

**ALLEGATO A**

**DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA  
RELATIVA AL POSSESSO DEI REQUISITI SPECIFICI DI AMMISSIONE  
( DPR n° 445/2000)**

Ai sensi degli artt. 46 e 47, D.P.R. n. 445 del 28.12.2000 e succ. mod. ed int.

La sottoscritta Anna Maria Natalia Corrigan nata a Meana Sardo, (Prov. NU), il 22/12/1960 residente in [redacted], consapevole delle sanzioni penali cui può andare incontro, nel caso di dichiarazioni mendaci, di formazione o uso di atti falsi, richiamate dall'art. 76 del D.P.R. n° 445/2000

**D I C H I A R A**

☒ di essere attualmente e con decorrenza dal 10/02/2004 in servizio presso l'Azienda Sanitaria Locale n° 8, in forza di contratto di lavoro subordinato a tempo indeterminato, nel profilo professionale di Dirigente Medico, nella disciplina di Direzione Medica di Presidio Ospedaliero, con rapporto esclusivo e che la prestazione è stata ed è svolta ☒ a tempo pieno ;

☒ di essere in possesso di un'anzianità di servizio nel profilo di Dirigente Medico, nella disciplina di Direzione Medica di Presidio Ospedaliero di n° 9 anni, come risulta dal certificato di servizio che l'Azienda è autorizzata a richiedere d'ufficio;

Di essere, pertanto, in possesso dell'anzianità di servizio richiesta per la partecipazione alla selezione pari a n° 5 anni.

Il sottoscritto dichiara di essere a conoscenza dell'art. 75 del d.p.r. 445/00, relativo alla decadenza dai benefici eventualmente conseguenti al provvedimento emanato qualora l'Asl n. 8, a seguito di controllo, verifichi la non veridicità del contenuto della presente dichiarazione. Il sottoscritto, ai sensi del D.Lgs 196/03 accorda il consenso affinché i propri dati possano essere trattati ed essere oggetto di comunicazione a terzi al fine di provvedere agli adempimenti di obblighi di legge.

Cagliari, 23/04/2013

Il Dichiarante \* 

\* la sottoscrizione deve essere apposta in presenza del dipendente addetto o del responsabile del procedimento. In luogo di tali modalità di sottoscrizione il dichiarante **può allegare alla dichiarazione fotocopia di un documento di riconoscimento in corso di validità.**

**ALLEGATO B**

**DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA RELATIVA ALLE CERTIFICAZIONI DI SERVIZIO PRESSO  
AZIENDE/ ENTI DEL SSN.  
( DPR n° 445/2000)**

Ai sensi degli artt. 46 e 47, D.P.R. n. 445 del 28.12.2000 e succ. mod. ed int.

La sottoscritta Anna Maria Natalia Corriga nata a Meana Sardo, (Prov. NU), il 22/12/1960, residente in Meana Sardo, Prov. NU, C.A. 07010 e domiciliata per la procedura selettiva in Meana Sardo, Prov. NU, C.A. 07010

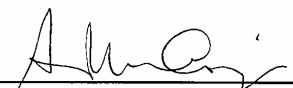
A tal fine, sotto la propria responsabilità, consapevole delle sanzioni penali in cui s'incorre in caso di dichiarazioni mendaci ai sensi di quanto disposto dall'art. 76 del d.p.r. 445/00,

DICHIARA

di aver maturato ulteriore anzianità di servizio complessiva di n° 9 anni, **rispetto ai 5 anni richiesti quale requisito di ammissione**, nella posizione di Dirigente Medico nella disciplina di Direzione Medica di Presidio Ospedaliero, come da certificato di servizio che l'Azienda è autorizzata a richiedere d'ufficio.

Il sottoscritto dichiara di essere a conoscenza dell'art. 75 del d.p.r. 445/00, relativo alla decadenza dai benefici eventualmente conseguenti al provvedimento emanato qualora l'Asl n. 8, a seguito di controllo, verifichi la non veridicità del contenuto della presente dichiarazione. Il sottoscritto, ai sensi del D.Lgs 196/03 accorda il consenso affinché i propri dati possano essere trattati ed essere oggetto di comunicazione a terzi al fine di provvedere agli adempimenti di obblighi di legge.

Cagliari, 23/04/2013

Il Dichiarante \* 

\* la sottoscrizione deve essere apposta in presenza del dipendente addetto o del responsabile del procedimento. In luogo di tali modalità di sottoscrizione il dichiarante **può allegare alla dichiarazione fotocopia di un documento di riconoscimento in corso di validità.**

**ALLEGATO E**

**DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA  
RELATIVA ALLA CONFORMITA' ALL'ORIGINALE DELLE PUBBLICAZIONI ALLEGATE  
( DPR n° 445/2000)**

Ai sensi dell' art. 47, D.P.R. n. 445 del 28.12.2000 e succ. mod. ed int.

La sottoscritta Anna Maria Natalia Corriga nata a Meana Sardo, (Prov. NU), il 22/12/1960, residente in Meana Sardo, Prov. NU, C.A.P. 07020, consapevole delle sanzioni penali cui può andare incontro, nel caso di dichiarazioni mendaci, di formazione o uso di atti falsi, richiamate dall'art. 76 del D.P.R. n° 445/2000

**D I C H I A R A**

che la fotocopia delle pubblicazioni di cui all'allegato elenco è conforme all'originale di cui è in possesso il soggetto indicato a margine di ciascuna di esse.

Il sottoscritto dichiara di essere a conoscenza dell'art. 75 del d.p.r. 445/00, relativo alla decadenza dai benefici eventualmente conseguenti al provvedimento emanato qualora l'Asl n. 8, a seguito di controllo, verifici la non veridicità del contenuto della presente dichiarazione. Il sottoscritto, ai sensi del D.Lgs 196/03 accorda il consenso affinché i propri dati possano essere trattati ed essere oggetto di comunicazione a terzi al fine di provvedere agli adempimenti di obblighi di legge.

Cagliari, 23/04/2013

Il Dichiarante \*



\* la sottoscrizione deve essere apposta in presenza del dipendente addetto o del responsabile del procedimento. In luogo di tali modalità di sottoscrizione il dichiarante **può allegare alla dichiarazione fotocopia di un documento di riconoscimento in corso di validità.**

# **ALLEGATO E**

## ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI ALLEGATE IN COPIA

N.	TITOLO	AUTORE / AUTORI	ESTREMI DELLA PUBBLICAZIONE	ORIGINALE IN POSSESSO DI
1	Una proposta per ridurre le liste d'attesa. <i>OK</i>	Sequi R., Meloni F., Sorrentino G., <u>Corriga A.M.</u> , Martelli V.	Progettare per la Sanità, <u>78</u> , 58-62, 2003; <i>X</i>	me medesimo
2	Studio biometrico e sanitario nei giovani coscritti sardi, classe 1976. <i>OK</i>	<u>Corriga A.M.</u> , Cucca M.M., Argiolas F., Manti A, Origa P., Gallus A.R., Minerba L. e Scarpa B.	Annali di Igiene Medicina Preventiva e di Comunità, <u>10</u> , S.2: 383, 1998; <i>X</i>	me medesimo
3	Studio delle cause di riforma durante lo svolgimento del servizio militare di leva. <i>OK</i>	Cucca M.M., Manti A, Argiolas F., <u>Corriga A.M.</u> e Scarpa B.	Annali di Igiene Medicina Preventiva e di Comunità, <u>10</u> , S.2: 386, 1998 <i>X</i>	me medesimo
4	Effetto degli inquinanti ambientali sulle patologie respiratorie. <i>OK</i>	Atzori L., <u>Corriga A.M.</u> , Montaldo C., Cannas E., Dore M. e Congiu L.	Atti: XVII Convegno sulla "Patologia da Tossici Ambientali ed Occupazionali" 75-80, Torino Moncalieri (I), 2000;	me medesimo
5	Sodium Metabisulfite and Citric Acid Induce Bronchoconstriction via a Sulfite-Sensitive Pathway in the Isolated Guinea Pig Lung <i>OK</i>	Atzori L., Bannenberg G., <u>Corriga A.M.</u> , Congiu L., Lundberg J.M., Moldeus P. and Ryrfeldt A.. - Respiration <u>64</u> : 145-151, 1997;	Respiration <u>64</u> : 145-151, 1997; <i>X</i>	me medesimo
6	Studio dei meccanismi della tolleranza al biossido di zolfo e al metabisolfito di sodio. <i>OK</i>	Atzori L., <u>Corriga A.M.</u> , Cannas E. e Congiu L.	G. Ital. Med. Lav. Erg. <u>19</u> : 1, 47-49, 1997; <i>X</i>	me medesimo
7	Partecipazione delle tachichinine in modelli sperimentali di danno polmonare. <i>OK</i>	Atzori L., <u>Corriga A.M.</u> , and Congiu L.	G. Ital. Med. Lav. <u>17</u> : 65-70, 1995; <i>X</i>	me medesimo



**ALLEGATO E**

8	Studio dei meccanismi della tolleranza al biossido di zolfo e al metabisolfito. Possibile ruolo del metabolita solfito. <i>OK</i>	Atzori L., <u>Corriga A.M.</u> , Cannas E. e Congiu L.	Atti: XII Convegno sulla "Patologia da Tossici Ambientali ed Occupazionali", Ancona (I), 1995;	me medesimo
9	Ruolo dei nervi sensoriali nella broncocostrizione da biossido di zolfo, metabisolfito e acido citrico. <i>OK</i>	Atzori L., <u>Corriga A.M.</u> , and Congiu L.	Atti: XXII Congresso Nazionale Società Italiana Patologia, Cagliari (I), p. 131, 1994;	me medesimo
10	Sulfur Dioxide-Induced Bronchoconstriction via Ruthenium Red-Sensitive Activation of Sensory Nerves. <i>OK</i>	Atzori L., Bannenberg G., <u>Corriga A.M.</u> , Lu Y-P., Lundberg J.M., Ryrfeldt A., and Moldeus P.;	Respiration <u>59</u> : 272-278, 1992 <i>X</i>	me medesimo
11	Ruolo dei gruppi sulfidrilici nel corso della bronco- e vasocostrizione indotta da perossido d'idrogeno e trombassano. <i>OK</i>	Atzori L., <u>Corriga A.M.</u> , Ryrfeldt A., Moldeus P., and Congiu L.	XXI Congresso Nazionale Società Italiana Patologia, S. Margherita Ligure (Ge) (I), pp. A23/1-A23/3, 1992;	me medesimo
12	Studio sui meccanismi della broncocostrizione indotta dal biossido di zolfo. <i>OK</i>	Atzori L., <u>Corriga A.M.</u> , Bannenberg G., Ryrfeldt A., Moldeus P., and Congiu L.	IX Convegno su "Patologia da Tossici Ambientali ed Occupazionali", Torino (I), pp. 153-156, 1993;	me medesimo
13	Mechanisms of sulfur dioxide-induced bronchoconstriction in the isolated perfused and ventilated guinea <i>OK</i>	Ryrfeldt A., Atzori L., Bannenberg G., <u>Corriga A.M.</u> , Lu Y-P., Lundberg J.M. and Moldeus P. -pig lung.	International Meeting on Risk Assesment of Urban Air: Emission, Exposure, Risk Identification and Quantitation. Stockholm (S) vol.II, p. 17, 1992;	me medesimo
14	Sulfur Dioxide Induced Bronchoconstriction in the Isolated Perfused and Ventilated Guinea-Pig Lung. <i>OK</i>	Atzori L., Bannenberg G., <u>Corriga A.M.</u> , Moldeus P. and Ryrfeldt A.	Respiration <u>59</u> : 16-21, 1992; <i>X</i>	me medesimo

**ALLEGATO E**

15	Vasoconstriction and bronchoconstriction induced by 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone, an endoplasmic reticular $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitor, in isolated and perfused rat lung. <i>OK</i>	Atzori L., Bannenberg G., <b><u>Corriga A.M.</u></b> , Ryrfeldt A., and Moldeus P.	Agents and Actions <u>36</u> : 33-38, 1992; <i>X</i>	me medesimo
16	Meccanismo della vaso- e broncocostrizione indotta dal 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzoidrochinone sul polmone di ratto isolato e perfuso. <i>OK</i>	Atzori L., <b><u>Corriga A.M.</u></b> , Moldeus P., and Congiu L.	Società Italiana di Patologia, Riunione Scientifica Intercongressuale, Roma (I), p.7, 1991;	me medesimo
17	Thiol modifications in $H_2O_2$ and thromboxane-induced vaso- and bronchoconstriction in rat perfused lung. <i>OK</i>	Atzori L., Olafsdottir K., <b><u>Corriga A.M.</u></b> , Bannenberg G., Ryrfeldt A. and Moldeus P.	J. Appl. Physiol. <u>71</u> , 1309-1314; 1991; <i>X</i>	me medesimo
18	Thiol modifications in $H_2O_2$ and thromboxane induced vasoconstriction and bronchoconstriction in rat perfused lung. <i>OK</i>	Bannenberg G., Atzori L., Olafsdottir K., <b><u>Corriga A.M.</u></b> , Ryrfeldt A. and Moldeus P.	Abstracts: "II International Conference on Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Radiation Injury", Berlin (D), 1991;	me medesimo
19	Effetti del biossido di zolfo sul polmone isolato e perfuso di cavia. <i>OK</i>	Atzori L., Bannenberg G., <b><u>Corriga A.M.</u></b> , Ryrfeldt A., Moldeus P. and Congiu L.	Atti: "VIII Convegno sulla Patologia da Tossici Ambientali e Occupazionali", Torino (I), p. 161-164, 1991;	me medesimo
20	Mechanisms of PCBs mixture on isolates rat epatocytes. <i>OK</i>	Atzori L., Flore C., <b><u>Corriga A.M.</u></b> , Cherchi P., Casula D. and Congiu L.	Industrial Health <u>29</u> : 57-64, 1991; <i>X</i>	me medesimo
21	Meccanismi di vaso- e broncocostrizione indotti da idroperossidi nel polmone isolato e perfuso di ratto. <i>OK</i>	Atzori L., Ryrfeldt A., <b><u>Corriga A.M.</u></b> , Congiu L. and Moldeus P.	Atti: "XX Congresso Società Italiana di Patologia", Modena (I), p.B9-11, 1990;	me medesimo

**ALLEGATO E**

22	Hydrogen peroxide induced broncho- and vasoconstriction in isolated perfused and ventilated rat lung. Role of thromboxane and sulfhydryl groups. <i>et</i>	Atzori L., Olafsdottir K., Ryrfeldt A., <b><u>Corriga A.M.</u></b> , and Moldeus P.	Abstracts: "VII International Conference on Prostaglandins and Related Compounds", Firenze (I), p.321, 1990;	me medesimo
----	--	---	--	-------------

23/04/2013



1

## Una proposta per ridurre le liste d'attesa

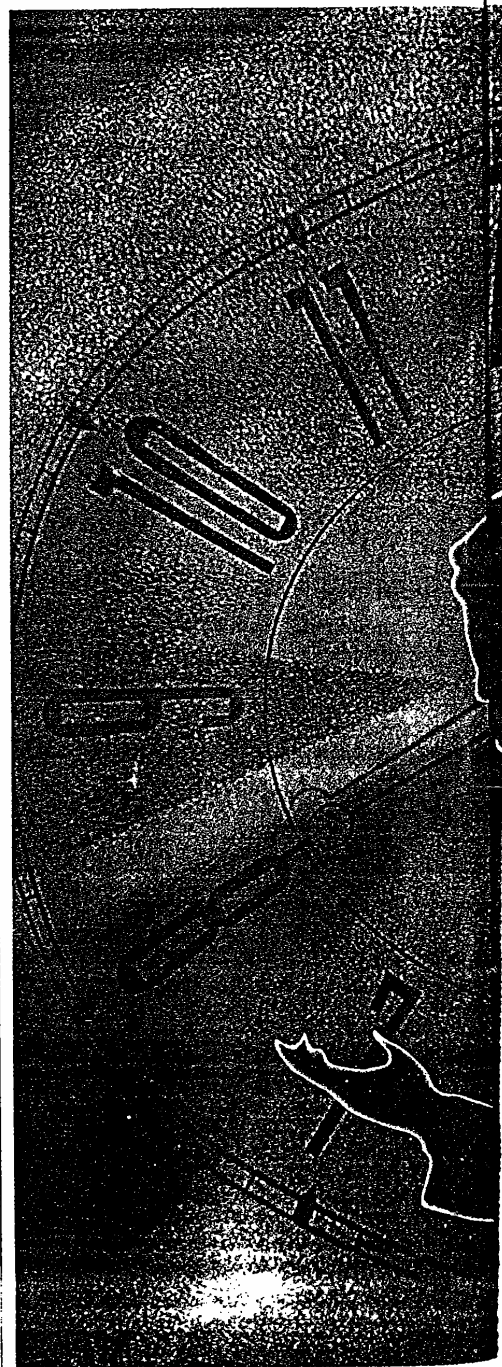
*Hospital waiting lists is one of the most delicate and difficult issues - both in Italy and other advanced nations*

*Following an analysis of the key factors that contribute to prolonging waiting times for heart-surgery operations, Brotzu Hospital management has implemented a series of strategies aimed at improving service and reducing patient hardship and discomfort*

La gestione delle liste d'attesa in Sanità costituisce uno dei problemi più delicati e difficili da risolvere, sia nel nostro Paese ma anche nelle altre nazioni a sviluppo avanzato. Dopo aver individuato e analizzato i vari fattori che hanno contribuito all'allungamento dei tempi d'attesa relativi alle prestazioni sanitarie di Cardiochirurgia, l'amministrazione dell'A.O. Brotzu ha messo in opera una serie di strategie operative finalizzate al miglioramento del servizio e alla diminuzione dei disagi per i pazienti.

