

Gondolatok antimuszkarinerg szerek rendelése előtt

Dr. Rónai Zoltán, Arany Kehely Egészségcentrum, Pécs

A muszkarin-receptorok gátlása az asztma egyik legősibb kezelési módja. A növényekben előforduló atropint és szkopolamint a hagyományos orvoslás több ezer éve ismeri. Az ókori Egyiptomban a *Hyoscyamus niger* főzetét forró téglákra öntötték, és annak gőzét lélegezték be. A középkorban a maszlagos nadragulya volt az atropin forrása. Ezt méregként is használták, és Linné ennek kapcsán nevezte el a növényt *Atropa belladonnának*, utalva Atroposzra, a görög mitológia három sors istennőjének egyikére, aki ollójával elvágja az élet fonálát.

Bár a kísérletes gyógyszer-tani vizsgálatok mind arra utaltak, hogy az antimuszkarinerg szerek jó hatásúak asztmában, a klinikai eredmények mégsem voltak ennyire egyöntetűek, emiatt a hatékony béta-adrenerg receptor-agonisták megjelenésével párhuzamosan visszaszorult a korábbi muszkarin-receptor antagonisták használata. Az első antimuszkarinerg vegyületek hatékonyságának hiánya több okra vezethető vissza, kezdve a nemkívánt hatásoktól (melyek a szájszárazságtól a kómáig terjednek) egészen a muszkarin-receptor altípusok közötti kölcsönhatásokig. A legvalószínűbb ok azonban a *nem megfelelő dozírozás*, aminek hátterében az áll, hogy nincs jó módszer annak vizsgálatára, vajon az alkalmazott antagonisták ténylegesen képes-e blokkolni a fiziológiás úton felszabaduló acetilkolinnal stimulált receptorokat³. Az újonnan kifejlesztett antimuszkarinerg szerek igyekeznek választ adni a mellékhatások és a receptor-szelektivitás kérdéseire, és igen ígéretesek az asztma és a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) kezelésében.

Antikolinerg, antimuszkarinerg vagy atropinerg?

Az orvosi-életteni Nobel-díjat 1936-ban megosztottan az angol *Henry Dale* és az osztrák *Otto Loewi* kapta „az idegi impulzusok kémiai átvitelével kapcsolatos felfedezéseikért”. *Dale* 1914-ben felismerte, hogy a különböző kolinészterek – a farmakológiai preparátum függvényében – a nikotínhoz vagy a muszkarinéhoz hasonló válaszokat váltanak ki, és ennek alapján két kolinerg receptortípust írt le¹. Ezt a későbbi kutatások is megerősítették, és a receptorok szerkezetét még pontosabban feltárták. A **nikotin-receptorok** ligandum hatására aktiválódó ion-csatornák, melyek főként a vegetatív ganglionokban és a vázizmokon található, aktivitásuk a nátrium- és a kalcium-permeabilitás gyors növekedésével és depolarizációval jár. A **muszkarin-receptorok** G-proteinhez kötött 7-transzmembrán receptorok, melyek elsősorban a központi idegrendszerben (agykéreg, thalamus, hippocampus) és a posztganglionáris paraszimpatikus idegek által innervált perifériás effektor sejteken (pl. simaizomsejtek, szívizomsejtek) fordulnak elő.

Ily módon kétféle kolinerg antagonistát („antikolinergikum”-ot) írtak le: a **nikotin-receptor antagonistákat**, melyek a vázizmokon (pl. tubokurarin), a vegetatív ganglionokon (pl. trimetaphan) vagy a központi idegrendszerben (pl. alfa-konotoxin) hatnak, valamint a **muszkarin-receptor antagonistákat**, melyek közé a természetben fellelhető alkaloidok (atropin, szkopolamin) mellett a szintetikus derivátumok (pl. ipratropium, tiotropium, aklidinium) is tartoznak. A nikotin-receptor antagonisták klinikai használata neuromuszkuláris blokkolószerként az aneszteziológiára korlátozódik. Ezzel szemben a muszkarin-receptor antagonistákat széles körben használják bronchodilatátorként, görcsoldóként, pupillatágítóként és a Parkinson-kór kezelésében.

