

Zastosowanie agonistów receptorów muskarynowych w leczeniu zespołu Sjögrena

Use of muscarinic agonists in the treatment of Sjögren's syndrome

ROBERT I. FOX ^{1/}, YRJÖ KONTTINEN ^{2/}, ABRAHAM FISHER ^{3/}

^{1/} Allergy and Rheumatology Clinic, Scripps Memorial Hospital and Research Fundation, La Jolla, California 92037

^{2/} Israel Institute for Biological Research, PO Box 19, Ness-Ziona 74100, Israel

^{3/} Department of Medicine, Surgery Hospital, Helsinki, Finland

W ostatnim czasie zarejestrowane zostały dwa leki w leczeniu suchości w jamie ustnej w przebiegu zespołu Sjögrena (ZS) – będące agonistami receptorów muskarynowych (pilocarpina i cewimelina). Leki te stymulują receptory M1 i M3 gruczołów ślinowych, powodując zwiększenie ich czynności wydzielniczej. Skuteczność tych związków wskazuje na istotne znaczenie mechanizmów neuroendokrynych w patogenezie ZS, uważanego za chorobę z autoimmunizacji. Autorzy dokonali przeglądu literatury dotyczącej uwalniania cytokin oraz metaloproteinaz w gruczołach ślinowych u chorych z ZS, oraz ich podatności na uwalnianie i odpowiedź na substancje neuroprzekądnikowe. Dokonano również przeglądu literatury dotyczącej budowy i czynności receptorów muskarynowych, ponieważ mogą one być związane z ZS, oraz ewentualnego zastosowania nowych agonistów receptorów muskarynowych w tej chorobie.

Otorinolaryngologia, 2003, 2(2), 49-63

Słowa kluczowe: zespół Sjögrena, suchość w jamie ustnej, receptory muskarynowe, agonści receptorów muskarynowych, pilokarpina, cewimelina

Two muscarinic agonists (pilocarpine and cevimeline) have recently been approved for the treatment of symptoms of xerostomia in Sjögren's syndrome (SS). These agents stimulate the M1 and M3 receptors present on salivary glands, leading to increased secretory function. The use of these agents emphasizes the importance of neuroendocrine mechanisms in SS, which is considered an autoimmune disorder. We review recent studies on the release of cytokines and metalloproteinases in SS-affected glands and their influence on the release of and response to neurotransmitters. Also, we review the structure and function of muscarinic receptors as they may relate to SS and the potential use of novel muscarinic agonists in SS.

Otorinolaryngologia, 2003, 2(2), 49-63

Key words: Sjögren's syndrome, xerostomia, muscarinic receptors, muscarinic agonists, pilocarpine, cevimeline

Przedruk z (Reprinted from): *Clinical Immunology* 2001; 101(3), December: 249-263

Wprowadzenie

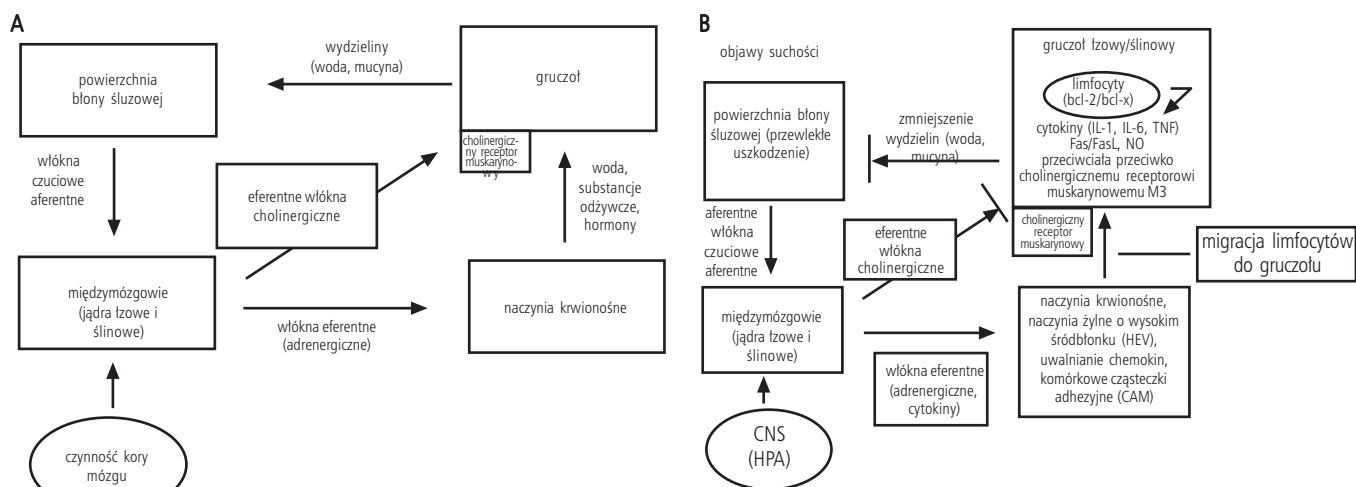
Objawami charakterystycznymi dla zespołu Sjögrena (ZS) jest uczucie suchości oczu, które klinicznie przejawia się jako suche zapalenie rogówki i spojówki. Chorzy z ZS zgłaszają również uczucie suchości w ustach związane z ogniskowymi naciekami limfoidalnymi w gruczołach ślinowych [1]. ZS może występować w postaci izolowanej (postać pierwotna) bądź też towarzyszyć innej chorobie z autoimmunizacji (postać wtórna), takiej jak reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, zapalenie mięśni lub twardzina. Pierwotny ZS występuje u 0,5-1% dorosłych kobiet [2].

Zarówno pierwotny, jak i wtórny ZS, są układowymi chorobami z autoimmunizacji, jakkolwiek objawy dotyczą najczęściej oczu i jamy ustnej. Pacjenci skarżący się na suchość opisują tę dolegliwość jako zwiększone uczucie tarcia podczas mrugania powiekami lub przy przesuwaniu języka po błonie śluzowej jamy ustnej [3]. Bódcze te są odbierane przez bezmielinowe włókna nerwowe unerwiające powierzchnię błony śluzowej (jak przedstawiono schematycznie na rysunku 1). Trące ruchy powierzchni oka oraz jamy ustnej, które zachodzą przy mruganiu [4,5] mówieniu oraz przełykaniu [6] ułatwiane są przez łzy lub ślinę, które stanowią żel zawierający

* Przedrukowano za pozwoleniem *Clinical Immunology* 2001; 101(3), December: 249-263

* Reprinted with kind permission from *Clinical Immunology* 2001; 101(3), December: 249-263

Tłumaczenie: dr med. Ewa Zamysłowska-Szmytko



Ryc. 1. Schemat kontroli czynności gruczołów łzowych i ślinowych.

(A) Wydzielanie wymaga obecności jednostki czynnościowej. Powierzchnia błony śluzowej jest silnie unerwiona i wysyła włókna aferentne do międzymózgowia (jądra ślinowe i łzowe). Międzymózgowie otrzymuje również sygnały z mózgu i integruje bodźce otrzymane z gruczołów oraz kory mózgowej, po czym przesyła informację poprzez nerwy eferentne do naczyń krwionośnych i gruczołów wydzielniczych. Nerwy cholinergiczne, w których neuroprzebieżnikami są acetylocholina oraz naczynioaktywny peptyd jelitowy (VIP), unerwiają gruczoły, podczas, gdy włókna adrenergiczne, w których neuroprzebieżnikiem jest noradrenalina, unerwiają naczynia krwionośne. Gruczoły wydzielnicze zawierają cholinergiczne receptory muskarynowe M1 i M3 i wytwarzają wydzieliny (łyż lub ślinę), które zawierają wodę, mucynę i białka.

(B) W zespole Sjögrena jednostka czynnościowa jest zajęta chorobowo. Najwcześniej występuje uszkodzenie gruczołów, którego przyczyną są czynniki zewnątrz-pochodne, jak i defekty genetyczne wpływające na budowę i różnicowanie gruczołu. Komórki gruczołowe, komórki krwi i elementy podścieliska wytwarzają chemokiny, interleukinę-1 (IL-1), TNF- α . Czynniki te zmieniają miejscowe naczynia włosowate w naczynia żyłne o wysokim śródłonku (*high endothelial venules*, HEV), ze zwiększoną aktywnością komórkowych cząsteczek adhezyjnych, promujących migrację limfocytów do miejsc w gruczołach otaczających te naczynia. Gruczoły są początkowo naciekane przez limfocyty CD4+ o profilu cytokin charakterystycznym dla Th1, w tym interferonu- γ . Ponadto naciekające limfocyty prezentują również ligandy Fas (FasL), które mogą inicjować apoptozę i wpływać na czynność gruczołu. Następnie do miejscowych ognisk limfocytarnych przez zmienione naczynia żyłne (HEV) napływają limfocyty Th2 oraz limfocyty B, a komórki B wytwarzają przeciwciała, które wchodzi w reakcję z autoantygenami charakterystycznymi dla zespołu Sjögrena, cholinergicznymi receptorami muskarynowymi M3 oraz innymi elementami gruczołowymi (jak fragmenty fodryny). Mikrośrodowisko zapalne indukuje również metaloproteinazy, które mogą rozkładać cząsteczki istotne dla organizacji procesów zachodzących w macierzy komórkowej oraz odpowiadające za zdolność komórki do odbierania sygnałów nerwowych. Czynniki te, obok zmniejszenia liczby jednostek wydzielniczych w wycinkach gruczołów osób z zespołem Sjögrena, prowadzą do zmniejszenia zdolności wydzielniczych przetrwałych jednostek gruczołowych, w tym zmniejszenia uwalniania acetylocholinę z przetrwałych nerwów, zmniejszenia odpowiedzi komórek gruczołowych na acetylocholinę, zaburzeń transportu wody oraz zaburzeń polaryzacji szczytowych i podstawnych rejonów komórki. W odpowiedzi na objawową suchość powierzchni błon śluzowych, włókna aferentne przenoszą sygnały do międzymózgowia, gdzie również dochodzą informacje z ośrodkowego układu nerwowego, włączając te, które biorą udział w regulacji osi podwzrostowo-przysadkowo-nadnerczowej

wodę, białka (włączając cytokiny i czynniki wzrostu), oligosacharydy, mucynę i hormony [7-9].

Percepcja suchości oczu lub jamy ustnej w ZS związana jest z funkcją jednostek czynnościowych gruczołów łzowych lub ślinowych (ryc. 1A) [3]. Powierzchnia oka jest gęsto unerwiona przez beźmielinowe aferentne włókna czuciowe przenoszące bodźce nerwowe do obszaru międzymózgowia, zwanego jądrem łzowym [10]. Włókna aferentne z błony śluzowej policzków przewodzą pobudzenia do sąsiednich obszarów międzymózgowia zwanych jądrami ślinowymi. Zarówno jądro łzowe, jak i ślinowe międzymózgowia otrzymują pobudzenia z wyższych ośrodków korowych (ryc. 1A). Istotna rola ośrodków korowych w kontroli wydzielania łez i śliny uwiadcza się również w inny sposób, w sytuacji, gdy niektóre leki „działające ośrodkowo” (jak przeciwnadciśnieniowy lek klonidyna lub trójcykliczne leki przeciwdepresyjne) wywołują objaw suchości związany z ich działaniem na ośrodkowy układ nerwowy [11, 12]. Neurochemiczne podłoże ośrodkowego wpływu na wydzielanie śliny sugerowano w badaniach u pacjentów z chorobą Alzheimera, u których występuje zmniejszone wydziela-

nie śliny [13] bez obecności nacieków limfocytarnych w gruczołach [14-16].

Po zintegrowaniu w międzymózgowiu (tzn. w jądrach łzowym i ślinowym) sygnałów przenoszonych przez obwodowe włókna aferentne z powierzchni błony śluzowej oraz impulsów nerwowych z wyższych ośrodków korowych (ryc. 1A) wysyłane są sygnały eferentne do naczyń krwionośnych (pierwotnie przez nerwy adrenergiczne) oraz do gruczołów łzowych i ślinowych (przez włókna cholinergiczne). Neuroprzebieżnikiem w eferentnych włóknach adrenergicznych unerwiających naczynia krwionośne jest głównie noradrenalina, podczas gdy we włóknach cholinergicznymi biegnących do gruczołów łzowych i ślinowych – acetylocholina (ACh), wazoaktywne białko jelitowe (VIP, *Vasoactive Intestinal Peptide*) oraz inne neuroprzebieżniki, jak białko zależne od genu dla kalcytoniny (*Calcitonine Gene-related Peptide*) [17, 18].