I tempi d'attesa, relativi alle prestazioni sanitarie, costituiscono una delle problematiche più diffuse in tutti i sistemi sanitari dei Paesi a sviluppo avanzato. Il tema è molto delicato e di non facile soluzione, oltre a rappresentare uno dei determinanti della qualità dell'assistenza percepita dagli utenti.

Pertanto tutto ciò viene ribadito, nel maggio 2001, dalla relazione finale della Commissione per la formulazione di proposte operative e lo studio delle problematiche relative alla gestione dei tempi d'attesa del Ministero della Sanità sancisce che: "...garantire, a tutti i cittadini, tempi di accesso alle prestazioni sanitarie certi ed adeguati ai problemi clinici presentati rappresenta un obiettivo di primaria importanza del Servizio Sanitario nazionale. In quanto strumento atto a garantire il rispetto di fondamentali diritti della persona, quali la tutela della salute e l'eguaglianza nell'accesso



alle prestazioni sanitarie" (1).

La nuova Amministrazione dell'Azienda Ospedaliera "Brotzu", insediatasi alla fine del 2000, è fortemente impegnata nell'intento di ridurre le liste d'attesa, così come è indicato dal Ministero della Salute e dalla legislazione vigente in materia.

Una delle situazioni più critiche, riscontrate al momento dell'insediamento, è stata quella della lista d'attesa della Cardiocirurgia e alla cui soluzione si è profuso il massimo impegno.

Scopo di questo lavoro è appunto quello di illustrare le strategie che, in uno spirito fortemente collaborativo e altrettanto carico di motivazioni, sono state messe in opera.

#### Analisi della situazione

Il numero di interventi di cardiocirurgia necessari in Italia, come nel resto d'Europa, è di circa 1000 per milione d'abitanti (European Institute for Cardiac Survey).

Pertanto in Sardegna, che ha una popolazione di poco più di un milione e mezzo di abitanti, la domanda di interventi è di 1500/1600 l'anno.

Nel 1988 è stato aperto nell'Ospedale Brotzu il primo reparto di cardiocirurgia in Sardegna. Dalla fine degli anni '90 il reparto si è assestato su un'attività intorno ai 500 interventi l'anno.

Inoltre, sempre nello stesso periodo, anche Sassari è stata dotata di una struttura di cardiocirurgia che ha garantito circa 100 interventi l'anno.

Questa attività ha rappresentato, all'inizio del 2000, l'offerta da parte delle strutture ospedaliere sarde con una richiesta inevasa di circa un migliaio di interventi l'anno in quanto in Sardegna non esistono strutture private che svolgono attività di cardiocirurgia.

In una situazione di questo tipo è stata inevitabile la formazione di una lista che, nel 2000 all'Ospedale Brotzu, si è assestata su tempi

d'attesa di 18 mesi con un numero di circa 600 casi ai quali non era possibile dare riscontro.

Questa lista d'attesa, considerati i tempi, non ha avuto altra possibilità se non quella di allungarsi ulteriormente per due motivi, uno di natura clinica e l'altro di natura economica.

Quello clinico è stato determinato dal fatto che, con una lista d'attesa così lunga, era inevitabile che i casi giunti alla prima osservazione in condizioni di stabilità spesso sono diventati, a causa del lungo rinvio, delle urgenze sulle quali si è dovuti intervenire pressoché immediatamente, con il conseguente slittamento dell'attività di routine e quindi allungando i tempi d'attesa.

Il secondo motivo, quello economico, è derivato dal fatto che le tariffe con le quali la Regione Sardegna rimborsa i DRG cardiocirurgici sono quelle stabilite dal Ministero della Sanità nel 1994, con una ulteriore riduzione del 20 %.

È facile intuire come, a distanza di 9 anni, un tariffario del genere sia inadeguato.

Il risultato economico, in questi ultimi anni, è stato il seguente: per ogni intervento di cardiocirurgia l'ospedale ha avuto una perdita media di oltre 5.000 € e non certo per un problema di inefficienza.

In una situazione di questo genere, dove l'aumento della produttività della cardiocirurgia avrebbe alimentato il deficit del reparto e dell'Azienda, si sono innescati due fatti importanti con rilevanti risvolti di natura sociale, sanitaria ed economica.

L'impossibilità di operare in tempi ragionevoli per i pazienti con gravi cardiopatie ha significato comunque avere pazienti le cui condizioni instabili hanno richiesto più controlli, ricoveri in urgenza con aggravio di costi e carichi di lavoro più pesanti rispetto ad una gestione di malati stabili.

Il secondo aspetto è stato quello che i pazienti i quali non hanno voluto attendere la chiamata

CONFRONTO FRA I TARIFFARI REGIONI LOMBARDIA E SARDEGNA DEI PRINCIPALI DRG CARDIOCIRURGICI

DRG	DESCRIZIONE	Tariffa Reg. Lombardia €	Tariffa Reg. Sardegna €
104	Interventi sulle valvole cardiache con cateterismo	21.722,69	14.661,69
105	Interventi sulle valvole cardiache senza cateterismo	16.333,98	10.967,69
106	By-pass coronarico con cateterismo	15.854,71	12.479,66
107	By-pass coronarico senza cateterismo	11.866,11	6.501,68
108	Altri interventi sul sistema cardiovascolare	16.454,83	8629,99

## Organizzazione

dalla lista d'attesa hanno potuto farsi operare nelle strutture di altre Regioni (alto è stato l'afflusso verso la Lombardia), con gravi disagi sia per loro che per i loro parenti e correlato aggravio di spesa per le casse regionali in quanto i DRG cardiocirurgici delle altre regioni sono stati sempre remunerati a livelli ben più alti di quelli vigenti in Sardegna. Nel solo 2000 circa 500 pazienti sardi sono stati ricoverati e quasi sempre operati in ospedali del continente per interventi di chirurgia cardiaca o cardiologia emodinamica, con un esborso per le casse della Regione Sarda stimato intorno ai 1.400.000/1.500.000 €.

A questa spesa va sommata quella sostenuta per i rimborsi dei viaggi e dei soggiorni dei pazienti e di un loro parente, previsti dalla L.R. n. 26/91, nonché i costi per i controlli successivi all'intervento che, per giusti motivi di continuità terapeutica, si effettuano nelle strutture extraregionali.

In una situazione di questo tipo è stato doveroso, sia per motivazioni di natura etica che di natura economica (meno nobili ma sempre importanti), studiare una serie di interventi che potessero porre rimedio ad una situazione che cominciava ad avere delle connotazioni grottesche dal punto di vista gestionale - la Regione Sardegna con i suoi fondi stava creando occupazione in Lombardia! - ma drammatiche da quello assistenziale.

Quanto di seguito esposto illustra il programma avviato dall'Azienda il cui risultato, una volta raggiunti i vari step, consentirà di arrivare ad una produttività della cardiocirurgia del "Brotzu" di 900 interventi all'anno.

### RIPARTIZIONE QUOTE PROGETTO OBIETTIVO

1° Operatore	24%
2° Operatore	12%
Chirurghi di reparto	8%
Anestesisti	12%
Tecnici di pompa	7%
Cardiologi di reparto	5%
Infermieri strumentisti	4,5%
Infermieri di sala	3%
Ausiliari di sala	2%
Infermieri di T.I.	9,4%
Infermieri di reparto	4,5%
Tecnico di radiologia	0,8%
Ausiliari di reparto	1,55%
Fisioterapisti	3%
Amministrativi	3,25%

### Fasi dell'intervento

Il primo obiettivo su cui ci si è indirizzati è stato quello dell'adeguamento delle tariffe.

Con cifre e numeri alla mano è stata illustrata all'interlocutore politico di turno che l'adeguamento delle tariffe non significava un aumento della spesa sanitaria regionale.

Infatti è stato dimostrato che era sufficiente indirizzare buona parte dell'enorme flusso di danaro che ogni anno prendeva la via del mare per approdare nelle strutture di cardiocirurgia "continentali" verso le strutture ospedaliere isolane, adeguando i rimborsi dei DRG di cardiocirurgia.

La Giunta Regionale ha quindi preso l'impegno di adeguare le tariffe equiparandole al tariffario nazionale del 1997.

La promessa di acquisizione da parte del massimo organo politico regionale di questo impegno ha consentito di passare alla definizione degli interventi organizzativi all'interno della struttura di cardiocirurgia.

Il primo ha riguardato l'adeguamento del personale con l'assunzione di tre medici e undici infermieri la cui copertura dei costi dovrà derivare dall'adeguamento delle tariffe; gli altri interventi sono stati rivolti ad aumentare la recettività del reparto in virtù dell'aumento dei ricoveri.

Si è provveduto all'attivazione di altri quattro posti letto di terapia intensiva, provvedimento possibile dal punto di vista strutturale in quanto già previsti a suo tempo ma non attuabile fintanto che non si aveva la copertura del personale infermieristico.

Un altro provvedimento previsto, ma ancora in via di definizione, sarà l'apertura di un reparto di riabilitazione cardiologica dove poter trasferire i pazienti dopo i primi giorni di decorso post-operatorio.

In questo modo si garantirà un aumento del turn-over dei ricoveri nel settore delle degenze della cardiocirurgia che porterà ad una maggiore disponibilità di posti letto.

Infine, l'ultimo provvedimento adottato dall'Azienda è stato quello della realizzazione di un progetto obiettivo che garantisca un aumento della produttività della struttura riducendo ulteriormente la lista d'attesa.

Riteniamo opportuno al proposito illustrare i passaggi più importanti del progetto che si autofinanzia con l'aumento della produttività sottolineando come un'attenta ripartizione delle quote di incentivazione ha trovato un unanime consenso da parte degli operatori sanitari coinvolti e delle organizzazioni sindacali.

Il progetto parte dal fatto che, in base alle ri-



sorse disponibili, il reparto può effettuare 15 interventi la settimana, incluse le urgenze: il personale si è impegnato ad effettuare 2/3 interventi aggiunti al programma settimanale al di fuori dell'orario di servizio: due interventi vengono, infatti, di solito effettuati il sabato, con personale che timbra la presenza sotto una voce specifica, mentre per quello della corsia e della terapia intensiva è stato aggiunto un proporzionale numero di ore all'orario settimanale standard.

Dal punto di vista economico, la quota riconosciuta come incentivazione è rappresentata dal 50% della tariffa per ciascun ricovero, secondo una ripartizione al personale coinvolto come riportata nella tabella in basso alla pagina a fianco.

Al momento della stesura del presente lavoro l'attesa dei pazienti non urgenti è al di sotto dei 90 giorni, periodo di tempo ragionevole che consente la programmazione di tutte le indagini diagnostiche finalizzate all'intervento. Quest'ultimo aspetto consente di tenere, per il tempo che intercorre dall'inserimento nella lista all'intervento chirurgico, il paziente sotto controllo assicurandogli una tutela clinica e psicologica importante.

#### I risultati

Nel 2002 sono stati effettuati 779 interventi, determinando un aumento pari al 47% rispetto ai 529 del 2001.

Gli interventi effettuati in progetto obiettivo, iniziato il 15 aprile, sono stati 85.

Per questo progetto sono stati liquidati al personale 423.750 € a fronte di un rimborso di 847.500 € con il tariffario vigente in Sardegna.

Il totale generale dei costi della Cardiocirurgia nel 2002 è stato di 10.762.017 €, per un ricavo di 7.683.960 € e per una perdita di 3.078.057 €.

Nel 2001 il totale dei costi generali era stato, invece, di 8.339.000 €, a fronte di ricavi per 5.038.000 € di cui 5.026.000 determinati dall'attività di ricovero con una perdita pari a 3.300.000 € circa.

Deve essere notato come le perdite non sono dovute a sprechi o bassa produttività ma solo alla assoluta inadeguatezza del tariffario regionale del 1994 rispetto a quello nazionale la cui applicazione porterebbe ai risultati riportati nella tabella.

Ciò dimostra come il rimborso secondo il tariffario del 1997 - pur essendo vecchio di 6 anni - comporterebbe un incasso di due milioni e seicentomila euro in più rispetto al

#### VALORIZZAZIONE ATTIVITÀ DRG 2002 - CONFRONTO FRA I TARIFFARI 1994 E 1997

Rimborso secondo tariffario 1994	7.670.994 €
Rimborso secondo tariffario 1997	10.278.415 €

rimborso riconosciuto con il tariffario del 1994, con ciò portando sostanzialmente a pareggio il bilancio della struttura di cardiocirurgia.

L'aumento degli interventi chirurgici ha comportato logicamente l'aumento del peso medio dei DRG del reparto, così come riportato nella tabella.

#### PESO MEDIO DRG A CONFRONTO

ANNO	Peso medio
2001	4,6
2002	5,5

Ogni settimana il dipartimento di Patologia cardiaca comunica alla Direzione Sanitaria il numero degli interventi istituzionali e quelli in progetto obiettivo consentendo un monitoraggio, praticamente in tempo reale, dell'andamento dell'attività.

Inoltre è interessante evidenziare che, se i 250 casi in più del 2002 rispetto al 2001 fossero stati eseguiti in Lombardia (che fino al 2001 ha rappresentato la regione con il più alto indice di attrazione per i pazienti cardiopatici sardi), la spesa per la Regione Sarda sarebbe di circa 3.750.000 €, il tutto senza tenere conto delle spese legate ai viaggi dei pazienti e di un loro familiare nonché al disagio fisico e psicologico di dover affrontare un problema di tale portata lontano dalla propria casa e dai propri congiunti.

La riorganizzazione dell'attività del reparto ha comportato dei risultati assistenziali importanti non solo dal punto di vista quantitativo ma anche qualitativo.

A tal fine è interessante confrontare due indicatori significativi, fra il 2001 e il 2002, quali quello di mortalità e di pazienti infetti.

#### INDICATORI DI QUALITÀ - CONFRONTO 2001/2002

INDICATORE	2001	2002
Indice di mortalità	11,4	6,85
Incidenza di pazienti infetti	16,6%	12,1%

I due indicatori depongono per una situazione assistenziale qualitativamente migliore, nonostante l'aumento dei ricoveri e degli interventi chirurgici.

La riduzione dell'indice di mortalità è spiegabile col fatto che i pazienti giunti al ricovero e all'intervento sono più stabili e meno critici in

quanto si è spezzato quel circolo tortuoso dovuto alla presenza di una lunga lista d'attesa e che ha comportato, come già affermato, nella gran parte dei casi la gestione di pazienti che giungevano all'intervento in condizioni critiche. Per il problema delle infezioni, che stava assumendo degli aspetti preoccupanti, si è provveduto ad una revisione delle procedure comportamentali del personale nonché alla definizione e alla rigida applicazione dei protocolli della profilassi pre-operatoria, con particolare riferimento alla scelta degli antibiotici definiti da Comitato Infezioni Ospedaliere dell'Azienda.

L'aumento dell'attività della Cardiocirurgia ha inoltre comportato un pari aumento dell'Emodinamica, servizio clinicamente complementare, per il quale è stato definito un altro progetto obiettivo affinché non si creasse un collo di bottiglia per i pazienti cardiopatici con possibile indicazione chirurgica necessitanti di indagini di emodinamica, vanificando così il progetto della cardiocirurgia.