Az „antikolinerg” kifejezés sajnálatos farmakodinamikai általánosítás áldozatává vált, ezért több szerző javasolja, hogy az érintett receptorra gondolva használjuk helyette az „antimuszkarinerg”, vagy a gyógyszer-csoport hatásaira gondolva az „atropinerg” kifejezést². Jelen közleményben igyekszünk ennek a felhívásnak eleget tenni.

Muszkarin-receptorok a tüdőben

Az antimuszkarinerg vegyületek blokkolják a hörgőkben a simaizomzat, a mirigyek és az idegvégződések muszkarin-receptorait, ezáltal gátolják az izomösszehúzódást, a váladéktermelődést és fokozzák a neurotranszmitterek felszabadulását. A muszkarin-receptorok öt altípusát (M1–M5) írták le, melyek mindegyike a G-proteinhez kapcsolódó 7-transzmembrán receptorok családjába tartozik. A tüdőben M1-, M2- és M3-receptorok találhatóak. A hörgők simaizomtónusát elsősorban a paraszimpatikus idegekből felszabaduló acetilkolin szabályozza az M3- és M2-receptorokon keresztül⁴. Az M1- és M3-receptoroknak a légúti váladéktermelés szabályozásában van fontos szerepük⁵.

Jóllehet a simaizomzat kontrakcióját az M3-receptorok izgalma okozza, a légúti simaizomzat muszkarinerg receptorainak többsége mégis M2-receptor⁵, az M2/M3 arány $\approx 4:1$ ⁶. Ezek az M2-receptorok közvetett módon járulnak hozzá a hörgők simaizomzatának kontrakciójához azáltal, hogy az adenil-cikláz gátlása révén korlátozzák a béta-adrenerg receptorok okozta bronchodilatációt^{7,8}.

A muszkarin-receptorok jelen vannak a tüdőt ellátó paraszimpatikus idegeken is⁹. A posztganglionaris paraszimpatikus idegeken lévő M2-receptorok gátolják az idegvégződésekben az acetilkolin felszabadulását, és ezzel biztosítják annak fiziológiás negatív feed-back kontrollját¹⁰. Az M2-receptorok blokkolása atropinnal, ipratropiummal vagy a szelektív M2-antagonista gallaminnal jelentősen fokozza a nervus vagus ingerlésével kiváltható bronchokonstriktiót¹¹.

Fontos hangsúlyozni, hogy ezek a neuronális M2-receptorok sérülékenyek, és működésük jelentős mértékben csökken vírusinfekció, antigén-terhelés vagy ózon-expozíció hatására¹². Asztma esetén is csökkent működésűek, és az így előálló fokozott acetilkolin-felszabadulás a légúti hiperreaktivitás egyik lényeges komponense¹³.

Korábbi antimuszkarinerg szerek

Atropin

Az atropin mind állatkísérletekben, mind humán vizsgálatokban dózis-dependens módon csökkenti a paraszimpatikus idegek stimulációjával kiváltott, valamint az intravénás vagy inhalált acetilkolinnal létrehozott bronchokonstriktiót¹⁴. Az atropin hörgőtágító hatása függ a beviteli módtól. Intravénásan sokkal több atropinra van szükség ugyanakkora hatás kialakulásához, mint inhalációs bevétel esetén, függetlenül attól, hogy a bronchokonstriktiót intravénás acetilkolinnal vagy vagus-sti-

mulációval hozták létre. Hasonló a helyzet az asztma kezelésekor is, amikor az inhalált atropin sokkal jobban gátolja a bronchokonstriktiót, mint az intravénásan adott, függetlenül attól, hogy az metakolin-belégzés vagy hideg levegő (vagus-reflex) hatására alakult ki¹⁵.