Wyróżnia się dwie główne rodziny receptorów dla acetylocholinę: receptory muskarynowe i nikotynowe. Receptory muskarynowe (mAChRs) dominują w gruczołach wydzielniczych, dotyczy to szczególnie receptorów M1 i M3 gruczołów ślinowych oraz receptora M3

gruczołów łzowych [19]. VIP, inny neuroprzekaznik niezbędny do uzyskania maksymalnej odpowiedzi wydzielniczej, znajduje się w pęcherzykach synaptycznych niektórych nerwów cholinergicznym, jednakże łączy się ze swoim własnym, oddzielnym receptorem [20–22].

Dane literaturowe

Dla ZS charakterystyczne jest zmniejszenie wydzielania gruczołów łzowych i ślinowych, co prowadzi do uczucia suchości (ryc. 1B) [10]. Deficyt odpowiedzi wydzielniczej spowodowany jest prawdopodobnie wieloma czynnikami, obejmującymi z jednej strony zmniejszenie liczby jednostek wydzielniczych (mianowicie gronek i przewodów), z drugiej zaś upośledzenie funkcji pozostałych jednostek sekrecyjnych [23]. Jednostki wydzielnicze mogą być zniszczone w mechanizmach z udziałem perforinu i granzymu A lub ligandów Fas/Fas [25], w których istotne znaczenie ma bezpośredni naciek komórek T. Należy podkreślić, że w wycinkach z drugorzędowych gruczołów ślinowych u osób z ZS liczba apoptotycznych komórek jest niewielka [26]. W rzeczywistości, u osób z trwającymi wiele lat objawami nasilonej suchości w przebiegu ZS zniszczonych jest jedynie około połowy struktur gronek lub przewodów [1, 27–29].

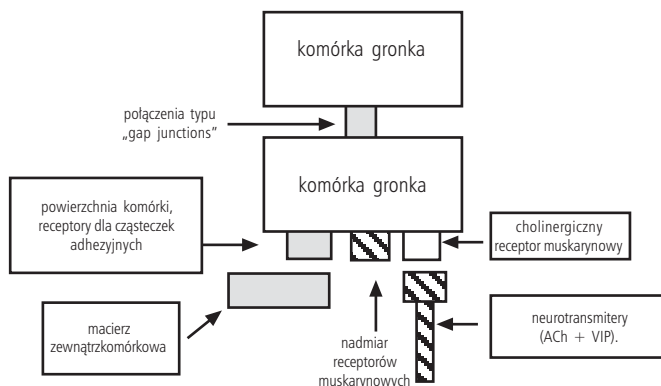
Prawdopodobnie w osłabieniu czynności nie zniszczonych jednostek wydzielniczych rolę odgrywa wiele czynników. Mimo zmniejszonej liczby włókien nerwowych w okolicy ogniskowych nacieków limfocytarnych, pozostałe elementy gruczołowe są unerwione, na co wskazuje obecność aksonów zawierających synaptofizynę oraz białko aksonalne 9,5 [30]. Tak, więc czynniki związane z nakiem limfocytarnym oraz przewlekłym procesem zapalnym chronią czynność i/lub łączność między pozostałymi strukturami nerwowymi i elementami gronkowymi/przewodowymi. Do czynników tych należą prawdopodobnie cytokiny, takie jak interleukina I (IL-1) oraz czynnik martwicy nowotworów- α (*Tumor Necrosis Factor- α* , TNF- α), autoprzeciwciała, połączenia ligandów Fas/Fas oraz metaloproteinazy, które wpływają na zależność komórka/macierz (tab. I).

W wyniku zmniejszonego wydzielania łez i śliny powierzchni gałki ocznej i błony śluzowej jamy ustnej przechodzi proces przypominający przewlekłą „reakcję urazową” z następowym uwolnieniem cytokin prozapalnych, które nasilają tę reakcję [31, 32]. Obniżony przepływ łez i śliny nie pozwala na prawidłowe usuwanie bądź hamowanie czynności tych działających prozapalnie cytokin.

Badania w mikroskopii elektronowej oraz oznaczanie miejsc wiązań receptorowych wykazały, że liczba cholinergicznym receptorów muskarynowych w bocznopodstawnych błonach prawidłowych gruczołów ślinowych i łzowych istotnie przekracza liczbę zakończeń nerwowych w tych gruczołach [33, 34]. Biopsje wykonane u pacjentów z ZS ujawniły istnienie dwóch obszarów tkanki gruczołowej - obszar środkowy, gruczołowy, z ogniskowymi naciekami limfocytarnymi oraz otaczający go obszar z przetrwałymi gronkami i przewodami. W obszarze ogniskowych nacieków limfocytarnych występują nieliczne włókna nerwowe wykrywane metodami immunohistochemicznymi, identyfikującymi białko strukturalne nerwów 9,5, synaptofizynę lub neuropeptydy, takie jak polipeptyd jelitowy działający na naczynia (*Vasoactive Intestinal Peptide - VIP*) [30a]. Przeciwnie, w regionach z przetrwałymi jednostkami gronkowo-przewodowymi zlokalizowanymi wokół ognisk nacieków limfocytarnych występowała prawidłowa liczba i dystrybucja markerów włókien aksonalnych oraz neuropeptydów [30]. Co więcej, stwierdzono zwiększoną liczbę receptorów muskarynowych M3 [19]. Podsumowując, wyniki te sugerują, że obniżenie czynności wydzielniczej u osób z ZS nie jest wynikiem uszkodzenia unerwienia w całych płacikach gruczołu czy też brakiem cholinergicznym receptorów muskarynowych dla neuropeptydów w przetrwałych gronkach/przewodach. Pod tym względem wyniki badań immunohistochemicznych u osób z ZS różnią się od choroby Alzheimera, w której zmniejsza się liczba włókien nerwowych [37] oraz z miastenią (*myasthenia gravis*), w której wytwarzane przeciwciała przeciwko nikotynowym receptorom acetylocholinergicznym prowadzą do spadku liczby tych receptorów w mięśniach. Zwiększenie liczby receptorów muskarynowych M3 w wycinkach pobranych od osób z ZS sugeruje obniżony poziom uwalniania acetylocholin z przetrwałych zakończeń nerwowych (lub blokadę dostępnych receptorów muskarynowych) z kompensacyjnym wzrostem ekspresji receptorów muskarynowych M3 [19]. Ponadto komórki gronek posiadają „połączenia komunikacyjne” (*gap junctions*), które pozwalają na bardziej wydajne przenoszenie substancji przekaznikowych II rzędu (*second messenger*) z jednej komórki gronka do przyległych komórek (jak pokazano schematycznie na ryc. 2). Nadmiar receptorów muskarynowych może leżeć u podstaw mechanizmu wzmacniania cholinergicznym sygnału nerwowego, co pozwala na przelanie nadmiernej ilości

Tabela I. Mechanizmy powstawania suchości w zespole Sjögrena

I. Zniszczenie gruczołów w mechanizmach komórkowych
A. Perforyna/granzym A [24]
B. Ligandy Fas/Fas [100]
II. Nieprawidłowa czynność gruczołów
A. Cytokiny IL-1 i TNF- α hamują uwalnianie acetylocholin z nerwów cholinergicznym [59]
B. Zahamowanie wydzielania gruczołowego przez interakcje Fas/Fas [66]
C. Przeciwciała dla receptorów muskarynowych M3 [67, 70, 101, 102]
D. Metaloproteinazy, które rozkładają macierz i w ten sposób hamują transmisję sygnału „z zewnątrz – do wewnątrz” [103-105]
III. Mechanizmy pochodzenia ośrodkowego
Nieprawidłowe działanie osi adrenergicznej podwzgórzowo-przysadkowej [106]

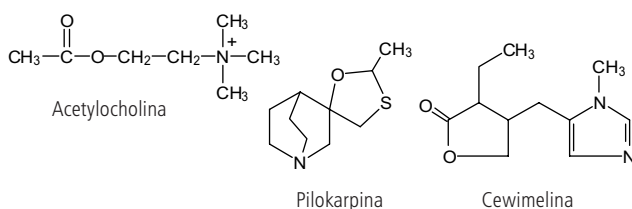


Ryc. 2. Schematyczny rysunek komórek wydzielniczych gronka w zespole Sjögrena.

Komórki gronka są unerwione przez włókna cholinergiczne, które współdziałają z cholinergicznymi receptorami muskarynowymi, głównie podtypami M1 i M3 (gruczoły ślinowe) oraz M3 (gruczoły łzowe). Nerwy cholinergiczne uwalniają acetylocholiny oraz wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP). Połączenia komunikacyjne typu „gap junctions” między komórkami pozwalają na bardziej skuteczne przewodzenie sygnału. Liczba receptorów cholinergicznych przewyższa liczbę zakończeń nerwowych, co umożliwia wzmacnianie sygnału nerwowego, a jednocześnie dostarcza punktów uchwytu dla stymulacji analogami acetylocholiny, takimi jak pilokarpina i cewimelina.

acetylocholiny z presynaptycznych zakończeń nerwowych na sąsiednie miejsca receptorowe [33]. Nadmiar receptorów może być wykorzystany w leczeniu analogami acetylocholiny takimi, jak cewimelina i pilokarpina, co jest przedmiotem dalszej dyskusji.

Acetylocholina (ryc. 3) jest uwalniana z pęcherzyków presynaptycznych zakończeń nerwowych i łączy się z nikotynowymi lub muskarynowymi powierzchniowymi receptorami komórek. Oba rodzaje receptorów różnią się zarówno budową, jak i funkcją. Acetylocholinowe receptory nikotynowe mają pentameryczną budowę białkową i posiadają właściwości przyłączania ligandów spełniając funkcję kanałów jonowych. Odwrotnie, receptory muskarynowe zbudowane są z pojedynczych białek, mających właściwości strukturalne typowe dla rodziny receptorów łączących się z białkiem - trójfosforanem guanozyny (białko G).



Ryc. 3. Struktura agonistów receptorów muskarynowych.

Acetylocholina (ACh) jest naturalnym neuroprzekaźnikiem. Pilokarpina jest agonistą receptora M3, z mniejszą aktywnością w stosunku do receptorów M1 i M4. Cewimelina (oryginalnie znana jako AF 102B), sztuczny analog acetylocholiny, jest agonistą zarówno receptorów M1 jak i M3, bez istotnego działania w stosunku do receptorów M4.

Najbardziej intensywne badania nad aktywnością i potencjalnym zastosowaniem leków – agonistów receptorów muskarynowych przeprowadzono w ostatnich 15 latach po odkryciu, że aktywność cholinergiczna jest istot-

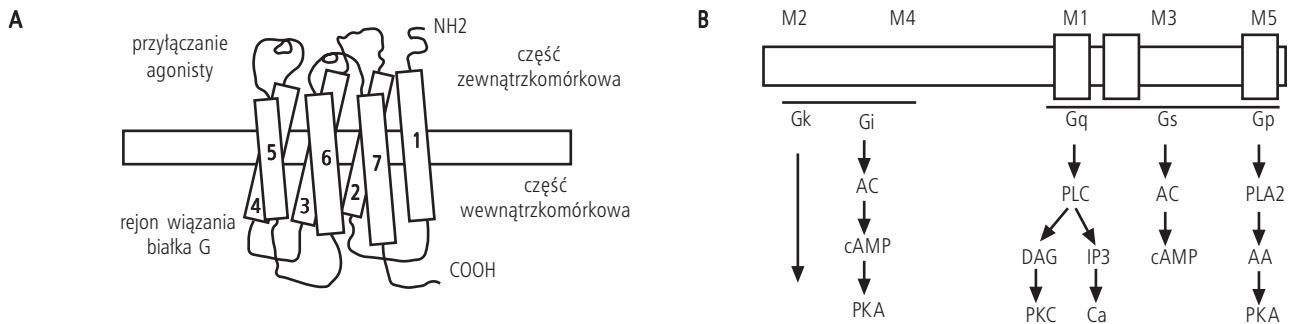
na dla funkcji poznawczych, takich jak zapamiętywanie i uczenie się. W chorobie Alzheimera obserwuje się obniżenie czynności cholinergicznej pewnych obszarów mózgu wykorzystywanych w zapamiętywaniu i uczeniu się. Jest to spowodowane zmianami degeneracyjnymi neuronów kory i hipokampa [omówienie w pracach 35-37]. Co istotne, liczba aksonów uwalniających acetylocholiny zmniejsza się, podczas gdy liczba ciał komórek nerwowych zawierających receptory muskarynowe pozostaje w tych obszarach mózgu stosunkowo niezmienną [38].