Anche per questo servizio è stato stabilito un tetto di prestazioni cosiddette istituzionali oltre il quale ogni prestazione è considerata effettuata in progetto obiettivo, peraltro legato al numero degli operatori in servizio per cui l'aumento della dotazione organica comporta automaticamente un innalzamento del numero delle prestazioni istituzionali.

Al momento attuale si ritiene che 2500 prestazioni di emodinamica possano soddisfare la domanda richiesta al "Brotzu" di cui 2000 istituzionali, 250 in progetto obiettivo e altrettante in attività di convenzione con altre aziende sanitarie della Sardegna.

### Conclusioni

Questo elaborato vuole dimostrare come il problema delle liste d'attesa in Sanità dipende da tanti fattori che, caso per caso, vanno individuati e analizzati.

Per quanto riguarda la Cardiocirurgia del Brotzu si è intervenuti a diversi livelli e la presa di coscienza del problema da parte di tutti coloro che sono stati coinvolti, ha contribuito a risolvere una situazione che ormai stava letteralmente sfuggendo a qualsiasi controllo.

Infatti, oltre alle conseguenze sulla salute dei pazienti, si era ormai instaurato un clima di disaffezione per la professione da parte degli operatori che si trovavano impotenti a gestire, quotidianamente, situazioni critiche con i malati e i loro parenti e con i medici e i loro colleghi di notizie di malasanità.

Uno degli aspetti positivi di questo intervento, oltre alla possibilità di dare ai pazienti risposte degne di un Paese civile, è stato il ritrovato clima di serenità e di fiducia nel proprio lavoro da parte del personale.

L'obiettivo di questo programma (900 interventi) sarà probabilmente raggiunto nel 2004, quando le diverse strutture che afferiscono al dipartimento di patologia cardiaca - cardiocirurgia, cardiologia, emodinamica, riabilitazione cardiologica - avranno perfezionato la loro piena integrazione assistenziale, garantendo un'attività in totale sinergia così come prevede la logica organizzativa del dipartimento.

Pur consci che comunque il problema della domanda di cardiocirurgia da parte della popolazione della Sardegna potrà essere risolto pressoché totalmente solo con il decollo definitivo del secondo centro (attualmente è parzialmente operativo a Sassari), vi è comunque la consapevolezza di essere riusciti a rendere un servizio migliore in tempi ragionevoli e soprattutto a ridurre i disagi per i pazienti.

**Roberto Sequi, Anna Maria Corrigan**

*Direzione Sanitaria A.O. Brotzu, Cagliari*

**Franco Meloni, Giorgio Sorrentino**

*Direzione Generale A.O. Brotzu, Cagliari*

**Valentino Martelli**

*Dipartimento Patologia cardiaca A.O. Brotzu, Cagliari*

### Bibliografia

- 1) Ministero della Sanità. "Relazione finale: analisi e proposte in tema di liste d'attesa nel SSN", Commissione per la formulazione di proposte operative e lo studio delle problematiche relative alla gestione dei tempi d'attesa. Roma, maggio 2001
- 2) Ministero della Salute. Direzione generale della programmazione sanitaria, "Rilevazione nazionale degli interventi attuali in tema di liste e tempi d'attesa dalle aziende USL ed Ospedaliere", giugno 2002
- 3) D.G.R. R.A.S. n° 51/19 del 24/11/98, "Indicazioni ai Direttori Generali delle Aziende Sanitarie Locali e Ospedaliere della Regione per l'applicazione art.3, comma 10 e 12 del D.Lgs. 124/1998"
- 4) *Linee guida standard e VRQ per i laboratori diagnostici in cardiologia*
- 5) Zaglio A., *Le leggi dell'ospedale*, Verducci ed.
- 6) *Piano sanitario Nazionale 2002-2004*
- 7) Manti A.F., Addis M.T., Sequi R., Spissu M., Martelli V., Meloni F. "Infezioni ospedaliere e cardiocirurgia", *Tecnica Ospedaliere*, agosto 03 n° 1



VOLUME 10 N. 4 (Suppl. 2) - LUGLIO-AGOSTO 1998



Pubblicazione bimestrale a cura  
dell'ISTITUTO DI IGIENE  
"G. SANARELLI"  
dell'Università di Roma  
"LA SAPIENZA"

# ANNALI DI IGIENE

## MEDICINA PREVENTIVA E DI COMUNITA'

38° CONGRESSO NAZIONALE SItI



**Qualità**  
in sanità pubblica:  
una strategia  
per l'Europa

27-30 Settembre 1998

**FIUGGI**

Terme • Palazzo della Fonte



**SItI**  
SOCIETA' ITALIANA  
DI IGIENE  
MEDICINA PREVENTIVA  
E SANITA' PUBBLICA



SOCIETA' EDITRICE UNIVERSO - ROMA

ISSN 1120-9135

Sped. Abb. Post. - 45% - art. 2 comma 20/b L. n. 662/96 - Filiale di Roma

**Studio biometrico e sanitario nei giovani coscritti sardi classe 1976**

AM CORRIGA, MM CUCCA, F ARGIOLOS, A MANTI, P ORIGA, AR GALLUS, L MINERBA, B SCARPA

*Dip. Igiene e S. P. - Univ. Cagliari*

**OBIETTIVO:** Lo studio del profilo sanitario dei coscritti è un utile indicatore dello stato di salute della popolazione giovanile. In particolare l'analisi biometrica e delle patologie riscontrate fornisce un utile strumento per la programmazione degli interventi sanitari. Nel presente lavoro sono stati analizzati i dati relativi ai coscritti della Regione Militare Sardegna per la leva di terra, classe 1976.

**MATERIALI E METODI:** Presso l'Archivio del Gruppo Selettori del Distretto Militare di Cagliari, a cui fa riferimento tutta la popolazione sarda, sono stati raccolti i dati secondari (comune di residenza, scolarità, dati biometrici, profilo sanitario, cause di osservazione e/o riforma) relativi a 10072 giovani chiamati alla visita di leva nel 1994 (classe 1976).

I risultati sono stati comparati con i dati disponibili presso il Ministero della Difesa relativi alle classi 1971-75.

**RISULTATI:** L'analisi dei dati biometrici ha rilevato che l'altezza media è di 172,9 cm (media nazionale, m.n. = 174,4), il peso medio è di 64,0 Kg (m.n. = 68,7), il body mass index è del 21,4 (m.n. = 22,6). La percentuale dei riformati è pari al 32,7% contro una base nazionale del 5,5%. In Sardegna la distrofia costituzionale è risultata essere la causa più frequente di esonero, similmente ai dati nazionali, anche se su base percentuale è più elevata (13,0% versus 0,8%). Al secondo posto, tra le cause di riforma in Sardegna, risulta essere la carenza dell'enzima glucosio-6 fosfato-deidrogenasi pari al 11,3%, mentre su base nazionale la prevalenza è di gran lunga inferiore allo 0,1%.

**CONCLUSIONI:** un'analisi preliminare sembra evidenziare differenze significative nella distribuzione dei dati biometrici e dei profili sanitari tra la Sardegna e il resto d'Italia, e anche tra le diverse aree della Sardegna. Un'ulteriore analisi delle correlazioni tra le variabili sanitarie e le aree geografiche regionali è in corso.

**Studio delle cause di riforma durante lo svolgimento del servizio militare di leva**

MM CUCCA, A MANTI, F ARGIOLOS, AM CORRIGA, B SCARPA

*Dip. Igiene e S.P. - Univ. Cagliari*

**Obiettivi:** lo studio dello stato di salute dei giovani maschi adulti della regione Sardegna tramite l'analisi delle patologie invalidanti durante lo svolgimento del servizio di leva.

**Materiali e metodi:** dall'archivio dell'Ospedale Militare di Cagliari sono stati raccolti i dati secondari relativi a 1489 giovani riformati durante il servizio di leva (esclusa la Marina) presso la Regione Militare Sardegna nel triennio 1994-96. I dati riguardano età, residenza, giorni di degenza convalascenza e causa di riforma. Tali dati sono stati confrontati con ricerche riguardanti il profilo sanitario dei coscritti tanto della stessa regione, quanto del resto d'Italia.

**Risultati:** L'età media al momento del ricovero è di 20,8 anni. La degenza ospedaliera media è di 2 giorni. Le riforme sono così distribuite: esercito 86,8%, aviazione 12,2%, il restante 1,0% è ripartito tra obiettori di coscienza ed ausiliari. Le cause più frequenti di riforma sono le patologie neuropsichiatriche (32,0%), la G6PDH carenza (20,2%) e le patologie dell'apparato locomotore (10,3%). Tra le altre, ricordiamo patologie degli organi di senso (6,6%), allergopatie ed asma (4,6%) e patologie dell'apparato urinario (4,4%). Confrontando tali risultati con le cause più frequenti di esonero al momento della visita di leva, su base regionale abbiamo distrofia costituzionale (39,7% del totale dei riformati per l'anno 1994) e G6PDH carenza (34,5%); su base nazionale, la stessa distrofia costituzionale (16,7% del totale dei riformati per l'anno 1993) e le patologie dell'apparato cardiovascolare (7,3%).

**Conclusioni:** Lo studio per un anno di una coorte di giovani presumibilmente sani (in quanto già dichiarati abili e chiamati allo svolgimento del servizio militare) sembra rivelare un difficile adattamento di molti di essi ad una situazione psicologicamente stressante. D'altra parte risalta l'importanza della G6PDH carenza, situazione ovviamente già presente al momento della visita di leva e probabilmente non conosciuta dai soggetti, perciò non dichiarata ed indagata. Riteniamo quindi che l'uso di sistemi di monitoraggio come questo, unito alla collaborazione della Autorità Militare, potrebbe rivelarsi un efficace strumento di prevenzione e promozione della salute.



Gruppo di Ricerca per la Prevenzione  
della Patologia Ambientale

4

# **ATTI DEL XVII CONVEGNO SULLA PATOLOGIA DA TOSSICI AMBIENTALI ED OCCUPAZIONALI**

**TORINO MONCALIERI  
LE VALLERE  
11 Settembre 2000**

# **XVII**

**2000**

**Università degli Studi di Torino  
Dipartimento di Medicina e Oncologia Sperimentale  
Sezione di Patologia Ambientale**

## EFFETTO DEGLI INQUINANTI AMBIENTALI SULLE PATOLOGIE RESPIRATORIE

L. Atzori, A.M. Corrigan, C. Montaldo, E. Cannas, M. Dore e L. Congiu

Dipartimento Tossicologia, Sezione Oncologia e Patologia Molecolare  
Università degli Studi, Cagliari

### RIASSUNTO

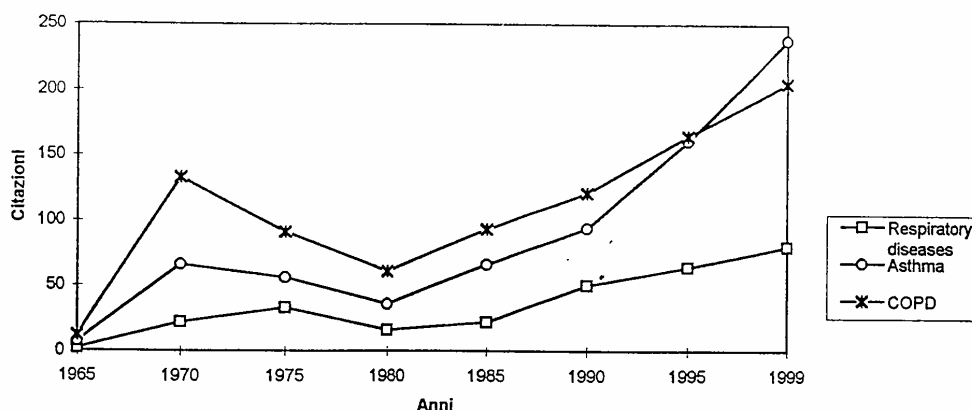
L'inquinamento ambientale è diventato, negli ultimi anni, uno dei principali problemi di sanità pubblica. Di conseguenza sono stati avviati numerosi studi per valutare la possibile correlazione tra i livelli degli inquinanti ambientali e l'incidenza di malattie respiratorie quali l'asma, la bronchite cronica, l'enfisema, la fibrosi polmonare e i tumori. Gli inquinanti ambientali agiscono sull'apparato respiratorio alterando la reattività polmonare e inducendo broncocostrizione e immunosoppressione. I meccanismi alla base di tale fenomeno coinvolgono tutte le strutture del sistema respiratorio (nervoso, cellulare, muscolare, umorale, vascolare e recettoriale). Uno dei problemi più importanti nella comprensione della risposta agli inquinanti è la diversa suscettibilità individuale. Tra gli inquinanti ambientali un ruolo particolare sembra essere svolto dall'ozono e dagli ossidi di azoto e di zolfo. Numerosi studi hanno mostrato che l'associazione tra i diversi inquinanti ha un effetto sinergistico. E' stata evidenziata anche una correlazione con le variazioni climatiche. Al momento attuale si può sostenere che inquinanti ambientali e occupazionali inducono delle variazioni della funzione respiratoria, soprattutto, in coloro già affetti da disturbi respiratori. La scoperta dei possibili meccanismi di danno da inquinanti potrebbe migliorare la valutazione del rischio per la popolazione in generale ed i pneumopatici in particolare.

L'inquinamento ambientale è diventato negli ultimi anni, uno dei principali problemi di sanità pubblica. Gli inquinanti ambientali comprendono diversi gas e polveri, con potenziali effetti dannosi sulla salute. Nella metà del '900, in Europa e Nord-America, ci furono alcuni gravi episodi di inquinamento ambientale, che portarono ad un aumento della mortalità e dell'incidenza delle patologie cardiorespiratorie. Questi fatti stimolarono un notevole interesse per quanto riguarda la correlazione tra inquinanti presenti nell'aria e stato di salute. Nel 1930, nella stretta valle di Meuse, in Belgio, diverse centinaia di persone si ammalarono di disordini respiratori e ci furono più di 60 decessi. Nel 1948 a Donora, una piccola città della Pennsylvania, ci furono 18 decessi e migliaia di individui vennero colpiti da malattie respiratorie. Nel 1952, a Londra si registrarono 4.000 morti per patologie cardiovascolari da inquinanti ambientali. Altro esempio è l'epidemia di asma a Barcellona dovuta all'inalazione di polvere di soia e la cosiddetta asma di Yokohama anch'essa collegata allo smog. In ognuno di questi episodi giocarono un ruolo importante le condizioni climatiche: temperatura, umidità, vento, inversione termica. In questi episodi le cause di morte o di ricovero erano determinate da: asma, bronchiti e coronaropatie.

Alcuni inquinanti si trovano solo in particolari ambienti, come quelli industriali, altri si trovano invece ampiamente dispersi nell'atmosfera che sovrasta gli ambienti urbani ed extraurbani e, persino, negli ambienti più ristretti come all'interno delle abitazioni. Da ciò si deduce quale possa essere la ricaduta dell'inquinamento atmosferico sulla salute dell'uomo e la dimensione del problema sul piano della prevenzione

Negli ultimi anni è in continuo aumento l'interesse, anche a livello dell'opinione pubblica sugli effetti degli inquinanti ambientali a carico dell'apparato respiratorio, e sempre più numerosi studi hanno cercato di valutare la possibile correlazione tra i livelli degli inquinanti ambientali e l'incidenza di malattie respiratorie quali l'asma, la bronchite cronica, l'enfisema, la fibrosi polmonare e i tumori (Tab.I).

Tab.I-Pubblicazioni su inquinanti ambientali e malattie respiratorie, asma e BPCO in MEDLINE



Tra gli organi del corpo umano, il polmone è probabilmente quello maggiormente esposto a composti xenobiotici. Per mezzo del polmone un uomo adulto espone circa 40-120 m<sup>2</sup> di superficie a circa 10.000-20.000 litri di aria che contiene una miriade di inquinanti sotto forma di batteri, gas, fibre e particelle. Gli inquinanti ambientali sono in grado di agire sull'apparato respiratorio a vari livelli sia di ordine anatomico (alte e basse vie aeree), sia di ordine cellulare (epitelio, strutture bronchiali, macrofagi, linfociti e cellule della flogosi). Le alterazioni funzionali ed anatomiche che conseguono, dipendono inoltre dal tipo di esposizione (acuta o cronica), dalla concentrazione e dal tipo degli inquinanti. Possiamo meglio dire che gli effetti degli inquinanti sono correlati al livello di esposizione, alle caratteristiche dell'inquinante, alle abitudini del soggetto e ad altre attività che aumentano il contatto con sostanze nocive.