Bár ezek az adatok arra engednének következtetni, hogy az inhalált atropin ideális hörgőtágító, azonban mégsem lett az asztma elsőként választandó gyógyszere. A vizsgálatokból ugyanis az is kiderült, hogy *az inhalált atropin sokkal kevésbé képes gátolni a fiziológiás úton, azaz a vagus-stimuláció hatására kialakult bronchokonstriktiót, mint azt, amit az inhalált acetilkolin hoz létre*¹⁴.

Az atropin asztmában tapasztalt, vártnál jóval kisebb hatását azzal próbálták magyarázni, hogy a paraszimpatikus idegekből felszabaduló acetilkolin talán nem is játszik olyan fontos szerepet a hiperreaktivitás kialakulásában. Ezzel szemben sokkal inkább arról van szó, hogy **az atropin klinikailag alkalmazott dózisa túl alacsony volt**.

Farmakológiai adatok alapján meghatározva 0,67 mg/kg, azaz egy 70 kg súlyú felnőttnek 47 mg szisztémás atropinra lenne szüksége a tüdőben lévő muszkarin-receptorok 50%-ának blokkolásához¹⁶. Az intenzív orvosi ellátás során asystolia kezelésére alkalmazott maximális atropin dózis felnőtt beteg esetén intravénásan 3 mg¹⁷. Az atropin LD₅₀ dózisa felnőtteknél 453 mg, azonban már 10–20 mg magatehetetlen állapotot idéz elő¹⁸.

Az atropin toxikus hatásai miatt a kutatás olyan antimuszkarinerg szerek felé irányult, melyek kevésbé szívódnak fel.

Ipratropium

Az ipratropium bromid szintetikus kvaterner ammónium vegyület, az atropin N-atomján egy izopropil csoporttal (izopropil-atropium \rightarrow ipratropium). A kvaterner ammóniumnak köszönhetően a szisztémás biohasznosulás inhaláció esetén 6,9%-ra csökken, orális bevétel mellett 2%¹⁹. A rossz felszívódás azt is jelenti, hogy az inhalált ipratropium úgy hat a tüdő muszkarin-receptoraira, hogy közben nem jelentkezik az atropinnál megismert szisztémás mellékhatások, pl. nem befolyásolja a nyugalmi szívfrekvenciát. Fontos az alacsony orális felszívódás is, mert az inhalált ipratropium közel 90%-át a beteg a száj-garatúri depozíciót követően lenyeli²⁰.

Az ipratropium esetén ugyanúgy fennáll a dozírozás problémája, mint az atropinnál. A gyógyszerügyi hatóságok a puffonkénti dózist 21 μ g-ban limitálták, elsősorban a mellékhatások okozta félelmek miatt. Tekintve, hogy ipratropium esetén a maximális hörgőtágulat létrehozásához szükséges dózis 500 μ g, így az ajánlott egyszeri 42 μ g (2 puff) adag a COPD-s beteg számára szuboptimális volt²¹.

A klinikailag alkalmazott dózisban az ipratropium mellékhatásai rendszerint enyhék, szájszárazság és ingerköhögés fordul elő a leggyakrabban. Mivel a mellékhatások miatti aggodalmak hatására korlátozták a magasabb dózisok adását, így a nagyobb hörgőtágítás lehetősége is elveszett.

Holott igazolták, hogy akut asztma esetén a béta-agonisták mellé adott nagy dózisu ipratropiummal gyorsabban és nagyobb mértékben lehet javítani a légzésfunkciós paramétereket²². Ezekben az akut asztmás esetekben azonban óránként átlagosan 500 µg (25 puff) ipratropiumot adtak, ami azt támasztja alá, hogy amikor az ipratropiumot a maximális hörgőtágító dózisnak megfelelő mennyiségben adják, akkor a hörgőtágító hatása jelentős²³.