Hipoteza, że niedobór poziomu neuroprzekaźnika-acetylocholiny jest przyczyną upośledzenia procesów poznawczych u osób z chorobą Alzheimera skłaniał do opracowania nowej strategii leczenia, mającej na celu na przywrócenie utraconej funkcji cholinergicznej [38]. Dwie główne strategie obejmowały zahamowanie hydrolazy acetylocholiny przez inhibitory acetylocholinoestery (AChE-Is) oraz aktywację receptorów muskarynowych przez ich agonistów. Amerykańska Administracja Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) zatwierdziła w leczeniu zaburzeń poznawczych w chorobie Alzheimera cztery inhibitory acetylocholinoestery (takrin, donepezyl, riwastygminę i galantaminę). Między pięcioma znanymi dotychczas podtypami receptorów muskarynowych, największe zainteresowanie w chorobie Alzheimera wzbudził dominujący w korze mózgu i hipokampie receptor muskarynowy M1, z powodu jego ważnej roli w procesach poznawczych, szczególnie w przypadku pamięci świeżej [35]. Godny uwagi jest fakt, że poziom receptorów M1 w chorobie Alzheimera jest stosunkowo niezmienną [35]; dlatego też receptory te mogą służyć jako punkt działania leków poprawiających procesy poznawcze (np. agonistów receptorów muskarynowych M1).

Ponieważ cholinergiczne receptory muskarynowe zostały znalezione w licznych i różnorodnych obszarach anatomicznych na obwodzie, włączając w to gruczoły wydzielania zewnętrznego [39], nie jest zaskakującym fakt, że agoniści receptorów muskarynowych zsyntetyzowani dla celów leczenia choroby Alzheimera, wywierają również wpływ na receptory obwodowe biorące udział w takich funkcjach, jak wydzielanie śliny czy łez. Szczególnie interesujące jest, że podczas klinicznych prób leczenia cewimeliną - agonistą receptorów muskarynowych (pierwotnie znaną pod nazwą AF102B) chorych z chorobą Alzheimera ślinienie obserwowane było jako działanie uboczne; obserwacja ta spowodowała podjęcie prób klinicznych z zastosowaniem cewimeliny, a następnie zatwierdzenie leku w leczeniu objawów suchości w jamie ustnej u pacjentów z zespołem Sjögrena.

Podtypy receptorów muskarynowych

Aktualnie wyróżnia się pięć oddzielnych podtypów cholinergicznych receptorów muskarynowych, od M1 do M5, kodowanych przez różne geny [omówienie w pozycji



Ryc. 4. (A) Schematy receptorów muskarynowych (mAChR) M1 i M3.

Każdy z tych receptorów posiada siedem domen przezbłonowych, ponadto domeny zewnątrzkomórkowe i wewnątrzcytoplazmatyczne. Domeny zewnątrzkomórkowe formują rodzaj kieszeni, do której przyłączane są neuroprzekaźniki, a domeny wewnątrzcytoplazmatyczne tworzą miejsca przyłączania różnych białek związanych z białkiem G. Połączenia z różnymi obszarami domeny zewnątrzkomórkowej wpływa wybiórczo na przyłączenie białek G do domen wewnątrzcytoplazmatycznych. Ta kompleksowa modulacja odpowiedzi na przyłączenie do domeny zewnątrzkomórkowej zależy od interakcji między białkami, które pojawiają się w części przezbłonowej łańcuchów polipeptydowych.

40 piśmiennictwa]. Wszystkie pięć podtypów należy do głównej rodziny komórkowych receptorów powierzchniowych łączących się z białkiem G i posiada siedem międzybłonowych domen helikalnych (przedstawione schematycznie na rys 4A). Gruczoły ślinowe zawierają głównie receptory M1 i M3, podczas gdy gruczoły łzowe wykorzystują głównie receptory M3 [41–44].

Na podstawie badań z wieloma syntetycznymi agonistami wydaje się, że na selektywność agonisty w stosunku do danego receptora ma wpływ wiele czynników [37]. Na przykład pobudzenie pojedynczych transfekowanych receptorów M1 lub M3 przez karbachol może powodować potencjalny wzrost stymulacji wszystkich odpowiedzi związanych z białkiem G (jak pokazano na ryc. 4B przez wydzielanie: 1,4,5-trójfosforanu inozytoli (IP₃), kwasu arachidonowego (AA), syntetazy tlenu azotu (NOS), fosfokinazy C (PKC) oraz cyklicznego monofosforanu adenozyliny (cAMP)). Działania te są związane są z pobudzeniem odpowiednio fosfolipazy C, fosfolipazy A₂ i cyklazy adenylowej. Wykazano również, że pobudzenie cholinergicznym receptorów muskarynowych podwyższa poziom wapnia wewnątrzkomórkowego, prawdopodobnie poprzez działanie 1,4,5-trójfosforanu inozytoli w następstwie wzmoczonej hydrolizy fosforanu inozytoli. Pobudzenie receptorów muskarynowych związane było również z otwarciem kanałów potasowych niewrażliwych na różnice potencjałów oraz z aktywacją dodatkowego zestawu przekaźników II rzędu (*second messenger*) związanych z kinazami zależnymi od stresu (znanymi również jako fosfokinazy aktywowane mitogenem, MAPK) na drodze pobudzenia fosfolipazy D i aktywacji tlenu azotu [40].

Na kompleksowość odpowiedzi receptorów muskarynowych na acetylocholinę (lub innych syntetycznych agonistów, jak cewimelina, karbachol, pilokarpina) wskazują różnice w odpowiedzi ścieżki związanej z białkiem

(B). Podtypy receptorów muskarynowych i ich substancje przekaźnikowe II rzędu.

Gruczoły ślinowe zawierają głównie receptory typu M1 i M3, które łączą się za pomocą białka G z fosfolipazą C (PLC), cyklazą adenylową (AC) i fosfolipazą A₂ (PLA₂). Następnie substancje przekaźnikowe II rzędu pobudzają glicerynian diacetylu (DAG) i fosfokinazę C (PKC), trójfosforan 1,4,5-inozytoli (IP₃) oraz cykliczny monofosforan adenozyliny (cAMP), kwas arachidonowy (AA) i fosfokinazę A (PKA).

G po przyłączeniu każdego z tych neuroprzekaźników do receptora M1 lub M3 na tej samej transfekowanej komórce. Na przykład przyłączenie któregoś z agonistów może stymulować pełne spektrum odpowiedzi ścieżki związanej z białkiem G lub jedynie niektóre z tych odpowiedzi (jak wytwarzanie IP₃ i kwasu arachidonowego, lecz nie cAMP) [37]. Sugerowano, że różnice między częściowymi i pełnymi agonistami zależą od rodzaju interakcji ligandu z poszczególnymi obszarami domen zewnątrzkomórkowych [37]. Każda z zewnątrzkomórkowych domen wydaje się być szczególnie związana z jedną lub więcej funkcją wewnątrzkomórkową białka G [45]. Tak więc wydaje się, że różne ligandy mogą łączyć się w subtelnie różny sposób z domenami receptorów zewnątrzkomórkowych tych samych receptorów muskarynowych. Hipoteza ta jest poparta przez mutacje w swoistych miejscach domen przezbłonowych (mianowicie Asp 105 w 3 spirali, Tyr 189 i Tyr 192 w spirali 5 oraz Tyr 381 w spirali 6) receptorów cholinergicznym M1, które mogą być spowodowane zmianą pełnego agonisty w częściowego agonistę [46–48]. Wyniki te wskazują, że sygnał wytwarzany po przyłączeniu do domeny zewnątrzkomórkowej jest modulowany przez interakcje łańcucha polipeptydowego w przezbłonowej części receptora polipeptydowego, co powoduje nieznaczne zmiany dostosowawcze w konformacji wewnątrz cytoplazmy, pozwalające na przyłączenie białka G, co w efekcie pozwala na kompleksowy wzór przekaźników II rzędu (*second messenger*).

Jak wspomniano wyżej, właśnie muskarynowe receptory cholinergiczne M1 i M3 posiadają trzy domeny wewnątrzcytoplazmatyczne, które są w sposób szczególny związane z różnymi domenami zewnątrzkomórkowymi (ryc. 4A). Tak, więc różne odpowiedzi na poszczególnego agonistę mogą zależeć od przyłączania ligandów do poszczególnych części pętli zewnątrzkomórkowych, modulacji na poziomie interakcji białek przezbłonowych

i preferencyjnego przyłączania protein związanych z białkiem G do trzech pętli wewnątrzcytoplazmatycznych. Kompleksowość receptora muskarynowego, z jego siedmioma domenami przezbłonowymi, prawdopodobnie powstała po to, by zapewnić całościową metodę modulacji sygnału na różnych drogach zależnych od receptorów związanych z białkiem G. Nawet w najprostszych systemie *in vitro*, kiedy receptory muskarynowe są transfekowane do komórek ssaków, pojedynczy podtyp receptora muskarynowego może mediuować różnorodne drogi transdukcji sygnału modulując w ten sposób i kontrolując systemy przekaźników drugiego rzędu (ryc. 4B) [49]. Prawdopodobne jest, że na odpowiedzi zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe powstające w wyniku pobudzenia cholinergicznymi receptorami muskarynowymi w gruczołach u osób z ZS wpływa obecność sygnałów z innych receptorów zaangażowanych w proces zapalny, jak receptory dla cytokin, chemokin, czynników wzrostu i cząsteczek macierzy komórkowej.

Receptory muskarynowe w zespole Sjögrena

Jak przedstawiono powyżej, podtypy receptorów M1 i M3 dominują w komórkach gronek i przewodów gruczołów ślinowych, podczas gdy receptory M3 dominują w gruczołach łzowych. Acetylocholinergiczne synapsy neuronalne w gruczołach mogą również zawierać VIP [50], który nasila działanie acetylocholinę [51] oraz pomaga utrzymać integralność gruczołową w prawidłowych gruczołach [20]. Dożylnie podanie VIP zwiększa odpowiedź na acetylocholinę u zdrowych myszy i zwiększa zawartość białek w wydzielinach u mysiego modelu ZS – nieotyłych myszy z cukrzycą. Mimo, że zarówno receptory M1, jak i M3 regulują procesy zewnątrzwydzielnicze na drodze aktywacji podobnych substancji przekaźnikowych (*second messenger*), maksymalne pobudzenie wydzielania wymaga jednoczesnego pobudzenia receptorów M1, M3, oraz receptorów dla VIP [41, 52]. Zarówno receptory M1, jak i M3 regulują wydzielanie zewnętrzne w gronkach, lecz dane wskazują, że receptory M3 nie wystarczają do wywołania maksymalnej odpowiedzi muskarynowej [42]. Co więcej, myszy nie posiadające receptorów muskarynowych M3 wykazywały wydzielanie śliny po stymulacji muskarynowej, co oznacza, że inne podtypy receptorów niż M1, są w stanie podtrzymać znaczne wydzielanie śliny [53]. Wyniki sprzeczne z omawianym badaniem opublikowali Matsui i wsp. [54] na innych typach myszy - pozbawionych receptorów muskarynowych M3, u których obserwowano istotne zmniejszenie wydzielania śliny po stymulacji muskarynowej. Jednakże w tym badaniu związki z ZS są dyskusyjne, jako że odwrotnie niż w ZS, myszy rodzaju męskiego wykazywały większe zmiany niż żeńskie.