Un'eventuale stima del danno respiratorio da inquinanti è quindi molto complessa, in quanto deve tenere conto di tutti questi aspetti, e si avvale di vari indicatori di danno, di ordine clinico, funzionale e cellulare.

I parametri funzionali respiratori, la reattività bronchiale, lo stato del sistema immunitario e i sintomi respiratori possono essere considerati come indicatori dello stato di salute respiratoria. L'effetto più comune degli inquinanti ambientali, sulla funzione respiratoria è l'induzione di bronco-costrizione. In generale, comunque, questo effetto è reversibile e non costituisce un rischio per i soggetti sani. In studi controllati gli inquinanti atmosferici sembrano modificare la reattività bronchiale nel soggetto asmatico, nell'atopico e anche nel sano. In particolare, esposizioni recenti a inquinanti quali l'ozono e l'SO<sub>2</sub> sono in grado di aumentare la reattività bronchiale. D'altra parte i soggetti iperreattivi sono più sensibili all'effetto degli inquinanti. L'iperreattività bronchiale è una condizione di alterata reattività della funzione polmonare a stimoli che hanno un effetto minimo o nullo nei soggetti normali. I meccanismi alla base di tale condizione coinvolgono tutte le strutture del sistema respiratorio (nervoso, cellulare, muscolare, umorale, vascolare e recettoriale).

Gli inquinanti ambientali diminuiscono le difese respiratorie nei confronti di infezioni. Vi è evidenza che ozono, SO<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub> aumentano la suscettibilità dell'individuo alle infezioni respiratorie. Studi sperimentali suggeriscono un effetto di immunosoppressione: per esempio i macrofagi presentano una ridotta capacità inattivante in vitro il virus dell'influenza dopo esposizione in vivo con NO<sub>2</sub>. Una ridotta attività battericida è stata evidenziata in macrofagi alveolari di conigli esposti ad ozono. L'approfondimento della relazione infezioni-inquinamento rappresenta uno degli aspetti più interessanti per lo sviluppo dell'epidemiologia ambientale.

Al fine di comprendere l'esposizione ai contaminanti e il loro effetto sullo stato di salute bisogna tenere in considerazione:

- il tipo e le dimensioni delle particelle presenti nell'aria
- le fonti di origine dei contaminanti
- la natura chimica dei vari agenti e l'interazione nell'atmosfera
- la distribuzione degli inquinanti
- la sensibilità della popolazione
- i metodi di valutazione

Uno dei problemi più importanti nella comprensione della risposta agli inquinanti è la diversa suscettibilità individuale. La suscettibilità può essere innata (p.e. genetica) o acquisita (p.e. infezioni, allergie, irritanti). Spesso si è osservato che i fumatori hanno alterate funzioni polmonari e un aumento delle secrezioni mucose, entrambi questi fattori possono influenzare la distribuzione, l'assorbimento e l'effetto dell'inquinante inalato. Anche il fattore età può influenzare la suscettibilità agli inquinanti ambientali. In genere i giovani risultano essere più suscettibili dell'adulto. Nel caso degli anziani bisogna tenere in considerazione la presenza di patologie a carico dell'apparato respiratorio, che li renderebbe più sensibili.

Il livello e il genere di danno che si sviluppa a seguito del contatto con un inquinante dipendono dalla quantità dell'inquinante e dal tempo di contatto. Pertanto per stimare i potenziali effetti degli inquinanti ambientali sono necessari studi sperimentali. Gli studi epidemiologici osservazionali sull'uomo si riferiscono a basse esposizioni per brevi periodi. Gli studi con animali sono più appropriati per esaminare i meccanismi patogenetici e le alterazioni biochimiche causate da esposizioni acute o croniche a diverse concentrazioni degli inquinanti. Il grosso limite con gli studi di animali è che questi possono a volte essere difficilmente trasferiti all'uomo. Quindi, gli studi su animali o sull'uomo devono considerarsi complementari per comprendere i meccanismi di danno polmonare da parte di inquinanti.

Tra gli inquinanti ambientali un ruolo particolare sembra essere svolto, anche per la loro elevata concentrazione, da ozono, ossidi di azoto e di zolfo. Pertanto, alcune considerazioni particolari verranno fatte su questi composti.

## OZONO

A differenza dell'altamente solubile  $\text{SO}_2$  o del parzialmente solubile  $\text{NO}_2$ , l'ozono è insolubile in acqua. Pertanto riesce ad arrivare sino alle parti più distali dell'albero respiratorio. L'ozono è il più ossidante dei gas inquinanti. La sua tossicità sulle membrane cellulari determina ossidazione di amino acidi e grassi acidi insaturi. Può essere prodotto nei posti di lavoro, ma la sua maggior produzione avviene nell'atmosfera. L'ozono si forma naturalmente ad alte altitudini, come risultato delle radiazioni ultraviolette sull'ossigeno, che si dissocia in radicali dell'ossigeno, i quali reagendo con altre molecole di ossigeno danno luogo all'ozono. La combustione incompleta di idrocarburi può, attraverso un aumento di  $\text{NO}_2$ , dare origine a reazioni chimiche che producono  $\text{O}_3$ . Il tentativo di ridurre le concentrazioni di ozono si deve basare sulla necessità di diminuire la produzione di altri inquinanti quali  $\text{NO}_2$  e idrocarburi. Le automobili sono i principali produttori di  $\text{O}_3$  secondario.

Numerosi studi sono stati effettuati sugli effetti dell'ozono sulle funzioni polmonari. Questi studi hanno indicato che concentrazioni di ozono presenti nell'aria possono influenzare le funzioni polmonari. Di significativa importanza è il fatto che esiste una popolazione di individui (10-20 %), che rispondono all'esposizione all'ozono con una caduta del FEV1, mentre altri sono resistenti, questo a prescindere che siano asmatici o no. Gli individui con BPCO sembrano essere resistenti agli effetti dell'ozono. La risposta all'ozono varia nel corso dell'anno e sembra correlarsi a meccanismi di tolleranza.

## OSSIDI D'AZOTO

Gli ossidi d'azoto includono  $\text{NO}$  e  $\text{NO}_2$ . Questi gas sono prodotti principalmente durante combustioni ad alta temperatura e formati per reazioni tra azoto e ossigeno.  $\text{NO}$  è parzialmente ossidato e convertito a  $\text{NO}_2$ . L' $\text{NO}_2$  è considerato il più tossico degli ossidi d'azoto. L' $\text{NO}_2$  è poco idrosolubile, pertanto non raggiunge gli alveoli in quantità significative, eccetto a concentrazioni molto elevate.

L' $\text{NO}_2$  è un comune inquinante delle aree urbane e le sue concentrazioni raggiungono due picchi, la mattina e la sera nelle ore di maggiore traffico. L' $\text{NO}_2$  è anche presente in ambiente confinato: industrie e ambienti domestici. L' $\text{NO}_2$  è un prodotto di molti processi di combustione, ed è presente nelle emissioni degli autoveicoli. L' $\text{NO}_2$  è anche il maggior componente dell'inquinamento "indoor", essendo generato dal fumo di sigaretta e durante la combustione di prodotti naturali (gas, kerosene), spesso usati come fonte di riscaldamento e per cucinare. E' stata mostrata un'aumentata incidenza di malattie respiratorie delle basse vie in residenti in case con cucine a gas rispetto a quelli con cucine elettriche. Questo effetto è stato correlato con una maggiore concentrazione di  $\text{NO}_2$ .

I risultati degli studi sugli effetti del danno da  $\text{NO}_2$  sulle vie respiratorie sono abbastanza variabili e le conclusioni sembrano essere ancora incomplete.

Gli effetti dell' $\text{NO}_2$  e  $\text{O}_3$  sul sistema respiratorio possono essere così riassunti:

- alte dosi causano morte per edema polmonare
- breve esposizione a dosi subletali causa effetti reversibili quali: alterazione funzione, iperreattività, danno epiteliale, infiammazione
- esposizione cronica causa danno irreversibile, quale enfisema e fibrosi
- l'associazione ha effetto sinergistico

#### BIOSSIDO DI ZOLFO

E' altamente solubile in acqua, a differenza di  $\text{NO}_2$  e ozono. Pertanto circa il 98% durante la respirazione nasale è assorbito nel nasofaringe e solo una minima parte raggiunge la parte periferica del polmone. L' $\text{SO}_2$  costituisce una percentuale importante degli inquinanti ambientali. La maggior fonte di  $\text{SO}_2$  nell'ambiente origina dai processi di combustione dei motori diesel delle automobili e dagli impianti di riscaldamento a gasolio. Elevate quantità sono prodotte in diversi processi industriali come le raffinerie, industrie cartarie e centrali elettriche. Un'altra importante sorgente è l'attività vulcanica, la cui produzione è circa il 5-10% rispetto a quella industriale.

Numerosi meccanismi sono stati suggeriti come responsabili degli effetti dell' $\text{SO}_2$  sull'apparato respiratorio. L' $\text{SO}_2$  è probabilmente assorbito e quindi convertito in acido solforico e bisolfati. E' possibile che l'abbassamento del pH e l'attivazione di terminazioni nervose sensoriali svolga un ruolo chiave nella broncospasmatura e nell'iperreattività che caratterizza l'esposizione a questo gas. In particolare gli individui asmatici risultano rispondere a più basse concentrazioni di  $\text{SO}_2$  rispetto a quelli normali.

Numerosi studi hanno mostrato che variazioni giornaliere della temperatura e, forse, l'umidità siano più importanti delle singole sostanze presenti nell'aria inalata nello scatenare la comparsa o la riattivazione di patologie respiratorie. Al momento attuale si può sostenere che inquinanti ambientali, domestici, industriali, inducono delle variazioni della funzione respiratoria, soprattutto, in coloro già affetti da disturbi respiratori.

La ricerca dei meccanismi di danno polmonare da inquinanti o tossici può fornire informazioni utili per la comprensione di malattie respiratorie quali asma, bronchite, fibrosi e enfisema.

Studi di esposizione sugli uomini hanno vantaggi e svantaggi. E' ovvio che è meglio studiare gli effetti di un inquinante sulla specie la cui esposizione ci preoccupa. In questo caso, è importante tenere conto della diversa suscettibilità individuale e di gruppo. Per esempio atopici, fumatori, bronchitici cronici, come pure le diverse età dei soggetti studiati. Il limite degli studi umani è nell'impossibilità per ragioni etiche ad effettuare certi livelli di esposizione, ad acquisire il materiale da studiare. Pertanto ci si deve affidare agli studi epidemiologici prospettici osservazionali.

Le malattie respiratorie, specialmente quelle su base allergica, sembrano aumentare in numerose nazioni, e i soggetti residenti in aree urbane o industrializzate sembra che vadano più facilmente incontro a questo tipo di patologie rispetto agli individui residenti in aree rurali. Questo aumento è stato collegato, tra vari fattori, all'inquinamento dell'aria. Studi di laboratorio confermano l'evidenza epidemiologica che l'inalazione di alcuni inquinanti, o individualmente o in combinazione, determinano un peggioramento della funzione respiratoria. A differenza di studi precedenti, dati più recenti indicano anche una possibile associazione tra inquinamento atmosferico e insorgenza di tumori.



In conclusione, possiamo dire che l'esposizione a inquinanti ambientali:

- può essere causa, insieme ad altri fattori, dell'insorgenza o aggravarsi di malattie respiratorie,
- è una causa importante di aggravamento dell'asma e della BPCO ( Questo determina incapacità lavorativa, costo economico e riduzione qualità della vita),
- influenza e fa parte della storia naturale delle malattie croniche respiratorie mediante aumentata reattività bronchiale, aumento infiammazione e ridotta funzione polmonare,
- può determinare possibile alterazione della funzione immune.

In prospettiva si possono auspicare nei prossimi anni:

- adeguati studi epidemiologici e metodi di valutazione degli effetti degli inquinanti ambientali sul polmone,
- l'identificazione di biomarkers dello stato di danno polmonare
- lo studio degli effetti acuti sulla eziologia e la storia naturale di malattie croniche
- la messa a punto di metodi per studiare l'esposizione quantitativa e la relazione dose-risposta a singoli o complessi di inquinanti ambientali.

La scoperta dei possibili meccanismi di danno degli inquinanti potrebbe migliorare la valutazione del rischio per la popolazione in generale e i pneumopatici in particolare, essendo questi ultimi maggiormente suscettibili agli inquinanti atmosferici. Questi aspetti sono importanti per quanto riguarda la salute pubblica perché infezioni, allergie, malattie del tratto respiratorio rappresentano una grossa quota delle malattie della popolazione generale e comportano un notevole costo economico, perdita di lavoro, scuola, visite dal medico e ricoveri in ospedale. Al momento non è stato stabilito quali sono i singoli inquinanti e le loro concentrazioni responsabili dell'aumentata incidenza di malattie respiratorie. Questo non risulta facile, dato il numero elevato di potenziali inquinanti atmosferici e i fattori individuali che influenzano il loro effetto e contribuiscono a determinare il rischio di patologie respiratorie.

#### Bibliografia consigliata

1. Sandstrom T, Eur Respir J, 1995, 8: 976-995
2. Chitano P, Hosselet JJ, Mapp CE, Fabbri LM, Eur Respir J 1995, 8: 1357-1371
3. Lebowitz MD, Eur Respir J, 1996, 9: 1029-1054
4. Linn WS, Gong H, Curr Opin Pulm Med, 1999, 5:21-26
5. D'Amato G, Monaldi Arch Chest Dis 1999, 54:470-474
6. Jones AO, J Asthma, 2000, 37: 103-124

L. Atzori<sup>a,c</sup>  
G. Bannenberg<sup>a</sup>  
A.M. Corrigan<sup>a,c</sup>  
L. Congiu<sup>c</sup>  
J.M. Lundberg<sup>b</sup>  
P. Moldèus<sup>a</sup>  
A. Ryrfeldt<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Environmental Medicine,  
Division of Toxicology and

<sup>b</sup> Department of Physiology and  
Pharmacology, Karolinska Institute,  
Stockholm, Sweden;

<sup>c</sup> Department of Toxicology, Section of  
General Pathology, University of Cagliari,  
Italy

## Sodium Metabisulfite and Citric Acid Induce Bronchoconstriction via a Sulfite-Sensitive Pathway in the Isolated Guinea Pig Lung

### Abstract

Inhalation of sodium metabisulfite (MBS; 80 mM; pH  $2.9 \pm 0.1$ ) or citric acid (CA; 0.4 M; pH  $2.0 \pm 0.1$ ) aerosols induced a reduction in compliance and conductance in the isolated perfused and ventilated guinea pig lung without affecting perfusion flow. The effect was dependent on the pH of the nebulized solution since inhalation of 80 mM MBS aerosols at pH 7.4 did not induce any effect on bronchial tone. Concomitantly to the bronchoconstriction induced by MBS or CA an increased level of calcitonin gene-related peptide (CGRP-LI) in the effluent perfusate was observed, indicating activation of sensory nerves. Sodium sulfite, a dissolution product of MBS, has previously been shown by our studies to reduce bronchoconstriction induced by inhalation of sulfur dioxide, in the isolated perfused and ventilated guinea pig lung. In the present study perfusion of the lung with sodium sulfite (3 mM) before and during exposure to aerosols with either MBS or CA attenuated the bronchoconstriction induced by the acidic solutions. The release of CGRP-LI induced by MBS or CA was not affected by sodium sulfite. Sulfite treatment did not modify perfused guinea pig lung reactivity towards acetylcholine (4 nmol), bradykinin (100 pmol), histamine (10 nmol), serotonin (500 pmol) and substance P fragment 5–11, a substance P analogue resistant to degrading enzyme (500 pmol). However, an inhibitory effect by sodium sulfite was observed on bronchoconstriction induced by the NK-2 agonist neurokinin A fragment 4–10 (NKA 4–10, 25 pmol). These results indicate that MBS- or CA-induced bronchoconstriction was dependent on the low pH of the aerosol solution and coincided with activation of sensory nerves. Sulfite modulation of the bronchoconstricting action of inhaled MBS and CA is suggested to be related to a sulfite-sensitive step in the signal transduction of the neuropeptide NKA.