Az ipratropium nem szelektív, az összes muszkarin-receptor altípust azonos affinitással blokkolja, beleértve a gátló neuronális M2-receptorokat is²⁴. Az M2-receptor blokkád magyarázza azt, hogy az ipratropium potenciózhatja a vagálishan indukált bronchokonstriktiót, és ez a hatás már a klinikailag alkalmazott dózisok közelében is megfigyelhető²⁰. Humán asztma esetén az M2-receptorok működése eleve csökkent¹³, így cél ezek további gátlásának elkerülése. Másrészt a legkomolyabb szisztémás mellékhatás a kardiális M2-receptorok gátlása miatt kialakuló tachycardia lehet, ezért a modern antimuszkarinerg szerek fejlesztésekor az *M3-receptor szelektivitás került előtérbe*.

A ma használt hosszú hatású muszkarinerg antagonisták

Tiotropium

A tiotropium bromid szerkezete hasonlít az ipratropiuméhoz, de muszkarin-receptor affinitása mindegyik receptor-altípus felé sokkal nagyobb²⁵. Emellett az M3-receptorok felé funkcionális szelektivitás is mutatkozik, amit a tiotropium két thiophen gyűrűjének tulajdonítanak. Ez abban nyilvánul meg, hogy a tiotropium az M2-receptorokról sokkal gyorsabban disszociál, mint az M3-receptorokról (1. táblázat)^{26,27,29}.

A tiotropium biohasznosulása szárazporinhalációt követően egészséges, fiatal önkéntesekben 19,5% volt, vagyis a tüdőbe jutó dó-

zishányad biohasznosulása feltehetően nagymértékű. A plazmakoncentráció 5 perccel a por inhalálása után éri el a maximumot. Kémiai szerkezetéből adódóan a tiotropium csak kevésbé szívódik fel a tápcsatornából. Az oldatként, per os alkalmazott tiotropium-bromid abszolút biohasznosulása 2-3%-os. Az alacsony orális biohasznosulásnak és a magas vese-klírensnek köszönhetően a szisztémás mellékhatások ritkák²⁷. A tiotropium nagyobb hatástartama, nagyobb affinitása és funkcionális M3-receptor szelektivitása az ipratropiumhoz képest nagyobb légzésfunkciós javulást eredményez²⁸.

Az adagolás problémaköre tiotropium esetén sem oldódott meg³. A dóziskereső vizsgálatokban azt a tiotropium dózist határozzák meg, ami az inhalációs metakolin-provokáció, illetve az intravénás acetilkolin okozta hörgőszűkület kivédéséhez szükséges, ez azonban nem felel meg a vagálishan indukált bronchokonstriktió kivédéséhez szükséges dózisnak³⁰. Hasonlóan az ipratropiumhoz, a 18 µg-os adag meghatározásakor a tiotropiumnál is a szisztémás mellékhatások biztos elkerülése volt az elsődleges szempont, nem pedig a maximális hörgőtágító dózis elérése³¹, ily módon *továbbra is fennáll az aluldozozás lehetősége*.

Aklidinium

Az aklidinium bromid hasonlít a tiotropiumhoz abban, hogy ugyanúgy két thiophen gyűrűje és egy kvaterner nitrogénje van, illetve abban is, hogy kinetikus szelektivitást mutat az M3-receptorok felé, szemben az M2-receptorokkal^{29,32}. Bár az aklidinium fél-életideje a tengerimalac tüdő muszkarin-receptorain mérve 29 óra, ami rövidebb, mint a tiotropium esetén mérhető 62 óra, a hatáskezdeté azonban lényegesen gyorsabb³³. A másik lényeges különbség az, hogy az aklidinium a plazmában butiril-kolinészteráz hatására **rendkívül gyorsan metabolizálódik, fél-életideje a keringésben mindössze 2,4 perc**³².

Az aklidinium sokkal kisebb mértékben befolyásolja a szívfrekvenciát, mint a tiotropium. A bronchokonstriktió-gátlás(%) és a szívfrekvencia-emelkedés(%) hányadosaként számított terápiás index aklidinium esetén 4,2, míg tiotropium esetén csak 1,6³³.