Inną drogą, która wiąże receptor muskarynowy z funkcją wydzielniczą są akwaporyny (AQPs, *aquapor-*

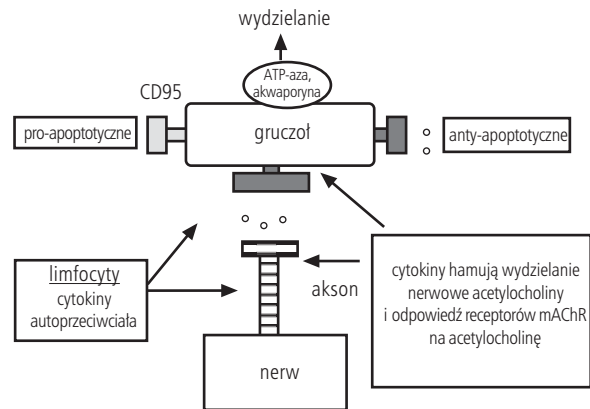
rins), które są swoistymi dla wody kanałami regulującymi jej ruchy przez szczytową powierzchnię błony wydzielniczej komórki. W gruczołach ślinowych i łzowych obecnych jest wiele kanałów, a szczególnie ważną rolę w wydzielaniu płynów odgrywa podtyp 5 (AQP5). W ZS obserwowano nieprawidłowy rozkład AQP5 w gruczołach ślinowych (raczej wewnątrzplazmatycznych niż na szczytowej powierzchni komórki), który prawdopodobnie ma znaczenie w niedoborze wydzielania płynu [55]. Godne uwagi jest, że względna liczba AQP5 oraz ich przemieszczenie do szczytowej błony komórki jest modulowane przez pobudzenie receptorów cholinergicznymi M3 [55]. Co więcej, u myszy pozbawionych AQP5 (*AQP5 knockout mice*) stymulowanie wydzielania śliny przez pilokarpinę było zmniejszone o ponad 60% w stosunku do myszy dzikich [omówienie w pozycji 56 piśmiennictwa]. Porównywano działanie acetylocholinę, pilokarpiny i cewimeliny (SNI-2011) na liczbę kanałów AQP5 w szczytowej błonie plazmatycznej w śliniankach przyszusnych u szczurów. Efekt działania acetylocholinę był natychmiastowy, lecz krótkotrwały, podczas gdy pilokarpina i cewimelina działały dłużej [57].

W tabeli II podano przegląd proponowanych faz patofizjologii ZS, lecz pełny opis każdej z nich przekracza ramy tej pracy. W skrócie, pierwotne uszkodzenie gruczołu może być spowodowane przez nawracające infekcje (zarówno wirusowe, jak i bakteryjne) lub przez wady genetyczne budowy gruczołu czy jego różnicowania, co prowadzi do powstawania potencjalnych autoantygenów [108-112]. W wyniku tego „uszkodzenia” uwalniane są chemokiny, co dodatkowo pobudza leukocyty do migracji (osiedlenia) do tkanek gruczołu poprzez adhezyjne cząsteczki obecne w naczyniach żylnych o wysokim śródbłonku; procesy te inicjują ogniskowy naciek limfocytów charakterystyczny dla ZS. Takie czynniki, jak zwiększenie ekspresji antygenów zgodności tkankowej (HLA) – DR/DQ na komórkach gruczołowych oraz ekspresja cząsteczek anty-apoptotycznych, jak bcl-2/bcl-x, na naciekających limfocytach utrwala ogniskowy naciek limfocytów. Początkowo naciekające limfocyty mają cechy limfocytów pomocniczych (Th) 1 typu, co oceniane było w oparciu o wydzielanie przez nie interferonu gamma (IFN- γ), podczas gdy w późniejszym okresie zapalenia wykrywane są limfocyty Th2 (wytwarzające IL-4) i komórki B. Już na najwcześniejszych etapach zapalenia gruczołów związanego z ZS, cytokiny są uwalniane nie tylko przez limfocyty, lecz również przez komórki gruczołowe gronek. W oparciu o ocenę mRNA we frakcjonowanych porcjach wycinków gruczołów pobranych od osób z ZS stwierdzono, że większość IL-1 oraz TNF- α otrzymano z elementów gruczołowych lub podścieliska, a nie z limfocytów [58]. Cytokiny, takie jak IL-1 lub TNF- α mogą bardzo znacznie obniżyć zdolność nerwów cholinergicznymi do uwalniania acetylocholinę w odpowiedzi na pobudzenie cholinergicznymi receptorami

Tabela II. Etapy rozwoju patogenetycznego zespołu Sjögrena

- I. Czynniki genetyczne i środowiskowe
 - A. Nieprawidłowości rozwoju gruczołów [104, 107-112]
 - B. Czynniki genetyczne, włączając allele HLA-DR i TNF [113-117]
 - C. Płeć żeńska [106, 123, 124]
 - D. Pomimo braku relacji przyczynowych, pośrednie dane wskazują na czynniki wirusowe, w tym wirus Epstein-Barr lub fragmenty retrowirusów [118-122]
- II. Wczesna faza choroby gruczołu, przed rozwojem ogniskowych nacieków limfocytarnych
 - A. Uwalnianie cytokin i chemokin przez komórki gruczołu oraz naczyń [125, 126, 140, 146]
 - B. Zmiany w komórkach śródbłonna naczyń oraz ekspresja komórkowych cząsteczek adhezyjnych [127-129]
- III. Nacieki limfocytarne w gruczole
 - A. We wczesnej fazie nacieku limfocytarnego w ogniskach dominują komórki CD4+ (o profilu Th-1) [58, 130-136]
 - B. Interferon- γ , interleukina-1, interleukina-6 [25, 136-139]
 - C. Zwiększenie HLA-DR/DQ na komórkach gruczołowych oraz bcl-2/bcl-x w limfocytach i komórkach gruczołowych, co opóźnia apoptozę [136]
 - D. Późna migracja limfocytów o profilu Th-2 (IL-4) oraz komórek B do ognisk limfocytarnych [58, 130-136]
- IV. Inne prawdopodobne czynniki wydzielane przez limfocyty i komórki gruczołowe związane z zaburzeniem czynności gruczołów
 - A. Miejscowa produkcja przez komórki B przeciwciał przeciw lamininie i fodrynie - antygenom występującym w zespole Sjögrena, oraz receptorom muskarynowym M3 [69, 107, 112, 141-154]
 - B. Uwalnianie metaloproteinaz [103-105, 146]
 - C. Zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego
 - zapalenie naczyń [98, 99]
 - zaburzenia osi przysadkowo-podwzgórzowo-nadnerczowej [163]
- V. Zniszczenie tkanki gruczołowej i zahamowanie wydzielania gruczołowego
 - A. Apoptoza elementów gruczołowych (granzym A / perforyna) w ogniskach nacieków limfocytarnych [24]
 - B. Ligandy Fas/Fas zarówno w ogniskach nacieku, jak i w otaczających gronkach i przewodach [25, 100, 113, 146]
 - C. Utrata unerwienia w obszarach ogniskowych nacieków limfocytarnych [30]
 - D. Wzrost wydzielania tlenu azotu spowodowany uwolnieniem cytokin [147]
 - E. Zmniejszone wydzielanie acetylocholin w zakończeniach nerwowych spowodowane uwalnianiem cytokin [102, 148]
 - F. Utrata odpowiedzi gronek na acetylocholinę spowodowana uwalnianiem cytokin [66]

muskarynowych [59-62] (ryc. 5). Na przykład INF- γ lub TNF- α aktywują substancje przekaźnikowe II rzędu, takie jak kaskada kinaz JAK/STAT [63]. Ponieważ wiązanie receptorów muskarynowych przez przekaźniki II rzędu odbywa się z udziałem białka G [64], a następnie fosfokinaz aktywowanych mitogenem (MAPK), mechanizm, w którym cytokiny hamują wydzielanie może być regulowany przez przekaźniki II rzędu [65]. Ta sama kaskada kinaz stymulujących i hamujących, która jest aktywowana przez receptory muskarynowe lub komórki nerwowe, pozostaje pod wpływem sygnałów z receptorów dla czynników wzrostu, cytokin, chemokin, inhibitorów syntetazy NO i CD95. Również odpowiedź receptorów muskarynowych w komórkach gronek jest w istotny sposób regulowana przez pobudzenie receptorów związanych ze stresem. Na przykład 50-60% spadek odpowiedzi na karbachol, który obserwowano w hodowlach komórkowych gruczołów ślinowych, powodowany był przez pobudzenie receptora CD95 [66]. Tak, więc zapalenie w warunkach mikrośrodowiska



Ryc. 5. Mechanizmy uszkodzenia czynności wydzielniczej w zespole Sjögrena.

Naciekające limfocyty i komórki gruczołowe uwalniają cytokiny, w tym IL-1, IL-6 i TNF- α , które zaburzają zarówno wydzielanie acetylocholinę z włókien cholinergicznnych, jak i odpowiedź receptorów muskarynowych na działanie substancji neuroprzekaźnikowej w komórce gruczołowej. Każda z tych cytokin łączy się ze swoistym dla siebie receptorem (nie pokazano) na nerwie lub gruczole i pobudza drogi zależne od stresu, w tym aktywowane mitogenem kinazy proteinowe i kaskadę tlenu azotu. Także aktywacja ligandów Fas/Fas (CD95) może przerwać tworzenie wtórnych sygnałów niezbędnych do wydzielania, jak również zapoczątkować apoptozę. Komórki B w gruczolach mogą uwalniać przeciwciała przeciw receptorom M3, antygenom typowym dla zespołu Sjögrena, fodrynie i innym cząsteczkom, które mogą modulować czynność wydzielniczą. Uwolnienie metaloproteinaz w ognisku zapalenia prowadzi do rozpadu cząsteczek, takich jak fibronektyna i witronektyna, które są ważne dla kierunku rozwoju gruczołów oraz ich czynności wydzielniczej. Pod wpływem stresowych cytokin zapalnych i zmiennej transdukcji sygnałów „z zewnątrz do wewnątrz” (interakcje macierzy komórkowej) mechanizmy wydzielnicze, takie jak transport wody, działanie pompy sodowo-potasowej, ATPaz, stają się nieefektywne. W wyniku nieprawidłowości wydzielniczych zachodzących w mikrośrodowisku zapalnym pacjent zaczyna odczuwać objawy suchości.

gruczołów zmienionych w przebiegu ZS prawdopodobnie prowadzi do „wymiany informacji” między przekaźnikami II rzędu na wielu poziomach, co może zmniejszać uwalnianie acetylocholinę z neuronów lub osłabiać odpowiedź z komórek gronek/przewodów na sygnał z cholinergicznnych receptorów muskarynowych. W wyniku tych interakcji w mikrośrodowisku zapalnym w ZS zmniejszenie czynności wydzielniczej gruczołów może prowadzić do objawu suchości.

Dodatkowa droga, na której limfocyty mogą hamować odpowiedź wydzielniczą w ZS związana jest z wytwarzaniem przeciwciał przeciwko receptorom cholinergicznym M3. W 1996 roku Barman i wsp. wykazali, że surowica pobrana od osób z ZS może pobudzać receptory cholinergiczne M3 komórek ślinianek przyusznych szczurów [67]. Następne badania w 1988 r. przeprowadzone przez Robinson i wsp. [68] wykazały, że wstrzyknięcie nieotyłej myszy z cukrzycą (model myszy zespołu Sjögrena u ludzi) surowicy pobranej od chorych osób prowadzi do utraty czynności wydzielniczej. Ostatnio, w badaniu prospektywnym przeprowadzonym przez Barmana i wsp. wykazano metodami immunofluorescencji oraz oznaczania przyłączenia ligandów, że immunoglobulina G (IgG) otrzymana z surowicy pacjentów z pierwotnym ZS hamuje proces wiązania z receptorami M3 w pozaoczdolowych gruczolach ślinowych szczura [69].