### Key Words

Metabisulfite  
Citric acid  
Sensory nerves  
Tachykinins  
Bronchoconstriction

### Introduction

Exposure of the airways to acidic solutions or aerosols can induce marked bronchoconstriction [1, 2]. It has been reported that the effects of inhaled hydrochloric acid, gas-

tric juice or citric acid on the airways are blocked by pre-treatment with capsaicin [3], suggesting the involvement of sensory nerves. Other evidence for a neuropeptide-mediated mechanism in acid-induced bronchoconstriction are the protective effects obtained by treatment with

### KARGER

E-Mail karger@karger.ch  
Fax +41 61 306 12 34  
http://www.karger.ch

© 1997 S. Karger AG, Basel  
0025-7931/97/0642-0145\$12.00/0

Luigi Atzori, MD, DrMSc  
Department of Toxicology, Section of General Pathology  
University of Cagliari  
Via Porcell 4  
I-09100 Cagliari (Italy)

ruthenium red, capsazepine and tachykinin antagonists [1, 4, 5].

Acidic aerosols are largely present in the polluted atmosphere and can contain SO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub>-derived compounds. These are considered to contribute to the increased incidence of respiratory diseases, especially in industrialized areas [6]. The mechanism of acid solution-induced bronchoconstriction and the exaggerated reactivity of some subjects to acidic aerosols are unknown. Increased airway responsiveness is a fundamental aspect of asthma featured by bronchoconstriction in response to a variety of stimuli at concentration which are less than those required to induce similar responses in normal subjects.

Metabisulfite (MBS) is commonly used as a food and wine preservative and antioxidant. Dissolution of MBS leads to the formation of sulfurous acid, bisulfite and sulfite ions, as well as a decrease in pH, and the relative prevalence of these molecular species in solution is determined primarily by pH [7]. Frequent inhalation or ingestion of MBS by patients with asthma and by atopic non-asthmatic patients induces bronchoconstriction [8]. Inhalation of SO<sub>2</sub> itself and bisulfite, but not sulfite, will produce bronchoconstriction in asthmatic individuals [7]. Recently it has been shown that perfusion of the guinea pig lung with an acidic solution causes bronchoconstriction and neuropeptide release similarly to that seen with capsaicin [2]. Capsaicin can stimulate sensory nerves through the opening of ion channels similar to those activated by protons [9]. Also, MBS- and SO<sub>2</sub>-induced bronchoconstriction may be mediated by the release of neuropeptides from sensory nerves [1, 4].

The response of the lung to bronchoconstriction agents shows a tendency to diminish with repeated challenge [10, 11]. This occurs, especially after challenges such as exercise, ultrasonically nebulized distilled water, MBS and SO<sub>2</sub>, by an unknown mechanism. During SO<sub>2</sub> inhalation or MBS perfusion we showed an inhibitory effect mediated by sulfite, a dissolution product of these agents [12].

Using the isolated perfused and ventilated guinea pig lung we evaluated the contribution of the pH in MBS-induced bronchoconstriction and the role of sulfite in modulating the bronchoconstriction by MBS and citric acid (CA), as well as several different autacoids.

## Methods

### *Isolated and Perfused Guinea Pig Lung*

Male guinea pigs of an outbred Dunkin-Hartley strain, weighing 250–350 g, were used in this study. The animals had ad libitum access to a commercial diet (KL, Lactamin, Stockholm, Sweden). The animals were anesthetized with pentobarbital (Mebumal Vet, Nord-Vacc, Sweden) 40 mg/kg body weight. The lungs were then removed as previously described and suspended in a humidified thoracic chamber [13]. The perfusion medium used was a Krebs-Ringer bicarbonate buffer (composition in mM: NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 24.9, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2) with the addition of 12.5 mM HEPES, 5 mM glucose and 2% bovine serum albumin, fraction V (Boehringer-Mannheim, Germany). All chemicals were of analytical grade and obtained from a local supplier. The buffer level in the reservoir chamber was kept constant (10–15 cm above the lung) throughout the experiments. The buffer pH was kept at 7.35–7.45 by CO<sub>2</sub> administration and thermostated to 37°C.

Once put into the thoracic chamber the lungs were ventilated at 50 breaths/min by creating an alternating negative pressure (–0.1 to 1.1 kPa) inside the thoracic chamber using a Harvard animal respirator (Model 680, Harvard Apparatus, USA).

The tracheal airflow was measured with a heated Fleish pneumotachograph type 0000 (A. Fleish, Switzerland) and a pressure sensor (164pc, Honeywell, USA). The thoracic pressure changes were monitored with a pressure sensor (174pc, Honeywell, USA). The signals were transformed and amplified via a Coulbourn Lablinc Interface system (Coulbourn Instruments, Lehigh Valley, Pa., USA) and recorded directly on a computer where calculation of lung conductance and dynamic compliance was performed [14]. The perfusion flow was measured manually and recorded with time.

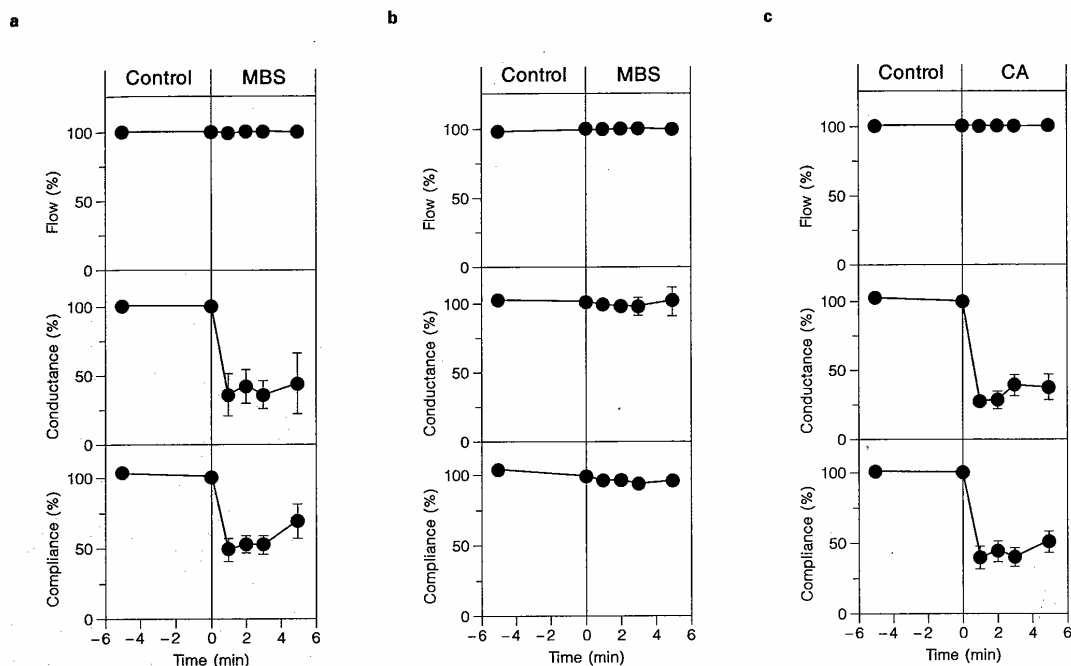
### *Experimental Protocols*

The lung preparation was allowed to stabilize for 20 min by perfusion with a Krebs-Ringer buffer without albumin, before administration of the test compounds. To avoid bronchoconstriction of the isolated lungs salbutamol (50 nM in the perfusion buffer), a  $\beta_2$ -adrenergic agonist, was used to obtain workable and stable perfused guinea pig lungs. The effect of salbutamol on the response of the isolated guinea pig lung has previously been evaluated [12].

Sulfite-treated lungs were perfused with 3 mM sodium sulfite (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>; Sigma, Italy), dissolved in the buffer, for 20 min before and during the exposure to the different compounds.

Eighty molar MBS (Sigma, Italy) was prepared just before use in 0.9% NaCl giving a final pH of  $2.9 \pm 0.1$ . In order to obtain pH 7.4 the pH of the MBS solution was corrected by the addition of NaOH 10 N. CA (Sigma, Italy) was dissolved in 0.9% NaCl to give a concentration of 0.4 M before use and the pH was  $2.0 \pm 0.1$ . Three milliliters of the solution were put in a closed airtight container with a total capacity of 10 ml at room temperature. The container was connected to a nebulizer Viasol MA2 (Viasol, Bunkeflostrand, Sweden) from which aerosol was generated and delivered to the airways via a connector to the tracheal cannula. The aerosol was administered for 30 s. During this period the pneumotachograph was disconnected. The output from the nebulizer was 0.2 ml/min with a feeding pressure of 300 kPa. The aerosol size was  $2.9\text{--}3.1 \mu\text{m}$ .

Neurokinin A fragment 4–10 [NKA (4–10)], substance P (5–11) [SP (5–11)], acetylcholine, bradykinin, histamine and serotonin were all purchased from Sigma, Italy, and administered via pulmonary artery by bolus injection.



**Fig. 1.** Effect of MBS (80 mM, pH 3.0,  $n = 7$ ; **a**), MBS (80 mM, pH 7.4,  $n = 3$ ; **b**) and CA (0.4 M, pH 2.0,  $n = 7$ ; **c**) exposure in the isolated and perfused guinea pig lung. Effects are means  $\pm$  SEM.

#### Analysis of Calcitonin Gene-Related Peptide

The overflow of calcitonin gene-related peptide (CGRP-LI) into the effluent perfusate was used as a biochemical marker for activation of capsaicin-sensitive sensory nerves. For the analysis of CGRP-LI a 3-min perfusate effluent fraction was collected through a right atrial catheter into a beaker placed on ice containing acetic acid final concentration 0.2 M. The samples were desalted using Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges. After elution 0.1 ml of 1% bovine serum albumin (fraction V) was added and the samples were evaporated at 45°C under N<sub>2</sub> gas. After evaporation the samples were redissolved in buffer and the content of CGRP-LI was determined by radioimmunoassay as previously described [2].

#### Statistical Analysis of Data

Values shown are mean  $\pm$  SEM. The significance of differences was calculated using Student's *t* test. Differences were considered significant when the 0.05 probability level was achieved.

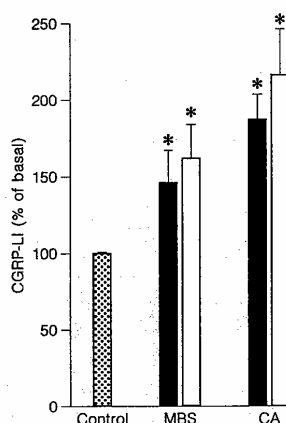
#### Results

Exposure of the isolated, perfused and ventilated guinea pig lung to freshly prepared acid solution of MBS (80 mM) resulted in a marked decrease of compliance

and conductance while no effects were observed on the perfusion flow (fig. 1a).

In order to evaluate the role of the pH during MBS-induced bronchoconstriction the MBS solution was adjusted to pH 7.4 before use. As shown in figure 1b aerosol of 80 mM MBS at neutral pH did not induce any effect on compliance, conductance or pulmonary vascular tone. Aerosol of 0.4 M CA solution was used as a stimulus for bronchoconstriction induced by an acid solution. Inhaled CA decreased the compliance and conductance of the lung (fig. 1c) with an effect similar to that produced by the acid solution of MBS. Also in the case of the CA exposure the perfusion flow was not affected (fig. 1c). The onset of the response to MBS and CA was rapid, the maximal effect was reached 1 min after the challenge and lasted until the end of the experiment.

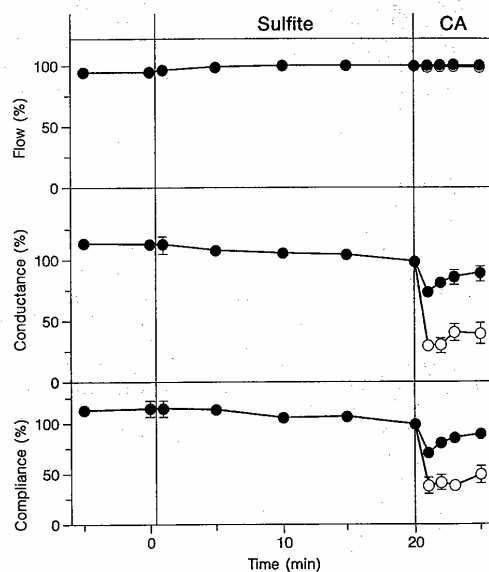
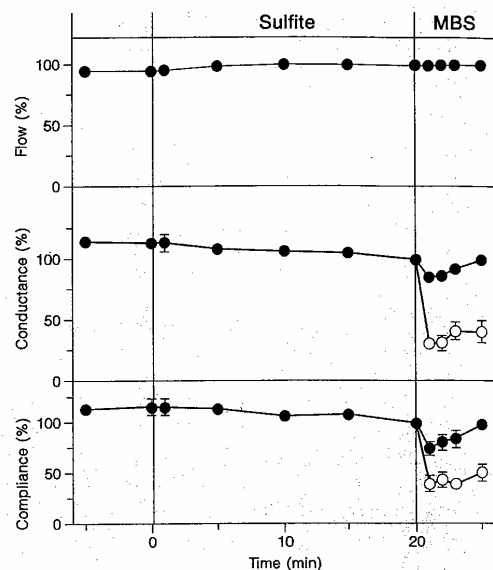
During inhalation of MBS or CA the concentration of CGRP-LI into the pulmonary effluent was statistically increased over the values obtained before exposure, indicating neuropeptide release (fig. 2).



**Fig. 2.** Effect of sodium sulfite treatment on the overflow of CGRP-LI in the buffer effluent of perfused lung during the first 3 min after aerosols with acid MBS and CA without (■) and with (□) Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> treatment. The lower detection limit is 7.2 fmol CGRP-LI. Values are expressed as percent changes with respect to control (▨). Values are means ± SEM (n = 4). \* p < 0.05.

Sodium sulfite, a reaction product of SO<sub>2</sub> or MBS, protected against SO<sub>2</sub> inhalation [2] or MBS perfusion [unpubl. observation]. Perfusion of the isolated lung with sodium sulfite (3 mM) for 20 min before and during exposure to MBS and CA aerosol significantly reduced the bronchoconstriction induced by the acid solutions (fig. 3a, b). During the first 3 min after inhalation of MBS or CA in the presence of sulfite there were no differences in the release of CGRP-LI compared to MBS and CA alone (fig. 2).

To assess whether sodium sulfite prevents the bronchoconstriction induced by MBS and CA by interfering with the action of a released autacoid, the isolated and ventilated lung was exposed to different autacoids in the presence of 3 mM sodium sulfite. As summarized in table 1 the bronchoconstriction induced by acetylcholine (4 nmol), histamine (10 nmol), bradykinin (100 pmol), serotonin (500 pmol) and the SP (5–11) (500 pmol) were not affected by the presence of sulfite. In the case of NKA (4–11) (25 pmol) a significant inhibition of the bronchoconstriction, mainly on airway conductance, was obtained by the sodium sulfite treatment (table 1).



**Fig. 3.** Effect of 3 mM sodium sulfite treatment on MBS (80 mM, pH 3.0; a) and CA (0.4 M, pH 2.0; b) aerosol in the isolated perfused and ventilated guinea pig lung. Sodium sulfite was present in the perfusate 15 min prior and during the aerosol with MBS and CA. MBS and CA without (○) and with (●) sodium sulfite. Values are means ± SEM (n = 4).

**Table 1.** Effects of sodium sulfite on different autacoids responses in isolated and perfused guinea pig lung

Agents	Natrium sulfite	n	Conductance	Compliance
Acetylcholine (4 nmol)	-	7	30 ± 2	16 ± 2
	+	5	27 ± 4	21 ± 4
Histamine (10 nmol)	-	4	64 ± 9	48 ± 9
	+	3	87 ± 7	71 ± 13
Bradykinin (100 pmol)	-	2	92 ± 3	82 ± 2
	+	4	85 ± 2	80 ± 1
Serotonin (500 pmol)	-	3	41 ± 8	24 ± 6
	+	3	48 ± 3	30 ± 1
SP (500 pmol)	-	3	57 ± 4	38 ± 3
	+	3	64 ± 6	49 ± 5
NKA (25 pmol)	-	8	43 ± 8	46 ± 8
	+	7	20 ± 6*	26 ± 5**

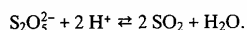
Values are percent decrease from the basal values. Plus and minus indicate presence or absence of 3 mM natrium sulfite for 20 min and during injection of the different autacoids in the perfusion buffer. The autacoids were injected into the lung via the perfusion cannula in 100-μl volume. Values are means ± SEM. \* p < 0.05; \*\* p < 0.07.

## Discussion

The results of this study confirm the reports of other investigators that inhaled acidic aerosols are a stimulus to bronchoconstriction [7, 8] and this effect appears to be pH-dependent. An equilibrium exists between the hydrolysis products of MBS:



Under acidic conditions MBS could liberate sulfur dioxide:



The relative amount of each species in the above reaction is pH-dependent. Thus, at low pH the relative amounts of  $\text{SO}_2$  and bisulfite are dominating and bronchoconstriction-induced. Bisulfite has been suggested to be capable of inducing bronchoconstriction since at pH 9, where its production is negligible, sodium sulfite does not induce bronchoconstriction [7].