A gyors hidrolízis és a kinetikus receptor-szelektivitás egyaránt hozzájárulnak a jobb tolerál-

Hatóanyag	Receptorkötődési affinitás (K_i , nM)		Disszociációs felezési idő (óra)		
	M2-receptor	M3-receptor	M2-receptor	M3-receptor	M3/M2 arány
tiotropium	0,13±0,04	0,19±0,04	15,11±1,57	62,19±2,96	4,1
aklidinium	0,14±0,04	0,14±0,02	4,69±0,29	29,24±0,61	6,2
glikopirronium	1,77±0,06	0,52±0,04	1,07±0,20	8,10±0,45	7,3

1. táblázat: A klinikumban használt hosszú hatású muszkarin-receptor antagonisták legfontosabb tulajdonságai²⁹

hatósághoz: az aklidinium alkalmazásakor ritkábban fordulhatnak elő szisztémás és központi idegrendszeri antikolinerg mellékhatások, mint a tiotropium vagy a glikopirronium esetén, amit állatkísérletes adatok és humán klinikai vizsgálatok egyaránt alátámasztanak³³⁻³⁵.

Glikopirronium

A glikopirronium bromid egy nagy affinitású muszkarin-receptor antagonistája, melyet a 90-es évekig csak az aneszteziológusok használtak a neosztigmin mellékhatásainak (bradycardia, fokozott nyálképződés) ellensúlyozására. A 90-es évek végén vetődött fel, hogy a COPD kezelésében is jó hatású lehet³⁶. Az M2-receptorokhoz képest jelentős M3-receptor szelektivitást igazoltak (1. táblázat). A glikopirronium hosszú időn át képes megakadályozni a metakolin-indukálta bronchokonstriktió létrejöttét. Napi egyszeri adással, hosszú távú fenntartó kezelésre javallott, de nem ajánlják a bronchospazmus akut epizódjainak sürgősségi kezelésére³⁷.

Milyen inhalációs eszközben?

A COPD-s betegnél a választandó hatóanyagcsoportok és ezek kombinációjának kérdése viszonylag könnyen eldönthető a kezelési útmutatók alapján, ezekből azonban sokkal kevesebb támpontot kapunk az inhalációs eszköz kiválasztásához. Ennek oka az, hogy rendkívül kevés olyan randomizált, kontrollált vizsgálat van, melyben célzottan inhalációs eszközöket hasonlítottak volna össze³⁸.

A Cochrane-adatbázist áttekintve, a csekély számú megfelelő minőségben elvégzett randomizált, kontrollált vizsgálat alapján az állapítható meg, hogy a légzésfunkciós paraméterek (hatékonyság) és a nemkívánt hatások (biztonságosság) tekintetében nincs különbség az adagolós aeroszolok és a többi inhalációs

eszköz között³⁹. A való élet COPD-s betegek esetén azonban a hatékonyság és a biztonságosság mellett számos más tényezőt is figyelembe kell venni, többek között az eszköz elérhetőségét, megfizethetőségét, a beteg képességét az eszköz helyes használatára és a beteg eszközválasztási preferenciáit. Az orvos szerepe az, hogy e szempontok figyelembevételével *kiválassza* a COPD-s beteg számára leginkább megfelelő hatóanyag/eszköz kombinációt, ezután a beteg számára kellő részletességű *tájékoztatót adjon* az eszköz helyes használatáról, majd a helyes eszközhasználatot minden kontrollvizsgálat alkalmával *ellenőrizze* és szükség esetén *korrigálja*.

Ki tudja-e fizetni?

A gyógyszer rendelésekor tudnunk kell annak térítési díját, és ismernünk kell a beteg anyagi helyzetét. A COPD-s betegek főként az idősebbek, rosszabb körülmények között élők közül kerülnek ki, akiknek a komorbiditások kezelése miatt már amúgy is tetemes gyógyszerkiadásuk van, és egyáltalán nem biztos, hogy meg tudják (vagy meg akarják) venni a drágább inhalációs készítményeket³⁸.