W badaniu przeprowadzonym przez Watermana i wsp. surowica pobrana od osób z pierwotnym i wtórnym ZS wykazywała zdolność do zahamowania neuroprzewodnictwa w układzie autonomicznym oraz do kurczenia mięśni gładkich w izolowanych pasmach pęcherza, co sugeruje obecność autoprzeciwciał przeciw receptorom M3 [70]. Jednakże nie udowodniono dotychczas *in vivo* właściwości oddziaływania tej surowicy z ludzkimi receptorami cholinergicznymi M3. Na przestrzeni lat testowano różne metody oznaczeń, w tym immunofluorescencyjne, immunobloting, biblioteki bakteriofagów, w celu wykrycia swoistych antygenów dla gruczołów ślinowych lub łzowych człowieka; metody te mogłyby służyć do wykrywania muskarynowych receptorów cholinergicznymi. Tak czy inaczej, możliwym jest, że osoby z ZS wytwarzają autoprzeciwciała przeciw receptorom M3 zarówno w procesie pierwotnym, jak i w konsekwencji toczącego się w gruczole procesu zapalnego. Nawet, jeżeli przeciwciała te nie powodują zniszczenia receptorów M3, mogą blokować efektywną stymulację receptora przez acetylocholinę. Znalezienie w ślinie pacjentów z ZS autoprzeciwciał przeciw ludzkim receptorom muskarynowym M3 potwierdziłoby teorię, że zespół ten należy do grupy chorób autoimmunizacyjnych, takich jak miażdżenie lub choroba Gravesa. Zespół Sjögrena mógłby być wtedy skuteczniej leczony jako choroba komórek B powstająca w wyniku oddziaływania swoistych autoprzeciwciał. Przeciwnie bowiem, aktualne podejście do patogeny/lечения choroby nakierowane jest na nieprawidłową odpowiedź komórek T w stosunku do autoantygenów, do której dochodzi w szczególnym mikrośrodkowisku cytokin i chemokin.

Agoniści receptorów muskarynowych w leczeniu pacjentów z zespołem Sjögrena.

Zespół Sjögrena leczy się zarówno miejscowo, jak i ogólnie, jak to przedstawiono w tabeli III. Leczenie miejscowe oczu polega na edukacji pacjenta (unikanie suchego, wietrznego lub zadymionego środowiska) [71], stosowaniu substancji nawilżających gałkę oczną [72], punktowej okluzji [73, 74], podawaniu miejscowych kropli steroidowych bez konserwantów [75], podawaniu sztucznych „łez” przygotowywanych z surowicy pacjenta [76, 77] oraz miejscowym podawaniu kropli z cyklosporyną [78]. Leczenie suchości w ustach obejmuje intensywne zabiegi higieniczne jamy ustnej, stosownie „sztucznej śliny” i leczenie próchnicy oraz grzybic [79]. Leczenie ogólnoustrojowe takimi lekami, jak kortykosteroidy może zwiększyć wydzielanie śliny, lecz jest związane z przewlekłymi objawami ubocznymi, które przeważają nad korzyściami wynikającymi z leczenia [80, 81]. Leki ogólne obejmujące preparaty przeciwmalaryczne, metotreksat, cyklosporynę, azatioprynę i cyklofosfamid (tab. III) są użyteczne w przypadku występowania w przebiegu choroby zapalenia stawów, zapalenia płuc, zapalenia

Tabela III. Podejście terapeutyczne w zespole Sjögrena

I. Objawy oczne
A. Sztuczne łzy/ nawilżacze [9, 71, 72]
B. Opatrunki okluzyjne [74]
C. Miejscowo cyklosporyna ^{a/} [78]
D. Miejscowo PY2R ^{a/}
II. Objawy ze strony jamy ustnej
A. Higiena zębów/ fluorowanie
B. Miejscowe stymulanty (żele) [79]
C. Agoniści receptorów muskarynowych (pilokarpina, cewimelina) [84, 89, 94, 149-155]
D. Leczenie przeciwgrzybicze
III. Terapia ogólnoustrojowa
A. Steroidy/ leki niesteroidowe [80]
B. Leki przeciwreumatyczne modyfikujące przebieg choroby [80]
C. Hydroxychloroquine [156]
D. Metotreksat [158]
E. Cyklosporyna/ azatiopryna [157, 159]
F. Modele zwierzęce
Leflunomide ^{b/} [160, 161]
Inhibitory TNF ^{b/} [162]

^{a/} protokoły badawcze w opracowaniu
^{b/} badania na zwierzętach

nerek i objawów neurologicznych, jednakże ich działanie na wzrost wydzielania śliny lub łez jest stosunkowo niewielkie [80].

Przedstawiony przegląd danych literaturowych skoncentrowany jest na możliwościach zastosowania pilokarpiny i cewimeliny dla pobudzenia cholinergicznymi receptorów muskarynowych. Mimo, iż pierwotnie przypuszczano, że związki te wywołują korzystny efekt przez przyłączenie się do receptorów cholinergicznymi M3 i pobudzanie wydzielania wody, większość ostatnich publikacji wskazuje, że istotne są dodatkowe korzyści wynikające z łączenia się tych preparatów z receptorami M1, takie jak zapobieganie apoptozie czy zmniejszanie niszczącego działania cytokin prozapalnych [36].

Najwięcej badań u chorych z ZS przeprowadzonych zostało z zastosowaniem pilokarpiny, jako że związek ten jest dostępny od ponad 100 lat. U pacjentów otrzymujących pilokarpinę szczytowe stężenie leku w osoczu (15 g/mL) jest uzyskiwane 1,25 godziny po podaniu dawki 5 mg. Stopień absorpcji zmniejszył się, gdy lek był podawany wraz z pokarmem. Pilokarpina eliminowana jest głównie z moczem, a jej okres półtrwania wynosi 0,76 godziny [82]. W pierwszym badaniu przeprowadzonym przez Fox i wsp. [83] u 31 pacjentów z ZS podawano chorem przez 5 miesięcy chlorek pilokarpiny (5 mg kapsułki, trzy razy dziennie), a badanie było randomizowane *placebow* podwójnie ślepej próbie. Co miesiąc szacowano w obiektywnych pomiarach wydzielanie głównych gruczołów ślinowych, subiektywne uczucie wilgotności w ustach, objawy uboczne związane z leczeniem oraz szereg parametrów fizjologicznych. Pilokarpina istotnie nasilała wydzielanie śliny u 21 z 31 pacjentów. Subiektywną poprawę w odniesieniu do uczucia suchości w ustach, poprawę mówienia, żucia i połykania zgłaszało 27 pacjentów. Objawy uboczne,

jakkolwiek częste, były łagodne i do zaakceptowania przez pacjentów. Nie wykazano istotnych zmian w parametrach pracy układu sercowo-naczyniowego czy innych wskaźnikach fizjologicznych. Jednakże mierzalny wzrost wydzielania śliny obserwowano jedynie u 21 pacjentów, co wskazuje na istnienie grupy osób, u których subiektywna poprawa nie pokrywa się z obiektywnym wzrostem wydzielania śliny. Tylko dwóch pacjentów zrezygnowało z udziału w badaniach z powodu objawów ubocznych [83]. Nie obserwowano narastania tolerancji na agonistów receptorów muskarynowych. Zdziwienie budzi fakt, że odpowiedź w wydzielaniu śliny była bardziej widoczna, niż korzyści dotyczące objawów ze strony oka, mimo że cholinergiczne receptory muskarynowe M3 obecne są w zarówno w gruczołach ślinowych, jak i w łzowych. Tak, więc na obniżoną odpowiedź na pilokarpinę ze strony gruczołów łzowych muszą wpływać dodatkowe czynniki; na przykład nieznaczne różnice w budowie receptorów cholinergicznych M3 w gruczołach łzowych, mogące wynikać z posttranslacyjnych modyfikacji (tj. glikozylacji) domen zewnątrzkomórkowych receptorów M3, a zmiany te mogą wpływać na przyłączenie agonisty. Pomimo, iż nie ma dowodów na istnienie takich zmian w gruczołach łzowych, wykazano, że inne białka mózgu mają różne modyfikacje posttranslacyjne w zakresie ich glikozylacji, co wynika z uprzywilejowanego rozmieszczenia poszczególnych glikozylotransferaz w poszczególnych tkankach. Z drugiej strony, przyłączenie pilokarpiny do cholinergicznego receptora muskarynowego M2 lub receptorów adrenergicznych na miejscowych naczyniach krwionośnych gruczołu łzowego dla wywołania skurczu naczyń, może niweczyć pozytywny wpływ związany z pobudzeniem receptorów muskarynowych M3.

Następnie opublikowano dodatkowe badania, w których stosowano pilokarpinę w leczeniu zarówno suchości jamy ustnej w ZS, jak i indukowanej napromienianiem. W pilotażowej próbie, w oparciu o którą FDA zatwierdziło pilokarpinę (Salagen) do leczenia, badaniami objęto 373 pacjentów z ZS [84], stosując u nich pilokarpinę w dawkach 2,5 i 5 mg przez 12 tygodni trzy razy dziennie bądź podając placebo. Objawy oceniano w badaniu kwestionariuszowym z zastosowaniem wizualnej skali analogowej lub stosując ich kategoryzację. Istotnie większy odsetek popraw uzyskano w grupie osób przyjmujących 5 mg pilokarpiny w stosunku do grupy placebo ($p \leq 0,01$) w całościowej ocenie objawów suchości jamy ustnej, oczu i innych objawów suchości ($p \leq 0,05$). W grupie otrzymującej 2,5 mg pilokarpiny wykazano tendencję do poprawy, lecz efekt nie był tak widoczny, jak w grupie otrzymującej 5 mg. Przepływ śliny był istotnie wzmożony dwa do trzech razy ($p \leq 0,001$) po podaniu pierwszej dawki i utrzymywał się podczas całego, dwunastotygodniowego leczenia [84]. Najczęstszym objawem ubocznym było pocenie się, nie zgłaszano natomiast żadnych poważnych objawów ubocznych związanych z lekiem.

Cewimelina, pierwotnie opisywana w literaturze neurologicznej jako AF102B, terapeutyk stosowany w chorobie Alzheimerera, jest strukturalnie pierścieniowym analogiem acetylocholiny (ryc. 3) [36, 85]. Lek ten opisywano również w literaturze jako SNI-2011 podczas prac badawczych prowadzonych przez japońską firmę *SnowBrand Pharmaceutical Co.* W USA jest przepisywany w leczeniu suchości w ustach u pacjentów z zespołem Sjögrena pod nazwą *Evovac*. Mimo, iż cewimelina oryginalnie przeznaczona była do pobudzania receptorów cholinergicznych M1 [86-88], wczesne stwierdzenie w trakcie badań II fazy nad chorobą Alzheimerera jej wpływu na wydzielanie śliny doprowadziło do wykrycia zdolności do pobudzania przez ten związek zarówno receptorów M3 jak i M1, a w konsekwencji jej zastosowanie w chorobie Sjögrena [89]. Dane kliniczne dotyczące pobudzania wydzielania śliny przez cewimelinę nie zostały jeszcze opublikowane, lecz są dostępne w materiałach informacyjnych firmy farmaceutycznej [90]. Wyniki badań nad wzrostem wydzielania śliny i łez były również prezentowane w formie streszczeń [89,91]. W prowadzonej przez 6 tygodni randomizowanej, podwójnie ślepej i kontrolowanej placebo próbie obejmującej 75 pacjentów z ZS, o średnim wieku 53,6 lat, podawanie trzy razy dziennie 30 mg cewimeliny powodowało statystycznie istotną ogólną poprawę objawów [90]. W grupie tej 76% pacjentów zgłaszało znaczną lub bardzo znaczną ogólną poprawę suchości ust w porównaniu do 35% osób w grupie otrzymującej placebo. Podniesienie dawki leku do 60 mg trzy razy dziennie nie powodowało dodatkowych korzyści i w następnych amerykańskich badaniach utrzymano dawkę 30 mg podawaną trzy razy dziennie [90].

Tabela IV. Porównanie właściwości cewimeliny i pilokarpiny (badania przedkliniczne)

	Cewimelina	Pilokarpina
Wchłanianie	$T_{max} = 1,5$ h	$T_{max} = 1,25$ h
Okres półtrwania	90 min	20 min
Powinowactwo do receptorów muskarynowych M3	1,2 M ^{a/}	4,6 M

^{a/} mierzone jako stężenie dla 50% zahamowania przyłączenia [³H] quinuclidinyl benzilate do transfekowanych komórek jajnikowych chińskiego chomika

Porównanie pilokarpiny i cewimeliny

Nie przeprowadzono dotychczas prac, w których porównano by wprost działanie pilokarpiny i cewimeliny u osób z ZS w badaniu z podwójnie ślepą próbą. Jednakże z badań farmakokinetycznych wyraźnie wynika, że cewimelina ma dłuższy okres półtrwania niż pilokarpina (odpowiednio $1,5 \pm 1$ h i 0,76 h) [90-92].