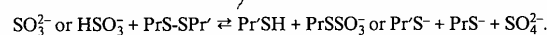
Lowering of the pH has been shown to activate capsaicin-sensitive nerves and to release CGRP-LI from tracheobronchial mucosa and also from other tissue [2, 15, 16]. Thus, a local change in pH, induced by e.g. MBS or

CA, may influence a proton-activated cation channel, which is associated with capsaicin-sensitive peripheral sensory neurons [9, 17]. This mechanism may be responsible for the action of CA and acid MBS in the present study.

Previous reports have indicated that neuropeptides released from sensory nerve endings may participate in the mechanisms of MBS- and CA-induced bronchoconstriction [1, 5]. Detection of CGRP-LI in the perfusate outflow in experimental models are considered to be an index of neuropeptide release from sensory nerve endings. In the present study the inhalation of MBS or CA aerosol was associated with an increase in the CGRP-LI levels in the perfusate at the time of bronchoconstriction. Thus, the release of tachykinins from sensory nerves is a possible mechanism by which inhaled MBS or CA causes bronchoconstriction in our experimental model. Previous studies by our group support the hypothesis that in the isolated and ventilated guinea pig lung  $\text{SO}_2$  inhalation and perfusion with MBS induce bronchoconstriction through release of tachykinins [12, 18].

Tolerance to  $\text{SO}_2$  and MBS-induced bronchoconstriction has been reported and this decreased responsiveness of airway smooth muscle does not seem to be a generalized and unspecific mechanism [11, 19]. We have previously shown that inhalation of  $\text{SO}_2$  10 ppm for 30 min before exposure to a higher concentration (250 ppm) of the gas, known to induce a pronounced reaction, almost abolished the bronchoconstriction [12]. The low concentration of  $\text{SO}_2$  (10 ppm) had no or negligible effects on lung mechanics in this model. In the present study, perfusion of the lung with sodium sulfite also reduced the bronchoconstricting effects of MBS and CA, without affecting neuropeptide release. This finding suggests an effect of sulfite on bronchial smooth muscle tone and not on tachykinin release.

Both  $\text{SO}_2$  and MBS are rapidly converted into sulfites in solution. Although it might be possible for  $\text{SO}_2$  to react directly at the lung surface, behind this point sulfites are expected to be the predominant reactive compounds. We have previously shown that during inhalation of  $\text{SO}_2$ , using the isolated perfused and ventilated lung model, sulfite appeared in the perfusate buffer [12]. Sulfites, i.e. bisulfite and sulfite, possess a number of chemical properties which allow them to interact with other sulfur-containing compounds in different ways:



Sulfites are highly reactive with proteins because they have a lone pair of electron on the sulfur, essentially act-

ing as nucleophiles toward electrophilic center [20]. This property accounts for much of their reactivity with biomolecules.

Thiol groups and disulfide bridges are important contributors to the conformation of proteins. Many protein activities are suggested to be under, at least partial, control by reversible thiol-disulfide exchange modifications [21]. For different receptors such as the NMDA receptor [22], the dopamine D1 receptor [23], the muscarinic acetylcholine receptor [24], and the thromboxane receptor [13] the redox state represents a sensitive regulatory mechanism. These reactions with the disulfide bonds of receptor proteins may cause changes in receptor activity. The tolerance effect observed with MBS and SO<sub>2</sub> may be the results of sulfite generation and subsequent modifications of receptors, involved in the control of the bronchial tone. The prevalence of SO<sub>2</sub>, bisulfite or sulfite will be responsible for the final effect and its duration on the lung.

Activation of sensory irritant receptors may occur by reduction, oxidation or alkylation of thiol groups on the receptor. It has been shown that the reducing agent dithiothreitol or the oxidizing agent dithionitrobenzoic acid diminished the positive cooperation and apparent binding affinity for resiniferatoxin and capsaicin [25]. This suggests that changes in the receptor conformation of the active site of the vanilloid (capsaicin) receptor may affect bronchial reactivity.

Activation of neurokinin receptors on smooth muscle cells has been suggested to be responsible for the contractile response to MBS and CA [1, 5, 18]. The neurokinin receptors act through a G protein to cause IP<sub>3</sub> production which in turn elevates cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> [26]. In this pathway sulfhydryl groups, sensitive to redox modifications, are present at different levels, starting from the molecular structure of the receptors themselves [26]. A reaction of

sulfite with a tachykinin receptor could explain the effects of sulfites with regard to desensitization during MBS and SO<sub>2</sub> exposure.

In our study it was of particular interest to note that treatment with sulfite significantly reduced the effect of NKA but did not affect the responses of the other bronchoconstricting compounds tested, suggesting a specificity of sulfite to manipulate the neurokinin receptor complex and not the other investigated receptors. As previously pointed out, the release of CGRP-LI during MBS exposure was not reduced with sulfite treatment excluding the possibility of sulfite affecting neuropeptide release from the vanilloid receptor in our experimental conditions.

There are many possibilities by which MBS and CA may influence the bronchial muscle tone. MBS- and CA-induced bronchoconstriction may, at least partly, be pH-dependent with activation of a proton-related cation channel, associated with the proposed vanilloid/capsaicin receptor and subsequent neurokinin release. One possible mechanism by which sulfite may modulate neurokinin-induced bronchoconstriction is by altering the redox state of neurokinin receptors of airway smooth muscles. In this respect, sodium sulfite could represent a convenient tool to study the role of sulfhydryl groups in controlling neurokinin receptor activity. The use of simpler systems such as the tracheal or bronchial rings and the use of reducing agents in testing bronchial responsiveness would help to clarify the role of redox modifications in receptor signal transduction.

## Acknowledgments

The present study has been supported by grants from the Swedish Environmental Protection Agency, the Swedish Medical Research Council and the Italian MURST (40%).

## References

- 1 Sakamoto T, Tsukagoshi H, Barnes PJ, Chung KF: Involvement of tachykinin receptors (NK1 and NK2) in sodium metabisulfite-induced airway effects. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 148:387-391.
- 2 Lou Y-P, Lundberg JM: Inhibition of low pH evoked activation of airway sensory nerves by capsazepine, a novel capsaicin-receptor antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189:537-544.
- 3 Martling C-R, Lundberg JM: Capsaicin sensitive afferents contribute to acute airway edema following tracheal instillation of hydrochloric acid or gastric juice in the rat. *Anesthesiology* 1988;68:350-356.
- 4 Atzori L, Bannenberg G, Corrigan AM, Lou Y-L, Lundberg JM, Ryrfeldt A, Moldéus P: Sulfur dioxide-induced bronchoconstriction via ruthenium red-sensitive activation of sensory nerves. *Respiration* 1992;59:272-278.
- 5 Satoh H, Lou Y-P, Lundberg JM: Inhibitory effects of capsazepine and SR 48968 on citric acid-induced bronchoconstriction in guinea-pigs. *Eur Respir J* 1993;236:367-372.
- 6 Rall DP: Review of the health effects of sulfur oxides. *Environ Health Perspect* 1974;8:97-121.
- 7 Fine JM, Gordon T, Sheppard D: The roles of pH and ionic species in sulfur dioxide- and sulfite-induced bronchoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1122-1126.

- 8 Wright W, Zhang YG, Salome CM, Woolcock AJ: Effect of inhaled preservatives on asthmatic subjects. I. Sodium metabisulfite. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:1400-1404.
- 9 Szallasi A, Blumberg PM, Lundberg JM: Proton inhibition of [<sup>3</sup>H]resiniferatoxin binding to vanilloid (capsaicin) receptors in rat spinal cord. *Eur J Pharmacol* 1995;289:181-187.
- 10 Mattoli S, Foresi A, Corbo GM, Valente S, Culla G, Ciappi G: Refractory period to ultrasonic mist of distilled water: Relationship to metacholine responsiveness, atopic status, and clinical characteristics. *Ann Allergy* 1987;58:134-140.
- 11 Pavord ID, Wisniewski A, Tattersfield AE: Refractoriness to inhaled sodium metabisulphite in subjects with mild asthma. *Eur Respir J* 1994;7:50-54.
- 12 Atzori L, Bannenberg G, Corrigan AM, Moldéus P, Ryrfeldt A: Sulfur dioxide-induced bronchoconstriction in the isolated perfused and ventilated guinea pig lung. *Respiration* 1992;59:16-21.
- 13 Atzori L, Olafsdottir K, Corrigan AM, Bannenberg G, Ryrfeldt A, Moldéus P: Thiol modifications in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thromboxane-induced vaso- and bronchoconstriction in rat perfused lung. *J Appl Physiol* 1991;71:1309-1314.
- 14 Waldeck J: En mätmetod för att undersöka läkemedels effekter på luftvägarna; thesis Lund Technical University, 1987.
- 15 Geppetti P, Tramontana M, Patacchini R, Del Bianco E, Santicoli P, Maggi CA: Neurochemical evidence for the activation of the 'efferent' function of capsaicin-sensitive nerves by lowering the pH in the guinea-pig urinary bladder. *Neurosci Lett* 1990;114:101-106.
- 16 Franco-Cereceda A, Kallner G, Lundberg JM: Capsazepine-sensitive release of calcitonin gene-related peptide from C-fibre afferents in the guinea pig heart by low pH and lactic acid. *Eur J Pharmacol* 1993;238:311-316.
- 17 Bevan S, Yeats JM: Protons activate a cation conductance in a subpopulation of rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 1991;433:145-161.
- 18 Bannenberg G, Atzori L, Xue J, Auberson S, Kimland M, Ryrfeldt A, Lundberg JM, Moldéus P: Sulfur dioxide and sodium metabisulfate induce bronchoconstriction in the isolated perfused and ventilated guinea pig lung via stimulation of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Respiration* 1994;61:130-137.
- 19 Sheppard D, Epstein J, Bethel RA, Nadel JA, Boushey HA: Tolerance to sulfur dioxide-induced bronchoconstriction in subjects with asthma. *Environ Res* 1983;30:412-419.
- 20 Petering DH, Shih NT: Biochemistry of bisulfite-sulfur dioxide. *Environ Res* 1975;9:55-65.
- 21 Cotgreave IA, Weiss M, Atzori L, Moldéus P: Glutathione and protein functions; in Vina J (ed): *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. Boca Raton, CRC Press, 1990, pp 155-175.
- 22 Aizenman E, Lipton SA, Loring RH: Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 1989;2:1257-1263.
- 23 Braestrup C, Andersen PH: Effects of heavy metal cations and other sulfhydryl reagents on brain dopamine D1 receptor: Evidence for involvement of a thiol group in the conformation of the active site. *J Neurochem* 1987;48:1667-1672.
- 24 Aronstam RS, Abood LG, Hoss W: Influence of sulfhydryl reagents and heavy metals on the functional state of muscarinic acetylcholine receptor in the brain. *Mol Pharmacol* 1978;14:575-586.
- 25 Szallasi A, Blumberg PM: [<sup>3</sup>H]resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: Species related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993;347:84-91.
- 26 Nakanishi S: Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:123-136.



6

L. Atzori, A.M. Corriga, E. Cannas, L. Congiu

## Studio dei meccanismi della tolleranza al biossido di zolfo e al metabisolfito di sodio

Dipartimento di Tossicologia - Sez. Patologia Generale, Università degli Studi di Cagliari

**RIASSUNTO.** L'inalazione di biossido di zolfo (250 ppm) ( $\text{SO}_2$ ) o di metabisolfito di sodio (80 mM) (MBS), sotto forma di aerosol, o la perfusione con metabisolfito di sodio (3 mM), inducono una riduzione della compliance e della conduttanza nel polmone isolato, perfuso e ventilato di cavia. Il trattamento del polmone con solfito di sodio (3 mM), un prodotto di dissoluzione del  $\text{SO}_2$  e del MBS, altamente reattivo con i gruppi sulfidrilici delle proteine, prima e durante l'esposizione ai suddetti composti attenua la broncocostrizione. La broncocostrizione indotta da  $\text{SO}_2$  o MBS è associata ad un aumento dei livelli di Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) nell'effluente del liquido di perfusione, indicando un'attivazione dei nervi sensoriali. Il rilascio di CGRP indotto dall' $\text{SO}_2$  e dal MBS non è influenzato dal trattamento con solfito di sodio. Il trattamento con solfito non modifica la reattività del polmone verso l'acetilcolina, la bradichinina, la serotonina, l'istamina e il frammento 5-11 della sostanza P. Un effetto inibitorio da parte del solfito di sodio si osserva sulla broncocostrizione indotta dal frammento 4-10 della neurochinina A. Poiché la broncocostrizione indotta dal  $\text{SO}_2$  e dal MBS sembra essere mediata dal rilascio e la conseguente azione della neurochinina A, il solfito potrebbe agire influenzando la trasduzione del segnale di questo neuropeptide. In conclusione, i dati indicano che durante l'esposizione ad alcuni inquinanti ambientali o occupazionali, quali  $\text{SO}_2$  e MBS, potrebbero avvenire modificazioni critiche a carico di gruppi sulfidrilici dei recettori delle cellule muscolari lisce. È possibile che queste modificazioni siano importanti nella genesi della tolleranza e dell'iperreattività bronchiale.

**Parole chiave:** biossido di zolfo, metabisolfito di sodio, broncocostrizione.

**ABSTRACT.** Study on the mechanisms of tolerance to sulphur dioxide and sodium metabisulfite.

Inhalation of sulphur dioxide (250 ppm), ( $\text{SO}_2$ ) or sodium metabisulfite (80 mM) (MBS) aerosol or perfusion with MBS (3 mM) induced a reduction in compliance and conductance in the isolated, perfused and ventilated guinea pig lung. Pretreatment of the lung with sodium sulfite (3 mM), a dissolution product of  $\text{SO}_2$  and MBS, reduced the bronchoconstriction induced by  $\text{SO}_2$  and MBS. Bronchoconstriction induced by  $\text{SO}_2$  and MBS is associated to increased levels of Calcitonin gene-Related Peptide (CGRP) in the perfusate effluent, indicating activation of sensory nerves. The release of CGRP induced by  $\text{SO}_2$  and MBS was not affected by sodium sulfite. Sulfite treatment did not modify lung reactivity towards acetylcholine, bradykinin, serotonin, histamine and substance P (fragment 5-11). An inhibitory effect by sulfite was observed on bronchoconstriction induced by neurokinin A (fragment 4-10). Since bronchoconstriction induced by  $\text{SO}_2$  and MBS appears to be mediated by neurokinin A release and action, sulfite may act by affecting its signal transduction pathway. In conclusion, the results indicate that during exposure to some environmental and occupational pollutants, e.g.  $\text{SO}_2$  and MBS, critical modifications of sulfhydryl groups on smooth muscle receptors may occur. We hypothesize this as a possible step in the development of tolerance and hyperreactivity.

**Key word:** sulphur dioxide, sodium metabisulfite, bronchoconstriction.

### Introduzione

Come è noto l'inalazione del biossido di zolfo ( $\text{SO}_2$ ) o di metabisolfito (MBS) induce una rapida broncocostrizione, la quale è particolarmente evidente nei soggetti asmatici (5, 6). Anche se il meccanismo responsabile di questo effetto non è ancora stato identificato, un ruolo importante viene attribuito ai metaboliti dell' $\text{SO}_2$  e del MBS. L' $\text{SO}_2$  e il MBS quando entrano a contatto con l'acqua sono convertiti in acido solforico, bisolfito e solfito (4). Un abbassamento del pH aumenta la produzione di bisolfito, diminuendo quella di solfito. Inoltre queste reazioni sono accompagnate dal rilascio di ioni  $\text{H}^+$ . Lo specifico contributo di questi composti all'induzione della broncocostrizione non è chiaro anche se un ruolo prevalente è attribuito al bisolfito.

La ripetuta esposizione a  $\text{SO}_2$  e al MBS determina la comparsa di tolleranza per una successiva e ravvicinata inalazione del composto, ma non per l'esposizione ad altri agenti broncocostrittori (1, 5, 6). Il meccanismo attraverso cui questo meccanismo si instaura non è conosciuto.

Scopo della presente indagine è valutare il ruolo dei metaboliti dell' $\text{SO}_2$  e del MBS nel fenomeno della tolleranza da essi indotta, con particolare riferimento al solfito, al fine di meglio comprendere i meccanismi che regolano la broncocostrizione.