Tudja-e helyesen használni?

Ha a beteg megvette az inhalációs eszközt, akkor fontos, hogy azt helyesen használja. A helytelen eszközhasználat gyakori, aminek hátterében állhat a betegtájékoztatás és betanítás elmaradása, a beteg feledékenysége vagy ügyetlensége és még számos egyéb ok. Az eddigi vizsgálatok alapján egyértelmű, hogy minél egyszerűbben használható az inhalációs eszköz, annál eredményesebben tudják használni a betegek³⁸. Egy multicentrikus vizsgálatban 1305 asztmás és COPD-s beteg részvételével igazolták, hogy a hibás gyógyszerhasználat az adagolós aeroszol és a szárazporbelégzők esetén egyaránt gyako-

ri, és leginkább az emelkedő életkorral, az alacsony iskolai végzettséggel és a betegtájékoztató hiányával mutat összefüggést⁴⁰.

A COPD rendszerint idősebb dohányzó vagy korábban dohányos embereket érint, és a betegség súlyossági foka mellett az életkor a helyes eszközhasználat legfontosabb meghatározó tényezője. Egy vizsgálatban az eszközhasználati hibák gyakorisága 60 éves kor alatt 20% volt, ami a 60–80 év közötti betegcsoportban 42%-ra emelkedett, 80 éves kor felett pedig 80% feletti volt. A betegoktatással jelentősen csökkenteni lehetett a hibák arányát, azonban a legidősebb betegeknél a hibák száma még így is a kritikus határ felett maradt⁴¹.

Az idősebb életkor a kognitív és a fizikai képességek romlásával jár (pl. látásromlás, a kézügyesség romlása), melyek hatással vannak az inhalációs eszközök használatára. Emiatt **különösen fontos, hogy az eszköz helyes használata a lehető legkevesebb kézmozdulatot és a legkisebb kezűgyességet igényelje**. Erre figyelemmel kell lenni az inhalációs készítmény kiválasztásakor. A kognitív problémákkal küszködő idős COPD-s betegek nem képesek megtanulni a helyes működtetéshez több egymás utáni műveletet igénylő inhalációs eszközök használatát⁴².

Szereti-e használni?

A beteget érdemes bevonni az eszköz kiválasztásába, ugyanis csak olyan gyógyszerbelégzőt fog hosszabb időn keresztül használni, amit kedvel, és amiből könnyen, egyszerűen tud inhalálni még hirtelen légszomj okozta stressz esetén is. Több vizsgálatban igazolták, hogy a betegek nem szeretik a bonyolult működésű eszközöket. A betegek által legfontosabbnak tartott szempontok: az eszköz legyen minél gyorsabban használható, legyen egyszerű a működtetése, és legyen dózisszámlálója⁴³.

Hogyan válasszunk?

Minden krónikus betegségben, így COPD esetén is alapvetően fontos az egyénre szabott kezelés. Számos vizsgálat igazolta, hogy tartós kezelés mellett a betegek terápiás compliance-e nem optimális, ezért fontos olyan kezelési módot választani, ami rossz beteg-együttműködés mellett is a lehető legjobb eredményt adja.

Az inhalációs eszközök közül rendeljük azt, amelyiket a beteg a legegyszerűbben tudja a leghatékonyabban használni. A Genuair® a kupak levétele után egyetlen kézmozdulattal, a zöld gomb megnyomásával aktiválható, majd az ellenőrző ablak zöld színe mutatja, hogy megkezdhető a belégzés. A belégzés közben egy kattán hang, a belégzés végén pedig a pirosra váltó ellenőrző ablak jelzi, hogy helyesen történt a belégzés, és a teljes adag elhagyta az eszközt.