Gdy porównywano pilokarpinę i cewimelinę u szczurów i psów pod względem zakresu dawki, która wywołuje podobnie nasilone pobudzenie wydzielania śliny, wydzielanie indukowane przez cewimelinę trwało od 1,4 do 1,8 razy dłużej (szczury) i 2 razy dłużej (psy), niż w przypadku pilokarpiny. Poziom leku w cytoplazmie

wystarczający do nasilenia wydzielania śliny o 0,4 ml/min lub więcej utrzymywał się przez ponad 90 min. w przypadku cewimeliny w porównaniu do poniżej 20 min. dla pilokarpiny [93]. W tym samym badaniu pilokarpina, w odróżnieniu do cewimeliny powodowała nadciśnienie, przyspieszoną czynność serca, skurcz oskrzeli i biegunkę. Należy jednak zaznaczyć, że te potencjalne objawy uboczne w postaci nadciśnienia, skurczu oskrzeli, przyspieszonej czynności serca nie stanowiły istotnego problemu klinicznego osób z ZS leczonych pilokarpiną podczas ostatnich kilku lat, w czasie których lek był dostępny. Głównym ograniczeniem w zastosowaniu zarówno pilokarpiny, jak i cewimeliny u osób z ZS pozostaje pocenie się, choć w leczeniu cewimeliną może ono być trochę łatwiej kontrolowane przez obniżenie dawki. Zmniejszenie dawki cewimeliny pozwala na osiągnięcie akceptowanego przez pacjentów kompromisu odnośnie wydzielania śliny (bez nadmiernego pocenia się), z powodu bardziej stopniowego początku działania oraz dłuższego czasu utrzymywania się efektu klinicznego po podaniu leku [90, 92]. Dla porównania, w przypadku pilokarpiny często trudno jest ustalić odpowiednią dawkę u chorych z ZS pozwalającą na utrzymanie korzyści płynących ze wzrostu wydzielania śliny (bardziej gwałtowny początek działania i krótszy czas działania), lecz jednocześnie nie powodującej nasilonego pocenia się. Teoretycznie problem ten można rozwiązać poprzez wprowadzenie kapsułek uwalniających zawartość w odstępach czasu z szerszym zakresem dostępnych dawek.

Uważa się, że prowokowanie nawyku żucia u szczurów stanowi model choroby Parkinsona i wiąże się ze stymulacją cholinergicznymi receptorami muskarynowymi M4. Cewimelina nie pobudza nawyku żucia u szczurów, nawet w dawce 100 razy większej od tych, które są efektywne w leczeniu zaburzeń pamięci w różnych modelach choroby Alzheimera. Dla porównania, pilokarpina wywołuje nawyk żucia w niskich dawkach w wyniku pobudzenia receptorów cholinergicznymi M4 [87]. Tak, więc dla klinicystów istotne jest ostrożne stosowanie agonistów receptorów muskarynowych, które mogą wywoływać długotrwałe skutki uboczne w wyniku pobudzenia dodatkowych receptorów w ośrodkowym układzie nerwowym.

Powinowactwo do receptorów M3 jest około cztery razy większe dla cewimeliny, niż dla pilokarpiny, co ustalono w przypadku błony gruczołowej podżuchwowej/podjęzykowej szczurów. Cewimelina ma od 10 do 100 razy mniejsze działanie pobudzające receptory muskarynowe M2 i M4 w stosunku do pilokarpiny, w dawce powodującej podobne pobudzenie receptorów M3 [94].

Cewimelina może również działać protekcyjnie w przypadku wystąpienia dysfunkcji/apoptozy gruczołów poprzez jej działanie agonistyczne na receptory M1. Na mysim modelu MLR/lpr zespołu Sjögrena cewime-

lina wzmagala wydzielanie śliny. Co więcej, w gruczołach ślinowych wykazano nieznaczne odwrócenie zaniku tkanek po podaniu tego leku; efekt ten nie był obserwowany po podawaniu zwierzętom pilokarpiny. Dodatkowo stymulacja receptorów M1 przez cewimelinę zapobiegała, przez zahamowanie aktywacji kaspaz, apoptozie spowodowanej przez takie bodźce, jak niedobór czynników wzrostu [95]. Ponadto, pobudzenie przez cewimelinę receptorów M1 hamuje drogę MAPK/ERK indukowaną przez stres [95]. Ponieważ cewimelina ma większą aktywność w stosunku do receptorów M1 niż pilokarpina [37], skutki pobudzania receptorów M1 przez cewimelinę mogą być korzystne w stosunku do działania CD95 i innych mechanizmów mediowanych w gruczołach stymulowanych przez stres u chorych z ZS.

Inne skutki działania cewimeliny w porównaniu do pilokarpiny

Ważną rolę w patogenezie zespołu Alzheimera odgrywa tworzenie płytek amyloidu. Amyloid β ($A\beta$) może być toksyczny dla neuronów, a jego tworzenie jest prawdopodobnie zmniejszane przez pobudzenie receptorów cholinergicznymi M1, wzrasta natomiast po pobudzeniu receptorów M2 [87, 88, 97]. Cewimelina dzięki właściwości pobudzania receptorów M1, może hamować tworzenie amyloidu β i pomaga w zachowaniu integralności neuronów, dając efekt podobny do tego, jaki ma czynnik wzrostu nerwów [97]. Może to być wynikiem jej zdolności do nasilania wydzielania rozpuszczalnego, nieamyloidogenicznego białka prekursorowego [87]. Na przykład u królików, u których sekwencja amyloidu β jest identyczna jak u ludzi, cewimelina blokuje wytwarzanie $A\beta$ [96] poprzez nasilanie aktywności β -sekretazy i hamowanie α -sekretazy [97]. W ostatnim badaniu u chorych na chorobę Alzheimera otrzymujących cewimelinę, u 14 z 19 osób poziom β -amyloidu w płynie mózgowo-rdzeniowym był istotnie obniżony o 22% [97]. Dla porównania poziom β -amyloidu w płynie mózgowo-rdzeniowym nie zmieniał się po leczeniu inhibitorem acetylocholinoesterazy – fizostyginą lub lekiem przeciwwzapalnym – chydroksychlorochiną [97]. Wyniki te, w połączeniu z korzystnym działaniem AF102B (cewimeliny) na funkcje poznawcze sugerują, że lek ten może mieć znaczenie w przyszłości w leczeniu zaburzeń pamięci związanych z wiekiem u osób z zespołem Sjögrena.

Wnioski

Wytwarzanie śliny i łez wymaga integracji czynności układu nerwowego, naczyniowego, hormonalnego i zewnątrzwydzielniczego, dlatego nie dziwi, że zaburzenia w wytwarzaniu śliny i łez obecne w ZS aktualnie uważa się za związane z nieprawidłowościami w układzie neurohormonalnym i immunologicznym. Udowodniono,

że zastosowanie agonistów receptorów muskarynowych, takich jak pilokarpina i cewimelina, które działają poprzez receptory M3 i M1, ma dużą wartość terapeutyczną w zmniejszaniu takich objawów, jak suchość jamy ustnej i oczu, występujących w zespole Sjögrena. Poza pobudzeniem czynności wydzielniczej, stymulowanie tych receptorów może być pomocne w zapobieganiu apoptozie oraz optymalizować czynność przetrwałych komórek gruczołowych.

Zespół Sjögrena może przebiegać z towarzyszącymi zaburzeniami neurologicznymi dotyczącymi zarówno układu ośrodkowego, jak i obwodowego. Skargi na osłabienie

funkcji poznawczych są częste wśród pacjentów z ZS i z reguły obejmują trudności w zapamiętywaniu i zaburzenia koncentracji. Jeżeli zaburzenia poznawcze w przebiegu ZS są wynikiem hypofunkcji włókien cholinergicznego ośrodkowego układu nerwowego, zmiany te mogą być leczone, z zasady agonistami receptorów muskarynowych M1 [37]. Wydaje się, że cewimelina może poprawiać niektóre nieprawidłowości poznawcze związane z zaburzeniami w ośrodkowym układzie nerwowym u chorych z ZS, jak również w innych chorobach autoimmunizacyjnych, takich jak toczeń rumieniowaty układowy czy fibromialgia.

Piśmiennictwo

- Daniels TE, Whitcher JP. Association of patterns of labial salivary gland inflammation with keratoconjunctivitis sicca: Analysis of 618 patients with suspected Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 869-877.
- Vitali C. Criteria for the classification of Sjögren's syndrome. w: *Primer on the Rheumatic Diseases* 1998; 11th ed. (appendix): 458.
- Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. A unified theory of the role of the ocular surface in dry eye. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 643-651.
- Nelson JD. Diagnosis of keratoconjunctivitis sicca. *Int Ophthalmol Clin* 1994; 34: 37-56.
- Nelson JD, Havener VR, Cameron JD. Cellulose acetate impressions of the ocular surface: Dry eye states. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 1869-1872.
- Atkinson JC, Travis WD, Pillemer SR, Bermudez D, Wolff A, Fox PC. Major salivary gland function in primary Sjögren's syndrome and its relationship to clinical features. *J Rheumatol* 1990; 17: 318-322.
- Craig JP, Tomlinson A. Importance of the lipid layer in human tear film stability and evaporation. *Optom Vis Sci* 1997; 74: 8-13.
- Danjo Y, Hamano T. Observation of precorneal tear film in patients with Sjögren's syndrome. *Acta Ophthalmol Scand* 1995; 73: 501-505.
- Lemp MA. Tear film: New concepts and implications for the management of the dry eye. *Trans New Orleans Acad Ophthalmol* 1987; 35: 53-64.
- Fox RI. Sjögren's syndrome: Pathogenesis and new approaches to therapy. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 891-902.
- Jaanus SD. Ocular side effects of selected systemic drugs. *Optom Clin* 1992; 2: 73-96.
- Atkinson JC, Fox PC. Salivary gland dysfunction. *Clin Geriatr Med* 1992; 8: 499-511.
- Ship JA, De Carli C, Friedland RP, Baum BJ. Diminished submandibular salivary flow in dementia of the Alzheimer type. *J Gerontol* 1990; 45: M61-M66.
- Greenspan J, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjögren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 37: 217-229.
- Baum BJ. Salivary gland fluid secretion during aging. *J Am Geriatr Soc* 1989; 37: 453-458.
- Ship JA, Baum BJ. Is reduced salivary flow normal in old people? *Lancet* 1990; 336: 1507.
- Baum BJ. Neurotransmitter control of secretion. *J Dent Res* 1987; 66: 628-632.
- Ekstrom J. Autonomic control of salivary secretion. *Proc Finn Dent Soc* 1989; 85: 323-331.
- Zoukhri D, Kublin CL. Impaired neurotransmitter release from lacrimal and salivary gland nerves of a murine model of Sjögren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 925-932.
- Eva C, Meek JL, Costa E. Vasoactive intestinal peptide which coexists with acetylcholine decreases acetylcholine turnover in mouse salivary glands. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232: 670-674.
- Tornwall J, Uusitalo H, Hukkanen M, Sorsa T, Konttinen YT. Distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) and its binding sites in labial salivary glands in Sjögren's syndrome and in normal controls. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12: 287-292.
- Hodges RR, Zoukhri D, Lightman JP, Dartt DA. Identification and cellular localization of the components of the VIP signaling pathway in the lacrimal gland. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 169-176.
- Fox R, Tornwall J, Michelson P. Current issues in the diagnosis and treatment of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11: 364-371.
- Alpert S, Kang HI, Weissman I, Fox RI. Expression of granzyme A in salivary gland biopsies from patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1046-1054.
- Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T I wsp. Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 87-97.
- Ohlsson M, Skarstein K, Bolstad AI, Johannesen AC, Jonsson R. Fas-induced apoptosis is a rare event in Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 2001; 81: 95-105.
- Andoh Y, Shimura S, Sawai T, Sasaki H, Takishima T, Shirato K. Morphometric analysis of secretory glands in Sjögren's syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1358-1362.
- Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 147-156.
- Daniels TE, Fox PC. Salivary and oral components of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 571-583.
- Konttinen YT, Sorsa T, Hukkanen M i wsp. Topology of innervation of labial salivary glands by protein gene product 9.5 and synaptophysin immunoreactive nerves in patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1992; 19: 30-37.
- Konttinen Y, Hukkanen M, Kemppinen P i wsp. Peptide containing nerves labial salivary glands in Sjögren's syndrome. *Arth Rheum* 1992; 30: 15-20.