### Materiali e metodi

Sono state utilizzate cavie del ceppo Dunkin-Hartley di 350-450 gr. Gli animali erano anestetizzati con pentobarbital (50 mg/Kg). I polmoni erano quindi rimossi come precedentemente descritto e sospesi in una camera toracica umidificata (1). I segnali del flusso e di volume d'aria a livello tracheale e della pressione all'interno della camera toracica erano registrati e analizzati per il calcolo della compliance e della conduttanza (1). I valori di esposizione all' $\text{SO}_2$  venivano ottenuti miscelando concentrazioni note dell' $\text{SO}_2$  e di aria. L'analisi del Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) nel liquido di perfusione era effettuata con metodica radioimmunologica (2).

## Risultati

L'inalazione di 250 ppm di  $\text{SO}_2$ , la perfusione con 3 mM MBS o l'esposizione ad aerosol di 80 mM MBS inducono una rapida broncocostrizione del polmone isolato, espressa da una diminuzione della compliance e della conduttanza (Fig. 1a, b, c). Nessun effetto è osservato a carico del flusso di perfusione. In precedenza avevamo osservato come la broncocostrizione da  $\text{SO}_2$  fosse associata alla comparsa e al successivo incremento dei livelli di solfito nel liquido di perfusione (1). Il trattamento del polmone isolato di cavia con 3 mM solfito di sodio prima e durante l'esposizione all' $\text{SO}_2$  e al MBS determina una riduzione significativa della broncocostrizione (Fig. 1a, b, c).

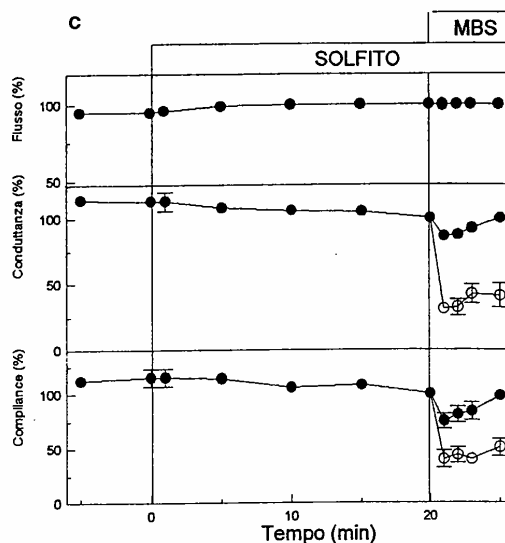
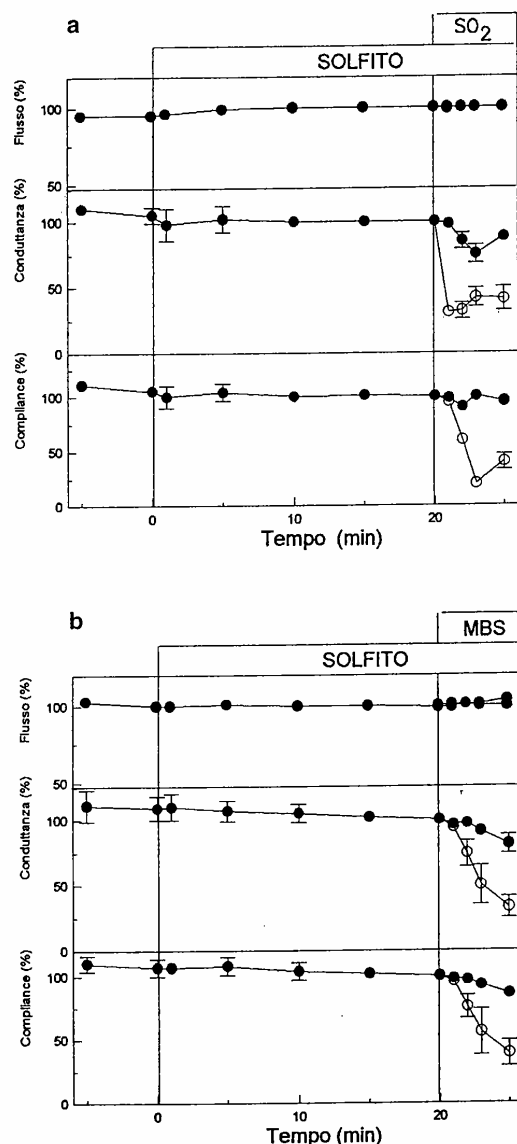


Figura 1. Effetti dell'esposizione del polmone isolato e perfuso di cavia a 250 ppm di  $\text{SO}_2$  come gas (a), a 3 mM MBS nel liquido di perfusione (b), a 80 mM MBS come aerosol (c). Questi agenti venivano dati da soli (○) o in presenza di 3 mM solfito di sodio (●). I valori sono media  $\pm$  E.S.

Evidenze sperimentali mostrano che la broncocostrizione da  $\text{SO}_2$  e MBS è mediata dall'attivazione dei nervi sensoriali presenti nelle vie respiratorie con il conseguente rilascio di neuropeptidi (2). L'aumento del contenuto di CGRP nel liquido di perfusione è considerato un indice dell'attivazione del suddetto sistema. I livelli di CGRP sono stati valutati nel liquido di perfusione del polmone isolato dopo inalazione di MBS in presenza e assenza di solfito di sodio. I dati della Tab. I mostrano come questi trattamenti non influenzano il rilascio del peptide da parte del MBS.

Al fine di valutare il meccanismo attraverso cui il solfito di sodio riduce la broncocostrizione da  $\text{SO}_2$  e MBS il polmone isolato è stato esposto a diverse sostanze autacoidi capaci di indurre broncocostrizione. Come dimostrato in Tab. II tra i vari composti studiati solo la broncocostrizione indotta dalla neurochinina A è risultata ridotta dalla presenza del solfito.

Tabella I. Effetto del solfito di sodio sul rilascio di CGRP-LI da parte del MBS nel perfusato del polmone isolato e perfuso di cavia

TRATTAMENTO	CGRP-LI (fmol/frazione)
Controllo	8.3 $\pm$ 1.2
MBS	13.8 $\pm$ 1.8*
Sodio Solfito + MBS	14.9 $\pm$ 2.0*

I valori di CGRP-LI sono stati dosati nel liquido di perfusione raccolta durante i primi 3 min. dopo l'esposizione ad aerosol di 80 mM di MBS in presenza o assenza di sodio solfito. I valori sono medie  $\pm$  E.S.

\*  $p < 0.05$ .

**Tabella II. Effetto del solfito di sodio sulla risposta a diversi autacoidi nel polmone isolato e perfuso di cavia**

AUTACOIDE		n	CONDUTTANZA	COMPLIANCE
AcColina	(-)	7	30 ± 2	16 ± 2
4 nmoli	(+)	5	27 ± 4	21 ± 4
Istamina	(-)	4	64 ± 9	48 ± 9
10 nmoli	(+)	3	87 ± 7	71 ± 13
Bradichin.	(-)	2	92 ± 3	82 ± 2
0.1 nmoli	(+)	4	85 ± 2	80 ± 1
Serotonina	(-)	3	41 ± 8	24 ± 6
0.5 nmoli	(+)	3	48 ± 3	30 ± 1
Sostanza P	(-)	3	57 ± 4	38 ± 3
0.5 nmoles	(+)	3	64 ± 6	49 ± 5
Neurochinina A	(-)	8	43 ± 8	46 ± 8
25 pmoles	(+)	7	20 ± 6*	26 ± 5**

I valori indicano diminuzioni in per cento rispetto ai valori di base. (-) e (+) indicano l'assenza o la presenza di 3 mM solfito di sodio per 20 min e durante l'iniezione dei diversi autacoidi nell'arteria polmonare in un volume di 100 µl. n indica il numero di preparazioni. I valori sono medie ± E.S.

\* p < 0.05; \*\* p < 0.07.

## Discussione

Nella presente indagine abbiamo mostrato come il pretrattamento del polmone isolato con il solfito di sodio riduce la broncocostrizione indotta da SO<sub>2</sub> e MBS. Il solfito, un metabolita dei due composti studiati, è altamente reattivo e può legarsi alle proteine di membrana delle vie respiratorie. Gli ioni solfito possono, in particolare, interagire con i ponti disolfuro, i quali svolgono un ruolo critico in numerose funzioni cellulari (3).

La produzione del solfito potrebbe essere alla base della tolleranza osservata dopo ripetute esposizioni a SO<sub>2</sub> o MBS. Per quanto riguarda la broncocostrizione indotta dall'SO<sub>2</sub> e dal MBS recenti dati indicano che è mediata da un meccanismo prevalentemente dipendente dal rilascio di neuropeptidi dai nervi sensoriali (2). Pertanto è possibile che l'aumentata tolleranza a ravvicinate esposizioni di SO<sub>2</sub> o MBS sia mediata da qualche meccanismo a carico della trasdu-

zione del segnale dei neuropeptidi. In tal caso la tolleranza all'SO<sub>2</sub> o al MBS e l'azione del solfito potrebbero risultare dalla riduzione del rilascio di neuropeptidi o dalla diminuita risposta della muscolatura liscia delle vie respiratorie ai neuropeptidi liberati. Il pretrattamento con solfito pur riducendo la broncocostrizione da SO<sub>2</sub> e da MBS non modifica i livelli della CGRP, indicando che l'azione del solfito non è a livello di rilascio dei neuropeptidi. Una perdita della reattività bronchiale aspecifica non è probabile perché il fenomeno della tolleranza nel corso dell'esposizione a SO<sub>2</sub> o MBS è specifico per questi agenti (5, 6). Inoltre, il solfito inibisce l'effetto delle sostanze autacoidi da noi studiate in maniera specifica. Poiché l'azione dell'SO<sub>2</sub> e del MBS sembra essere mediata dal rilascio di neurochinina A, i nostri dati indicano che l'azione del solfito dovrebbe esercitarsi a carico del recettore per la neurochinina A, il quale ha dei gruppi sulfidrilici nella sua molecola.

In conclusione, nel corso dell'esposizione ad inquinanti ambientali e occupazionali possono avvenire modificazioni dei gruppi sulfidrilici situati sui recettori della muscolatura liscia, capaci di alterare la loro funzione. Inoltre sia il fenomeno della tolleranza che quello della iperreattività nei confronti di certi stimoli potrebbero essere dovuti a modificazioni dei gruppi sulfidrilici dei recettori, critici nel controllo della trasduzione del segnale.

## Bibliografia

- 1) Atzori L, Bannenberg G, Corrigan AM, Moldèus P, Ryrfeldt A. Sulfur dioxide-induced bronchoconstriction in the isolated perfused and ventilated guinea pig lung. *Respiration* 1992; 59: 16-21.
- 2) Atzori L, Bannenberg G, Corrigan AM, Lou YP, Lundberg JM, Ryrfeldt A, Moldèus P. Sulfur dioxide-induced bronchoconstriction via ruthenium red-sensitive activation of sensory nerves. *Respiration* 1992; 59: 272-278.
- 3) Cotgreave IA, Weiss M, Atzori L, Moldèus P. Glutathione and protein functions. In: *Glutathione: Metabolism and physiological functions*, Ed. Viña J, CRC Press, Boca Raton 1990; p. 155-175.
- 4) Fine JM, Gordon T, Sheppard D. The roles of pH and ionic species in sulfur dioxide - and sulfite-induced bronchoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 1122-1126.
- 5) Pavord ID, Wisniewski A, Tattersfield AE. Refractoriness to inhaled sodium metabisulfite in subjects with mild asthma. *Eur Respir J* 1994; 7: 50-54.
- 6) Sheppard D, Epstein J, Bethel RA, Nadel JA, Boushey HA. Tolerance to sulfur dioxide - induced bronchoconstriction in subjects with asthma. *Environ Res* 1983; 30: 412-419.

## Partecipazione delle tachichinine in modelli sperimentali di danno polmonare

7

Luigi Atzori, Anna Maria Corrigan e Luigi Congiu

Atzori L, Corrigan AM, Congiu L. Partecipazione delle tachichinine in modelli sperimentali di danno polmonare. *G Ital Med Lav* 1995; 17: 65 - 70. Nella presente indagine è stato studiato il possibile coinvolgimento delle tachichinine nella broncocostrizione da biossido di zolfo ( $\text{SO}_2$ ) e metabisolfito (MBS) e nella mortalità da PQ. L'inalazione di  $\text{SO}_2$  (250 ppm) o la perfusione con MBS (3mM) induce una marcata diminuzione della compliance e della conduttanza nel polmone isolato e perfuso. Questo effetto è associato con il rilascio di Calcitonin Gene Related Peptide, suggerendo l'attivazione dei nervi sensoriali sensibili alla capsaicina. Il pretrattamento degli animali con capsaicina, al fine di depletare il contenuto di tachichinine dei nervi sensoriali, riduce significativamente la broncocostrizione da  $\text{SO}_2$  e MBS. Il trattamento con PQ (25mg/Kg) induce una mortalità del 75% dopo tre settimane. Il pretrattamento con capsaicina protegge significativamente verso la mortalità da PQ, che raggiunge solo il 25%.

Pertanto, i risultati suggeriscono che le tachichinine contenute nei nervi sensoriali del tratto respiratorio siano coinvolte nella broncocostrizione da  $\text{SO}_2$  o MBS e nella mortalità da PQ.

### INTRODUZIONE

L'inalazione o il contatto con diversi agenti presenti nell'atmosfera o nell'ambiente di lavoro sono responsabili di numerosi quadri di patologia respiratoria acuta e cronica (1,2,3). In alcuni casi il danno è determinato dall'attivazione di meccanismi preposti al controllo del tono bronchiale e vasale tramite un abnorme produzione o rilascio di sostanze autacoidi (p.e. istamina, bradichinina, derivati dell'acido arachidonico), in altri casi da modificazioni della normale omeostasi cellulare tramite modificazioni dello stato redox della cellula, deplezione dei gruppi sulfidrilici proteici e non, aumento della lipoperossidazione, modificazioni del calcio intracellulare.

Il danno acuto del polmone può presentarsi con modificazioni della funzionalità respiratoria a causa di bronco e vascocostrizione e con un marcato quadro infiammatorio a livello della parete alveolare (4). Le modificazioni della funzionalità respiratoria possono regredire senza esiti, mentre al quadro infiammatorio spesso si associa una distruzione

del tessuto alveolare accompagnata da un'estesa fibroproliferazione dello spazio alveolare (4). Se il processo non è di gravità eccessiva si ha una fase riparativa caratterizzata da un processo di granulazione con successiva rigenerazione dell'epitelio alveolare ed eliminazione dei fibroblasti. In alcuni casi, a seconda dell'insulto tossico il processo di riparazione evolve in quadri di fibrosi interstiziale e intraalveolare senza restitutio ad integrum dell'organo (4).

Nel valutare i meccanismi della fibrosi, conseguente al danno polmonare, la maggior parte degli studi sono orientati sul ruolo delle citochine rilasciate dalle cellule infiammatorie, in particolare dai macrofagi. Queste cellule, infatti, rilasciano molecole capaci di indurre la crescita di fibroblasti e la produzione di collagene (4).

Recenti studi indicano un ruolo sempre maggiore dei neuropeptidi liberati dai neuroni sensoriali del tratto respiratorio, che possono agire come regolatori di attività cellulari. Essi, infatti, svolgono effetti sul tono bronchiale, sulla produzione di muco, sulla pressione del circolo polmonare, sulle cellule infiammatorie e immunitarie (5).

È stato dimostrato che i nervi sensoriali svolgono un ruolo importante nella risposta infiammatoria, in questo caso chiamata «infiammazione neurogena». Il rilascio di neuropeptidi dalle terminazioni dei nervi nocicettivi o fibre C induce i sintomi classici dell'infiammazione quali: dolore, calore, rossore e gonfiore. Questo fenomeno è ben descritto nel tratto gastrointestinale, nella vescica, nella pelle e negli occhi. Recenti dati indicano che l'infiammazione neurogena avviene anche nel tratto respiratorio e potrebbe contribuire alla risposta infiammatoria presente nell'asma (5).

Nell'apparato respiratorio dei mammiferi esistono recettori sensibili alla capsaicina, l'estratto piccante del peperoncino rosso. L'esposizione dei nervi sensoriali a basse dosi di capsaicina provoca il rilascio di neuropeptidi tra cui la sostanza P (SP), la neurochinina A (NKA) e la Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) (6). Il trattamento con alte dosi di capsaicina distrugge e depleta i nervi sensoriali del loro contenuto di neuropeptidi (6).