Mivel az inhalációval bejuttatott hatóanyagok gyakran nem jutnak el a kívánt mennyiségben a tüdőben zajló kórfolyamatok helyére, ezért a hatóanyag farmakológiai tulajdonságai, különösen **a nagyobb dózis mellett kedvező mellékhatásprofil és a receptorszelektivitás rendkívül fontosak a hosszútávú terápiás siker szempontjából**. A keringésbe kerülő aklidinium fél-életideje mindössze 2,4 perc, aminek köszönhetően jelentősen csökken a szisztémás mellékhatások kialakulásának esélye. A hatóanyagok közül az aklidiniumot választva egy gyors hatáskezdetű és kedvező biztonsági profilú antimuszkarinerg szert kapunk. ■

Irodalom

1. Dale HH. The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* 1914; 6: 147-90.
2. Montastruc JL, et al. Anticholinergics, antimuscarinics or atropinics? About the words in pharmacology. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69(5): 561-562.
3. Moulton BC, Fryer AD. Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and COPD. *British Journal of Pharmacology* 2011; 163: 44-52.
4. Roffel AF, Elzinga CR, Zaagsma J. Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol* 1990; 3: 47-51.
5. Gwilt CR, et al. The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol Ther* 2007; 115: 208-222.
6. Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Eur Respir J* 1993; 6: 328-331.
7. Belmonte KE. Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2(4): 297-304.
8. Fernandes LB, et al. M2 muscarinic receptors inhibit isoproterenol-induced relaxation of canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262: 119-126.
9. Fryer AD, et al. Muscarinic inhibitory receptors in pulmonary parasympathetic nerves in the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1984; 83: 973-978.

