21.11.2021 [Available from: <https://www.nrk.no/vestland/nye-skjermar-skal-gjere-det-raskare-a-oppdage-kreft-1.15742102>].
105. Felles nettløsning for spesialisthelsetjenesten. Interregionalt forum for digital patologi: *Spesialisthelsetjenesten*; 23.02.2023 [Available from: <https://spesialisthelsetjenesten.no/interregionalt-forum-for-digital-patologi>].
106. Humphries MP, Maxwell P, Salto-Tellez M. QuPath: The global impact of an open source digital pathology system. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2021;19:852-9.
107. Andersen MV. Bioingenjørenes rolle innen digital patologi: *The Norwegian Society of Engineers and Technologists*; 18.10.2018 [Available from: <https://www.nito.no/contentassets/4976ff82a9564ea5935a617f70a3710b/patologi/3-bioingeniorenens-rolle-innen-digital-patologi-martin-vejle-andersen.pdf>].
108. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):676-82.
109. Tuominen VJ, Ruotoistenmäki S, Viitanen A, Jumppanen M, Isola J. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Research*. 2010;12(4):R56.
110. Yu G, Yu C, Xie F, He M. Automated Tumor Count for Mitosis-Karyorrhexis Index Determination in Neuroblastoma Using Whole Slide Image and Qupath, an Image Analytic Software. *Pediatric and Development Pathology*. 2022;25(5):526-37.
111. van der Meer JH, van der Poll T, van 't Veer C. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood*. 2014;123(16):2460-9.