31. Pflugfelder SC, Huang AJ, Feuer W, Chuchovski PT, Pereira IC, Tseng SC. Conjunctival cytologic features of primary Sjögren's syndrome. *Ophthalmology* 1990; 97: 985-991.
32. Jones DT, Monroy DJ, Z, Pflugfelder SC. Alterations of ocular surface gene expression in Sjögren's syndrome. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 533-536.
33. Walcott B, Cameron RH, Brink PR. The anatomy and innervation of lacrimal glands. *Adv Exp Med Biol* 1994; 350: 11-18.
34. Dai Y, Baum BJ. Relationship between muscarinic receptor occupancy and response in rat parotid acinar cells. *Am J Physiol* 1993; 265(6 pt 1): G1122-G1127.
35. Fisher A, Heldman E, Ourwitz D i wsp. M1 agonists for the treatment of Alzheimer's disease: Novel properties and clinical update. *Ann NY Acad Sci* 1996; 777: 189-196.
36. Fisher A. Therapeutic strategies in Alzheimer's disease: M1 muscarinic agonists. *Jpn J Pharmacol* 2000; 84: 101-112.
37. Fisher A, Barak D. Progress and perspectives in new muscarinic agonists. *Drug News Perspect* 1994; 8: 453-464.
38. Fisher A. Muscarinic agonists for the treatment of Alzheimer's disease: Progress and perspectives. *Expert Opin Invest Drugs* 1997; 6: 1395-1411.
39. Camusso JJ, Sterin-Borda L, Rodriguez M, Bacman S, Borda E. Pharmacological evidence for the existence of different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors for phosphoinositide hydrolysis in neonatal versus adult rat atria. *J Lipid Mediators Cell Signalling* 1995; 12: 1-10.
40. Felder CC, Bymaster FP, Ward J, Delapp N. Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem* 2000; 43: 4333-4353.
41. Luo W, Latchney LR, Culp DJ. G protein coupling to M1 and M3 muscarinic receptors in sublingual glands. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C884-C896.
42. Culp DJ, Luo W, Richardson LA, Watson GE, Latchney LR. Both M1 and M3 receptors regulate exocrine secretion by mucous acini. *Am J Physiol* 1996; 271(6 pt 1): C1963-C1972.
43. Mei L, Roeske WR, Izutsu KT, Yamamura HI. Characterization of muscarinic acetylcholine receptors in human labial salivary glands. *Eur J Pharmacol* 1990; 176: 367-370.
44. Levey AI. Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci* 1993; 52: 441-448.
45. Fisher A. Muscarinic receptor agonists in Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 1999; 12: 197-214.
46. Kostenis E, Zeng FY, Wess J. Structure-function analysis of muscarinic acetylcholine receptors. *J Physiol (Paris)* 1998; 92: 265-268.
47. Wess J, Blin N, Mutschler E, Bluml K. Muscarinic acetylcholine receptors: Structural basis of ligand binding and G protein coupling. *Life Sci* 1995; 56: 915-922.
48. Liu J, Blin N, Conklin BR, Wess J. Molecular mechanisms involved in muscarinic acetylcholine receptor-mediated G protein activation studied by insertion mutagenesis. *J Biol Chem* 1996; 271: 6172-6178.
49. Gurwitz D, Haring R, Heldman E, Fraser CM, Manor D, Fisher A. Discrete activation of transduction pathways associated with acetylcholine m1 receptor by several muscarinic ligands. *Eur J Pharmacol* 1994; 267: 21-31.
50. Sibony PA, Walcott B, McKeon C, Jakobiec FA. Vasoactive intestinal polypeptide and the innervation of the human lacrimal gland. *Arch Ophthalmol* 1988; 106: 1085-1088.
51. Culp DJ, Richardson LA. Regulation of mucous acinar exocrine secretion with age. *J Dent Res* 1996; 75: 575-580.
52. Watson GE, Culp DJ. Muscarinic cholinergic receptor subtypes in rat sublingual glands. *Am J Physiol* 1994; 266(2 pt 1): C335-C342.
53. Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A i wsp. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 2001; 410: 207-212.
54. Matsui M, Motomura D, Karasawa H i wsp. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 type. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9579-9584.
55. Steinfeld S, Cogan E, King LS, Agre P, Ishida N. Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjögren's syndrome. *Lancet* 2001; 357: 688-689.
56. Ishikawa Y, Ishida H. Aquaporin water channel in salivary gland. *Jpn J Pharmacol* 2000; 83: 95-101.
57. Ishikawa Y, Skowronski MT, Ishida H. Persistent increase in the amount of aquaporin-5 in the apical plasma membrane of rat parotid acinar cells induced by a muscarinic agonist SNI-2011. *FEBS Lett* 2000; 477: 253-257.
58. Fox RI, Rang HI, Andor D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1994; 152: 5532-5539.
59. Main C, Blennerhassett P, Collins SM. Human recombinant interleukin 1 beta suppresses acetylcholine release from rat myenteric plexus. *Gastroenterology* 1993; 104: 1648-1654.
60. Campbell IL. Neuropathogenic actions of cytokines assessed in transgenic mice. *Int J Dev Neurosci* 1995; 13: 275-284.
61. Chandross KJ, Chanson M, Spray DC, Kessler JA. Transforming growth factor-beta 1 and forskolin modulate gap junctional communication and cellular phenotype of cultured Schwann cells. *J Neurosci* 1995; 15(1 pt 1): 262-273.
62. Lu G, Beuerman RW, Zhao S i wsp. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 induce activation of MAP kinase and SAP kinase in human neuroma fibroblasts. *Neurochem Int* 1997; 30: 401-410.
63. Wu AJ, Chan ZJ, Kan EC, Baum BJ. Interferon-gamma-induced JAK2 and STAT1 signalling in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 1997; 173: 110-114.
64. Dai YS, Ambudkar IS, Horn VJ i wsp. Evidence that M3 muscarinic receptors in rat parotid gland couple to two second messenger systems. *Am J Physiol* 1991; 261(6 pt 1): C1063-C1073.
65. Wotta DR, Wattenberg EV, Langason RB, el-Fakahany EE. M1, M3 and M5 muscarinic receptors stimulate mitogen-activated protein kinase. *Pharmacology* 1998; 56: 175-186.
66. Liu XB, Masago R, Kong L i wsp. G-protein signaling abnormalities mediated by CD95 in salivary epithelial cells. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1119-1126.
67. Bacman S, Sterin-Borda L, Camusso JJ, Arana R, Hubscher O, Borda E. Circulating antibodies against rat parotid gland M3 muscarinic receptors in primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 454-459.
68. Robinson CP, Yamachika S, Bounous DI i wsp. A novel NOD-derived murine model of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 150-156.
69. Bacman S, Perez Leiros C, Sterin-Borda L, Hubscher O, Arana R, Borda E. Autoantibodies against lacrimal gland M3 muscarinic acetylcholine receptors in patients with primary Sjögren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 151-156.
70. Waterman SA, Gordon TP, Rischmueller M. Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1647-1654.

71. Fox R. Treatment of Sjögren's syndrome. w: *Drug Therapy of Rheumatic Disease*. (M. a. W. Weinblatt, Ed.), Saunders, Philadelphia 1999; 68-77.
72. Lemp MA. The 1998 Castroviejo Lecture: New strategies in the treatment of dry-eye states. *Cornea* 1999; 18, 625-632.
73. Balaram M, Schaumberg DA, Dana MR. Efficacy and tolerability outcomes after punctal occlusion with silicone plugs in dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol* 2001; 131: 30-36.
74. Friedlaender MH, Fox RI. Punctal occlusion for the treatment of dry eye. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 1017-1020.
75. Marsh P, Pflugfelder SC. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjögren syndrome. *Ophthalmology* 1999; 106(4): 811-816.
76. Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 459-461.
77. Tsubota K, Goto E, Fujita H i wsp. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 390-395.
78. Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease: CsA Phase 3 Study Group. *Ophthalmology* 2000; 107, 631-639.
79. Daniels TE, Wu AJ. Xerostomia-Clinical evaluation and treatment in general practice. *J Calif Dent Assoc* 2000; 28: 933-941.
80. Fox RI. Sjögren's syndrome: Current therapies remain inadequate for a common disease. *Expert Opin Invest Drugs* 2000; 9: 2007-2016.
81. Zandbelt MM, van den Hoogen FH, de Wilde PC, van den Berg PJ, Schneider HG, van de Putte LB. Reversibility of histological and immunohistological abnormalities in sublabial salivary gland biopsy specimens following treatment with corticosteroids in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 511-513.
82. Wiseman LR, Faulds D. Oral pilocarpine: A review of its pharmacological properties and clinical potential in xerostomia. *Drugs* 1995; 49: 143-155.
83. Fox PC, Atkinson JC, Macynski AA i wsp. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren's syndrome: A randomized, placebo-controlled, fixed-dose, multicenter trial. P92-01 Study Group. *Arch Intern Med* 1991; 151, 1149-1152.
84. Vivino FB, Al-Hashimi I, Khan Z i wsp. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren syndrome: A randomized, placebo-controlled, fixed-dose, multicenter trial. *Arch Intern Med* 1999; 159: 174-181.
85. Iwabuchi Y, Katagiri M, Masuhara T. Salivary secretion and histopathological effects after single administration of the muscarinic agonist SNI-2011 in MRL/lpr mice. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1994; 328, 315-325.
86. Fisher A, Brandeis R, Pittel Z i wsp. (+/-)-cis-2-methylspiro(1,3-oxathiolane-5,3')quinuclidine (AF102B): A new M1 agonist attenuates cognitive dysfunctions in AF64A-treated rats. *Neurosci Lett* 1989; 102, 325-331.
87. Fisher A, Brandeis R, Karton I i wsp. (+/-)-cis-2-methylspiro(1,3-oxathiolane-5,3')quinuclidine, an M1 selective cholinergic agonist, attenuates cognitive dysfunctions in an animal model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257, 392-403.
88. Segal M, Fisher A. AF102B, a muscarinic M1 receptor agonist, mimics some effects of acetylcholine on neurons of rat hippocampus slices. *Eur J Pharmacol* 1992; 220, 103-106.
89. Fox R, Petrone D, Condemi J, Fife R, Dalgin, P. Randomized, placebo-controlled trial of SNI-2011, a novel M3 muscarinic receptor agonist, for the treatment of Sjögren's syndrome. (Abstract). *Arthritis Rheum* 1998; 41(suppl): S288.
90. Evoxac capsules (cevimeline hydrochloride). w: *Physicians' Desk Reference*. Medical Economics Co, Montvale, NJ 2001; 55th ed: 1110-1112.
91. Fox RI, Michelson P. Approaches to the treatment of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol Suppl* 2000; 61: 15-21.
92. Salagen tablets (pilocarpine hydrochloride). w: *Physicians' Desk Reference*. Medical Economics Co, Montvale, NJ 2001; 55th ed: 2061-2063.
93. Masunaga H, Ogawa H, Uematsu Y, Tomizuka T, Yasuda H, Takeshita Y. Long-lasting salivation induced by a novel muscarinic receptor agonist SNI-2011 in rats and dogs. *Eur J Pharmacol* 1997; 339: 1-9.
94. Iwabuchi Y, Masuhara T. Sialogogic activities of SNI-2011 compared with those of pilocarpine and McN-A-343 in rat salivary glands: Identification of a potential therapeutic agent for treatment of Sjögren's syndrome. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 123-129.
95. Leloup C, Michaelson DM, Fisher A, Hartmann T, Beyreuther K, Stein R. M1 muscarinic receptors block caspase activation by phosphoinositide 3-kinase- and MAPK/ERK-independent pathways. *Cell Death Differ* 2000; 7: 825-833.
96. Beach TG, Walker DG, Potter PE, Sue LI, Fisher, A. Reduction of cerebrospinal fluid amyloid-beta after systemic administration of M1 muscarinic agonists. *Brain Res* 2001; 905: 220-223.
97. Nitsch RM, Deng M, Tennis M, Schoenfeld D, Growdon JH. The selective muscarinic M1 agonist AF102B decreases levels of total Aβeta in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2000; 48 913-918.
98. Alexander EL. Central nervous system (CNS) manifestations of primary Sjögren's syndrome: An overview. *Scand J Rheumatol Suppl* 1986; 61: 161-165.
99. Belin C, Moroni C, Caillat-Vigneron N i wsp. Central nervous system involvement in Sjögren's syndrome: Evidence from neuropsychological testing. *Ann Med Int (Paris)* 1999; 150: 598-604.
100. Ogawa N, Dang H, Kong L, Anaya JM, Liu GT, Talal N. Lymphocyte apoptosis and apoptosis-associated gene expression in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39, 1875-1886.
101. Bacman SR, Berra A, Sterin-Borda L, Borda ES. Human primary Sjögren's syndrome autoantibodies as mediators of nitric oxide release coupled to lacrimal gland muscarinic acetylcholine receptors. *Gurr Eye Res* 1998; 17: 1135-1142.
102. Robinson CP, Brayer J, Yamachika S i wsp. Transfer of human serum IgG to nonobese diabetic Igmu null mice reveals a role for autoantibodies in the loss of secretory function of exocrine tissues in Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7538-7543.
103. Konttinen YT, Halinen S, Hanemaaijer R i wsp. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 type IV collagenase/gelatinase implicated in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Matrix Biol* 1998; 17: 335-347.