10. Baker DG, et al. Direct measurement of acetylcholine release in guinea pig trachea. *Am J Physiol* 1992; 263 (1 Pt 1): L142-L147.
11. Faulkner D, et al. Postganglionic muscarinic inhibitory receptors in pulmonary parasympathetic nerves in the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1986; 88: 181-187.
12. Sorkness R, et al. Virus-induced airway obstruction and parasympathetic hyperresponsiveness in adult rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 28-34.
13. Minette PA, et al. A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 1989; 67: 2461-2465.
14. Holtzman MJ, et al. Intravenous versus inhaled atropine for inhibiting bronchoconstrictor responses in dogs. *J Appl Physiol* 1983; 54: 134-139.
15. Sheppard D, et al. Effect of route of atropine delivery on bronchospasm from cold air and methacholine. *J Appl Physiol* 1983; 54: 130-133.
16. Chen WY, et al. Atropine and exercise-induced bronchoconstriction. *Chest* 1981; 79: 651-656.
17. ACC/AHA. 2005 American heart association guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. *Circulation* 2005; 112 (24 Suppl.): IV1-203.
18. Goodman E. Historical contributions to the human toxicology of atropine: Behavioral effects of high doses of atropine and military uses of atropine to produce intoxication, 1st edn. Eximdyne: Wentzville, MO, 2010.
19. Ensing K, et al. Pharmacokinetics of ipratropium bromide after single dose inhalation and oral and intravenous administration. *Eur J Clin Pharmacol* 1989; 36: 189-194.
20. Cugell DW. Clinical pharmacology and toxicology of ipratropium bromide. *Am J Med* 1986; 81: 18-22.
21. Gross NJ, et al. Dose-response to ipratropium as a nebulized solution in patients with chronic obstructive pulmonary disease. A three-center study. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 1188-1191.
22. Rodrigo GJ, et al. Anticholinergics in the treatment of children and adults with acute asthma: a systematic review with meta-analysis. *Thorax* 2005; 60: 740-746.
23. Rodrigo GJ, Rodrigo C. First-line therapy for adult patients with acute asthma receiving a multiple-dose protocol of ipratropium bromide plus albuterol in the emergency department. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1862-1868.
24. Restrepo RD. Use of inhaled anticholinergic agents in obstructive airway disease. *Respir Care* 2007; 52: 833-851.
25. Haddad EB, et al. Characterization of [3H]Ba 679 BR, a slowly dissociating muscarinic antagonist, in human lung: radioligand binding and autoradiographic mapping. *Mol Pharmacol* 1994; 45: 899-907.
26. Disse B, et al. Ba 679 BR, a novel long-acting anticholinergic bronchodilator. *Life Sci* 1993; 52: 537-544.
27. Price D, et al. Biochemical properties, pharmacokinetics and pharmacological response of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5: 417-424.
28. Brusasco V, et al. Health outcomes following treatment for six months with once daily tiotropium compared with twice daily salmeterol in COPD. *Thorax* 2003; 58: 399-404.
29. Gavalda A, et al. The in vitro and in vivo profile of aclidinium bromide in comparison with glycopyrronium bromide. *Pulm Pharmacol Ther* 2014; 28(2): 114-21. doi: 10.1016/j.pupt.2014.05.005. Epub 2014 Jun 10.
30. Buels KS, et al. Selectively blocking M3 muscarinic receptors at the time of antigen challenge prevents airway hyperreactivity 24 h later in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181 (1 Meeting Abstracts): A3974.
31. Littner MR, et al. Long-acting bronchodilation with once-daily dosing of tiotropium (Spiriva) in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 (4 Pt 1): 1136-1142.
32. Prat M, et al. Discovery of novel quaternary ammonium derivatives of (3R)-quinuclidinol esters as potent and long-acting muscarinic antagonists with potential for minimal systemic exposure after inhaled administration. *J Med Chem* 2009; 52: 5076-5092.
33. Gavalda A, et al. Characterization of aclidinium bromide, a novel inhaled muscarinic antagonist, with long duration of action and a favorable pharmacological profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 331: 740-751.
34. Joos GF, et al. Bronchodilatory effects of aclidinium bromide, a long-acting muscarinic antagonist, in COPD patients. *Respir Med* 2010; 104: 865-872.
35. Schelfhout VJ, et al. Activity of aclidinium bromide, a new long-acting muscarinic antagonist: a phase I study. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69: 458-464.
36. Norman P. COPD: New developments and therapeutic opportunities. *Drug News Perspect* 1998; 11(7): 431.
37. Hansel TT, et al. Glycopyrrolate causes prolonged bronchoprotection and bronchodilatation in patients with asthma. *Chest* 2005; 128: 1974-1979.
38. Vincken W, Dekhuijzen R, Barnes P, on behalf of the ADMIT Group. The ADMIT series – Issues in inhalation therapy. 4) How to choose inhaler devices for the treatment of COPD. *Primary Care Respiratory Journal* 2010; 19 (1): 10-20.
39. Ram FSF, et al. Pressurised metered dose inhalers versus all other hand-held inhalers devices to deliver bronchodilators for chronic obstructive pulmonary disease (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2002, Issue 1. Art. No.: CD002170. DOI: 10.1002/14651858.CD002170. *Cochrane Library* 2007, Issue 1.
40. Sestini P, et al. Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri Educational Group. Prescription bias and factors associated with improper use of inhalers. *J Aerosol Med* 2006; 19(2): 127-36. <http://dx.doi.org/10.1089/jam.2006.19.127>
41. Wieshammer S, Dreyhaupt J. Dry powder inhalers in asthma and COPD: which factors determine the frequency of handling errors? A study of Aerolizer, Diskus, Handihaler and Turbuhaler. *Chest* 2007; 132(Suppl 4): 479s.
42. Allen SC, Ragab S. Ability to learn inhaler technique in relation to cognitive scores and tests of praxis in old age. *Postgrad Med J* 2002; 78: 37-39. <http://dx.doi.org/10.1136/pmj.78.915.37>
43. Moore AC, Stone S. Meeting the needs of patients with COPD: patients' preference for the Diskus inhaler compared with the Handihaler. *Int J Clin Pract* 2004; 58: 444-50. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1368-5031.2004.00123.x>