104. Yamachika S, Nanni J. M, Nguyen KH i wsp. Excessive synthesis of matrix metalloproteinases in exocrine tissues of NOD mouse models for Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1998; 25: 2371-2380.
105. Tominaga M, Migita K, Nakamura H i wsp. Expression of metalloproteinase-2 (gelatinase A) in labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome with HTLV-I infection. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 463-466.
106. Johnson EO, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Neuroendocrine manifestations in Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin Horth Am* 2000; 26: 927-949.
107. Robinson CP, Yamamoto H, Peck AB, Humphreys-Beher MG. Genetically programmed development of salivary gland abnormalities in the NOD (nonobese diabetic)-scid mouse in the absence of detectable lymphocytic infiltration: A potential trigger for sialoadenitis of NOD mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 79: 50-59.
108. Brayer J, Lowry J, Cha S i wsp. Alleles from chromosomes 1 and 3 of NOD mice combine to influence Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. *J Rheumatol* 2000; 27: 1896-1904.
109. Fox R. Sjögren's syndrome. Genetic, environmental, clinical and therapeutic aspects. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7: 4019-4416.
110. Humphreys-Beher MG, Yamachika S, Yamamoto H i wsp. Salivary gland changes in the NOD mouse model for Sjögren's syndrome: Is there a non-immune genetic trigger? *Eur J Morphol* 1998; 36(Suppl): 247-251.
111. Morinobu A, Kanagawa S, Koshihara M, Sugai S, Kumagai S. Association of the glutathione S-transferase M1 homozygous null genotype with susceptibility to Sjögren's syndrome in Japanese individuals. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2612-2615.
112. Haneji N, Nakamura T, Takio K i wsp. Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science* 1997; 276: 604-607.
113. Toda T, Wickham LA, Sullivan DA. Gender and androgen treatment influence the expression of proto-oncogenes and apoptotic factors in lacrimal and salivary tissues of MRL/lpr mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 86: 59-71.
114. Komaki S, Kohno M, Matsuura N i wsp. The polymorphic 43Thr bcl-2 protein confers relative resistance to autoimmunity: An analytical evaluation. *Hum Genet* 1998; 103: 435-440.
115. Ishimaru N, Saegusa K, Yanagi K, Haneji N, Saito I, Hayashi Y. Estrogen deficiency accelerates autoimmune exocrinopathy in murine Sjögren's syndrome through fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol* 1999; 155: 173-181.
116. Fei HM, Kang H, Scharf S, Erlich H, Peebles C, and Fox R. Specific HLA-DQA and HLA-DRB1 alleles confer susceptibility to Sjögren's syndrome and autoantibody SS-B production. *J Clin Lab Anal* 1991; 5: 382-391.
117. Nakamura H, Kawakami A, Yamasaki S i wsp. Expression and function of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 2000; 80: 1421-1427.
118. Griffiths DJ, Venables PJ, Weiss RA, Boyd MT. A novel exogenous retrovirus sequence identified in humans. *J Virol* 1997; 71: 2866-2872.
119. Li JM, Fan WS, Horsfall AC i wsp. The expression of human endogenous retrovirus-3 in fetal cardiac tissue and antibodies in congenital heart block. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 388-393.
120. Talal N, Flescher E, Dang H. Are endogenous retroviruses involved in human autoimmune disease? *J Autoimmun* 1992; 5(Suppl A): 61-66.
121. Mason AL, Xu L, Guo L, Garry RF. Retroviruses in autoimmune liver disease; Genetic or environmental agents? *Arch Immunol Ther Exp (Warsaw)* 1999; 47:289-297.
122. Jean S, Quelvenec E, Alizadeh M i wsp. DRB1*15 and DRB1*03 extended haplotype interaction in primary Sjögren's syndrome genetic susceptibility. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 725-728.
123. Azzarolo AM, Wood RL, Mircheff AK i wsp. Androgen influence on lacrimal gland apoptosis, necrosis, and lymphocytic infiltration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 592-602.
124. Sullivan DA, Edwards JA. Androgen stimulation of lacrimal gland function in mouse models of Sjögren's syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 60: 237-245.
125. Tornwall J, Lane TE, Fox RI, Fox HS. T cell attractant chemokine expression initiates lacrimal gland destruction in nonobese diabetic mice. *Lab Invest* 1999; 79: 1719-1726.
126. Fox RI, Maruyama T. Pathogenesis and treatment of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1997; 9: 393-399.
127. Salmi M, Jalkanen S. Different forms of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in blood vessels in vivo and in cultured endothelial cells: Implications for lymphocyte-endothelial cell adhesion models. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2803-2812.
128. Weissman IL, Warnke R, Butcher EC, Rouser R, Levy R. The lymphoid system; Its normal architecture and potential for understanding the system through the study of lymphoproliferative diseases. *Hum Pathol* 1978; 9: 25-45.
129. Rose JR, Williams MB, Rott LS, Butcher EC, Greenberg HB. Expression of the mucosal homing receptor alpha4beta7 correlates with the ability of CD8+ memory T cells to clear rotavirus infection. *J Virol* 1998; 72: 726-730.
130. Oxholm P, Daniels TE, Bendtzen K. Cytokine expression in labial salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome. *Autoimmunity* 1992; 12: 185-191.
131. Boumba D, Skopouli F, Moutsopoulos H. Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1995; 34: 326-333.
132. Ohya Y, Nakamura S, Matsuzaki G i wsp. Cytokine messenger RNA expression in the labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1376-1384.
133. Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Cytokines in Sjögren's syndrome. *Ann Med Int (Paris)* 1995; 146: 219-222.
134. Sun D, Emmert-Buck MR, Fox PC. Differential cytokine mRNA expression in human labial minor salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *Autoimmunity* 1998; 28: 125-137.
135. Fox PC, Brennan M, Di Sun P. Cytokine expression in human labial minor salivary gland epithelial cells in health and disease. *Arch Oral Biol* 1999; 44(Suppl 1): S49-S52.
136. Kong L, Ogawa N, McGuff HS i wsp. Bcl-2 family expression in salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome: Involvement of Bax in salivary gland destruction. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 88: 133-141.
137. El Kaissouni J, Bene M, Faure G. Investigation of activation markers demonstrates overexpression of the secretory component on salivary glands epithelial cells in Sjögren's syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 79: 236-243.
138. Humphreys-Beher MG, Peck AB, Dang H, Talal N. The role of apoptosis in the initiation of the autoimmune response in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 383-387.

139. Matsumura R, Umemiya K, Goto T i wsp. Interferon gamma and tumor necrosis factor alpha induce Fas expression and anti-Fas mediated apoptosis in a salivary ductal cell line. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18: 311-318.
140. Cuello C, Palladinetti P, Tedlar N i wsp. Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 779-783.
141. DeKeyser F, Takei M, Dang H, Dakeyser H, Isenberg DA, Talal N. Characterization of a cross-reactive idiotype on two human autoantibodies associated with systemic autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 69: 155-160.
142. McCauliffe DP, Yin H, Wang LX, Lucas L. Autoimmune sera react with multiple epitopes on recombinant 52 and 60 kDa Ro(SSA) proteins. *J Rheumatol* 1994; 21: 1073-1080.
143. Tengner P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 2238-2248.
144. Horsfall AC, Li JM, Maini RN. Placental and fetal cardiac laminin are targets for cross-reacting autoantibodies from mothers of children with congenital heart block. *J Autoimmun* 1996; 9: 561-568.
145. Wu AJ, Lafrenie RM, Park C i wsp. Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 1997; 171: 117-124.
146. Manganelli P, Quaini F, Andreoli AM i wsp. Quantitative analysis of apoptosis and bcl-2 in Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1997; 24: 1552-1557.
147. Konttinen YT, Platts LA, Tuominen S i wsp. Role of nitric oxide in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 875-883.
148. Yamamoto H, Sims NE, Macauley SP, Ngnyen KH, Nakagawa Y, Humphreys-Beyer MG. Alterations in the secretory response of non-obese diabetic (NOD) mice to muscarinic receptor stimulation. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 78: 245-255.
149. Fox PC, Mandel ID. Effects of pilocarpine on salivary flow in patients with Sjögren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74: 315-318.
150. Rhodus NL. Oral pilocarpine HCl stimulates labial (minor) salivary gland flow in patients with Sjögren's syndrome. *Oral Dis* 1997; 3: 93-98.
151. Nelson JD, Friedlaender M, Yeatts RP i wsp. Oral pilocarpine for symptomatic relief of keratoconjunctivitis sicca in patients with Sjögren's syndrome. The MGI PHARMA Sjögren's Syndrome Study Group. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 979-983.
152. Nusair S, Rubinow A. The use of oral pilocarpine in xerostomia and Sjögren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 1999; 28: 360-367.
153. Rhodus NL, Schuh MJ. Effects of pilocarpine on salivary flow in patients with S. Sjögren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 72: 545-549.
154. Papas AS, Fernandez MM, Castano RA, Gallagher SC, Trivedi M, Shrotriya RC. Oral pilocarpine for symptomatic relief of dry mouth and dry eyes in patients with Sjögren's syndrome. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 973-978.
155. Iga Y, Arisawa H, Ogane N i wsp. (+/-)-cis-2-methyl-spiro[1,3-oxathiolane-5,3'-quinuclidine] hydrochloride, hemihydrate (SNI-2011, cevimeline hydrochloride) induces saliva and tear secretions in rats and mice: The role of muscarinic acetylcholine receptors. *Jpn J Pharmacol* 1998; 78: 373-380.
156. Fox R, Guarrasi V, Krubel S, Sjögren's syndrome: Treatment with antimalarial medications. *Lupus* 1996; 5: 31-37.
157. Drosos AA, Skopouli FN, Costopoulos JS, Papadimitriou CS, Moutsopoulos HM. Cyclosporin A (CyA) in primary Sjögren's syndrome: A double blind study. *Ann Rheum Dis* 1986; 45: 732-735.
158. Skopouli FN, Jagiello P, Tsifetaki N, Moutsopoulos HM. Methotrexate in primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14: 555-558.
159. Linardaki G, Moutsopoulos HM. The uncertain role of immunosuppressive agents in Sjögren's syndrome. *Cleveland Clin J Med* 1997; 64: 523-526.
160. Bartlett RR, Brendel S, Zielinski T, Schorlemmer HU. Leflunomide, an immunorestoring drug for the therapy of autoimmune disorders, especially rheumatoid arthritis. *Transplant Proc* 1996; 28: 3074-3078.
161. Mrowka C, Thoenes GH, Langer KH, Bartlett RR. Prevention of the acute graft-versus-host disease (GVHD) in rats by the immunomodulating drug leflunomide. *Ann Hematol* 1994; 68: 195-199.
162. Fox R i wsp. sTNFbp prevents development of lymphoid infiltrates in the NOD mouse, a model for human Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 41(Suppl): 8181.
163. Johnson E, Skopouli F, Moutsopoulos H. Neuroendocrine manifestations in Sjögren syndrome. *Rheum Clin NA* 2000; 26: 927-949.