La SP e la NKA appartengono ad una comune famiglia di neuropeptidi chiamati tachichinine, aventi una comune terminazione aminoacidica.

Luigi Atzori, Anna Maria Corrigan e Luigi Congiu: Dipartimento Tossicologia-Sez. Patologia Generale, Università degli Studi, Via Porcell 4, 09100 Cagliari, Italia.

Nelle vie respiratorie le fibre contenenti le tachichinine sono a stretto contatto con l'epitelio bronchiale, le fibrocellule muscolari lisce e i vasi. Questi neuropeptidi possono essere rilasciati localmente e producono i loro effetti attraverso l'attivazione di recettori specifici (7). La NKA è un potente broncocostrittore e potenzia la neurotrasmissione colinergica. La SP è un vasodilatatore, causa aumento della permeabilità capillare, secrezione mucosa ed edema bronchiale.

Nella presente indagine abbiamo verificato un possibile coinvolgimento delle tachichinine nel corso delle modificazioni acute della funzione respiratoria indotte dal biossido di zolfo ( $\text{SO}_2$ ) e dal metabisolfito (MBS), e nella genesi della fibrosi polmonare da paraquat (PQ).

Come è noto l' $\text{SO}_2$  è uno dei maggiori inquinanti ambientali. Infatti, esiste una stretta correlazione tra l'incidenza di alterazioni respiratorie e livelli di  $\text{SO}_2$  nell'atmosfera (8). Uno dei principali sintomi conseguenti all'esposizione a questo gas è la broncocostrizione, specialmente in pazienti asmatici (9,10). L'inalazione di MBS causa irritazione polmonare e broncocostrizione sia nell'uomo che in diversi animali di laboratorio. Il meccanismo di broncocostrizione da MBS sembra essere simile a quello da  $\text{SO}_2$  (11,12). L'effetto prodotto da tali sostanze sembra correlato all'abbassamento del pH, da esse indotto a livello della mucosa respiratoria, e ai metaboliti che si formano, cioè bisolfito e solfito.

Il paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridiliodicloruro) è un erbicida usato in agricoltura in diversi paesi, compresa l'Italia. L'intossicazione da PQ può essere accidentale, ma ancor più a scopo suicida. A prescindere dalla via di introduzione il PQ si accumula elettivamente e rapidamente nei polmoni (13). L'introduzione di elevate quantità di PQ provoca la rapida comparsa di edema polmonare, necrosi ed emorragie con conseguente insufficienza respiratoria e morte. Dosi inferiori di PQ determinano la comparsa di una insufficienza respiratoria acuta meno marcata ma che può evolvere in fibrosi polmonare di diversa intensità (13).

Il PQ nel polmone è ridotto enzimaticamente in una forma radicalica e riossidato con formazione di specie reattive dell'ossigeno quali anione superossido, perossido d'idrogeno e radicale idrossilico (13). È stato prospettato che il danno polmonare da PQ sia conseguente a fenomeni lipoperossidativi innescati dai radicali dell'ossigeno. L'ipotesi per quanto attraente non è stata tuttavia confermata. Anche la continua ossidazione di NADPH nel corso del metabolismo del PQ potrebbe creare perturbazioni biochimiche della cellula e produrre danno e morte cellulare (14).

La lesione che si sviluppa nel polmone dopo intossicazione da PQ ha due fasi distinte. La prima (fase distruttiva) avviene durante i primi giorni dall'intossicazione e si presenta con la distruzione delle cellule epiteliali, conseguente alveolite, forma-

zione di edema e infiltrato di cellule infiammatorie. La seconda (fase riparativa) è caratterizzata da una estesa fibrosi interstiziale.

### Materiali e metodi

Sodio metabisolfito e paraquat sono stati forniti dalla Sigma (Milano, Italia). La capsaicina era prodotta dalla Fluka Chemie AG (Buchs, Svizzera). Il biossido di zolfo (500 ppm in aria) era ottenuto da AGA AB (Lidingo, Svezia).

Gli esperimenti con il polmone isolato e perfuso sono stati effettuati su cavie del ceppo Dunkin-Hartley del peso di 250-400 gr., quelli sulla tossicità del PQ con ratti di ceppo Sprague-Dawley del peso di 250-350 gr.

### Polmone isolato e perfuso

Gli animali erano anestetizzati con pentorbarbital (60 mg/Kg) (Mebumal Vet, NordVacc, Svezia). Il polmone veniva isolato chirurgicamente come descritto precedentemente e successivamente posto in una camera toracica artificiale (15). I valori della pressione, all'interno della camera toracica e del flusso dell'aria, all'interno della trachea, venivano misurati tramite trasduttori di pressione (174pc e 164pc Honeywell, U.S.A.). I segnali trasformati e amplificati da un sistema Coulbourn Lablinic (Coulbourn Instruments, Lehigh Valley, U.S.A.) venivano inviati ad un computer per il calcolo della compliance dinamica e della conduttanza (16). Il flusso di perfusione era misurato manualmente.

Venivano usati solo polmoni con valori stabili di perfusione, compliance e conduttanza.

L' $\text{SO}_2$  proveniente da una bombola alla concentrazione di 500 ppm era diluito con aria all'interno di una camera di miscelazione per ottenere la concentrazione finale di 250 ppm. Tutti i flussi erano continuamente controllati con flussometri (Brooks Instruments BV, Veenendaal, Olanda). Il MBS era disciolto nel liquido di perfusione immediatamente prima dell'uso alla concentrazione di 3mM e il pH aggiustato a 7.4.

Il ruolo dei nervi sensoriali sensibili alla capsaicina era studiato con due approcci: 1) dosaggio del rilascio della CGRP, 2) trattamento sistemico con capsaicina al fine di depletare la popolazione di nervi sensoriali del loro contenuto in tachichinine. Per l'analisi del CGRP venivano raccolte frazioni del perfusato. Il neuropeptide era quindi estratto e dosato con metodo radioimmunologico (6). Per depletare gli animali dei neuropeptidi sensoriali si eseguiva il seguente protocollo. La capsaicina era disciolta alla concentrazione di 50 mg/ml in 10% alcool etilico, 10% Tween 80 e 80% soluzione salina. Gli animali erano anestetizzati con pentobarbital (60 mg/Kg i.p.) e pretrattati con salbutamolo

(0.5 mg/Kg s.c.) e aminofillina (25 mg/Kg i.p.). La capsaicina veniva iniettata sottocute alla dose di 50 mg/Kg, quindi gli animali venivano lasciati nelle loro gabbie avendo libero accesso all'acqua e al cibo sino al momento dell'esperimento. Nel caso degli esperimenti con il PQ, dopo una settimana dal trattamento con la capsaicina gli animali ricevevano 25 mg/Kg i.p. del composto.

Dopo aver anestetizzato gli animali con pentobarbital veniva aperta la gabbia toracica e il polmone era perfuso con Krebs-Ringer buffer pH 7.4, attraverso l'arteria polmonare, al fine di rimuovere il sangue dal letto vasale polmonare. Un frammento di polmone veniva posto in stufa a 130°C. per una settimana e quindi nuovamente pesato per determinare il rapporto peso umido/secco e valutare quindi l'accumulo di acqua. Il restante polmone veniva subito congelato a -20° C per la successiva determinazione del glutatone secondo il metodo di Ellman (17).

#### Analisi statistica

I valori riferiti sono medie  $\pm$  ES. La significatività delle differenze è stata calcolata usando il test di Student. Le differenze erano considerate significative quando il livello di probabilità era  $\leq 0.05$ .

#### Risultati

L'esposizione del polmone isolato e perfuso a 250 ppm di SO<sub>2</sub> determina una marcata riduzione della compliance e della conduttanza (Fig. 1). Nessun effetto è stato osservato a carico del flusso del perfusato. La perfusione del polmone isolato con MBS (3 mM) induce un quadro simile a quello prodotto dall'inalazione di SO<sub>2</sub> (Fig. 2).

Per studiare se la broncocostrizione da SO<sub>2</sub> e MBS fosse prodotta dall'attivazione dei nervi sensoriali sensibili alla capsaicina, gli animali erano pretrattati con dosi neurotossiche di capsaicina. Nelle figg. 1 e 2 si osserva che i polmoni delle cavia pretrattate con capsaicina rispondono significativamente meno all'inalazione di SO<sub>2</sub> o alla perfusione con MBS. Il contenuto di CGRP è stato usato come indice di attivazione dei nervi sensoriali. Durante l'esposizione a SO<sub>2</sub> i livelli di CGRP sono significativamente aumentati rispetto ai valori basali (fig. 3). Negli animali pretrattati con capsaicina, l'inalazione di SO<sub>2</sub> non determina alcun incremento dei livelli di CGRP (fig. 3).

La perfusione del polmone isolato con PQ in condizioni di normo- e iperossia non ha determinato significative variazioni delle compliance, della conduttanza e del flusso di perfusione sino a 2 ore dall'inizio del trattamento (dati non pubblicati). Pertanto, abbiamo ritenuto il modello del polmone isolato e perfuso non idoneo per studiare i mecca-

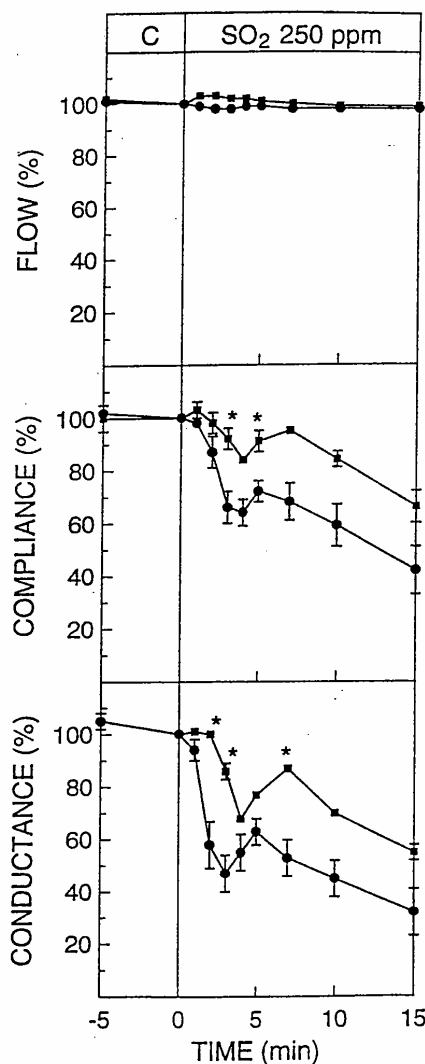


Fig. 1 - Effetto dell'esposizione a 250 ppm di SO<sub>2</sub> nel polmone isolato e perfuso in cavia di controllo (●; n = 10) e pretrattate con capsaicina (■; n = 4). I valori sono media  $\pm$  ES. \*  $p < 0.05$

nismi del danno da PQ, che in genere si sviluppa nel corso di alcuni giorni.

Per studiare il ruolo delle tachichinine nel danno da PQ, un gruppo di animali è stato trattato con la capsaicina in vivo. L'inoculazione di PQ in animali normali o pretrattati con capsaicina non mostra differenze significative di mortalità durante le prime 48 ore (fig. 4). In seguito negli animali trattati solo con PQ la letalità aumenta sino ad arrivare al 75% dopo 3 settimane (fig. 4), mentre gli animali pretrattati con capsaicina mostrano valori di mortalità non superiori al 25% (fig. 4).

(0.5 mg/Kg s.c.) e aminofillina (25 mg/Kg i.p.). La capsaicina veniva iniettata sottocute alla dose di 50 mg/Kg, quindi gli animali venivano lasciati nelle loro gabbie avendo libero accesso all'acqua e al cibo sino al momento dell'esperimento. Nel caso degli esperimenti con il PQ, dopo una settimana dal trattamento con la capsaicina gli animali ricevevano 25 mg/Kg i.p. del composto.

Dopo aver anestetizzato gli animali con pentobarbital veniva aperta la gabbia toracica e il polmone era perfuso con Krebs-Ringer buffer pH 7.4, attraverso l'arteria polmonare, al fine di rimuovere il sangue dal letto vasale polmonare. Un frammento di polmone veniva posto in stufa a 130°C. per una settimana e quindi nuovamente pesato per determinare il rapporto peso umido/secco e valutare quindi l'accumulo di acqua. Il restante polmone veniva subito congelato a -20° C per la successiva determinazione del glutathione secondo il metodo di Ellman (17).

#### Analisi statistica

I valori riferiti sono medie  $\pm$  ES. La significatività delle differenze è stata calcolata usando il test di Student. Le differenze erano considerate significative quando il livello di probabilità era  $\leq 0.05$ .

#### Risultati

L'esposizione del polmone isolato e perfuso a 250 ppm di SO<sub>2</sub> determina una marcata riduzione della compliance e della conduttanza (Fig. 1). Nessun effetto è stato osservato a carico del flusso del perfusato. La perfusione del polmone isolato con MBS (3 mM) induce un quadro simile a quello prodotto dall'inalazione di SO<sub>2</sub> (Fig. 2).

Per studiare se la broncocostrizione da SO<sub>2</sub> e MBS fosse prodotta dall'attivazione dei nervi sensoriali sensibili alla capsaicina, gli animali erano pretrattati con dosi neurotossiche di capsaicina. Nelle figg. 1 e 2 si osserva che i polmoni delle cavie pretrattate con capsaicina rispondono significativamente meno all'inalazione di SO<sub>2</sub> o alla perfusione con MBS. Il contenuto di CGRP è stato usato come indice di attivazione dei nervi sensoriali. Durante l'esposizione a SO<sub>2</sub> i livelli di CGRP sono significativamente aumentati rispetto ai valori basali (fig. 3). Negli animali pretrattati con capsaicina, l'inalazione di SO<sub>2</sub> non determina alcun incremento dei livelli di CGRP (fig. 3).

La perfusione del polmone isolato con PQ in condizioni di normo- e iperossia non ha determinato significative variazioni delle compliance, della conduttanza e del flusso di perfusione sino a 2 ore dall'inizio del trattamento (dati non pubblicati). Pertanto, abbiamo ritenuto il modello del polmone isolato e perfuso non idoneo per studiare i mecca-

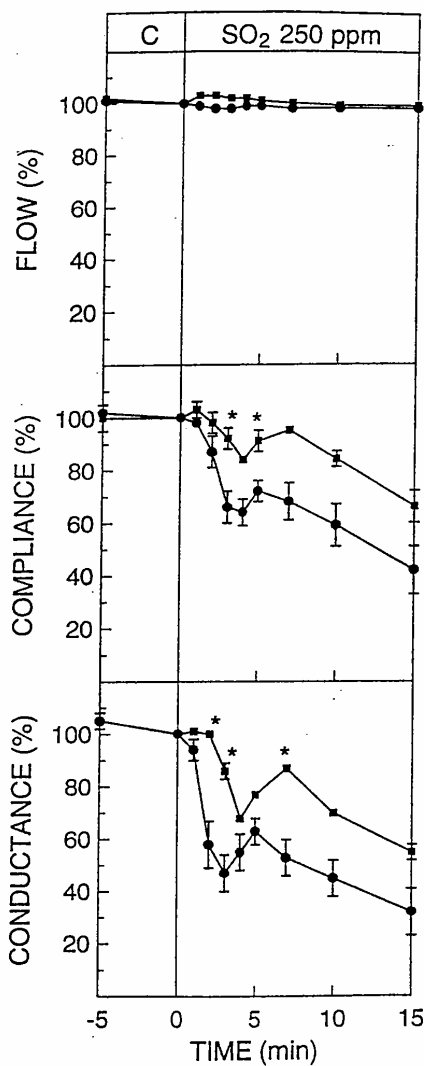


Fig.1 - Effetto dell'esposizione a 250 ppm di SO<sub>2</sub> nel polmone isolato e perfuso in cavia di controllo (●; n = 10) e pretrattati con capsaicina (■; n = 4). I valori sono media  $\pm$  ES. \*  $p \leq 0.05$

nismi del danno da PQ, che in genere si sviluppa nel corso di alcuni giorni.

Per studiare il ruolo delle tachichinine nel danno da PQ, un gruppo di animali è stato trattato con la capsaicina in vivo. L'inoculazione di PQ in animali normali o pretrattati con capsaicina non mostra differenze significative di mortalità durante le prime 48 ore (fig. 4). In seguito negli animali trattati solo con PQ la letalità aumenta sino ad arrivare al 75% dopo 3 settimane (fig. 4), mentre gli animali pretrattati con capsaicina mostrano valori di mortalità non superiori al 25% (fig. 4).

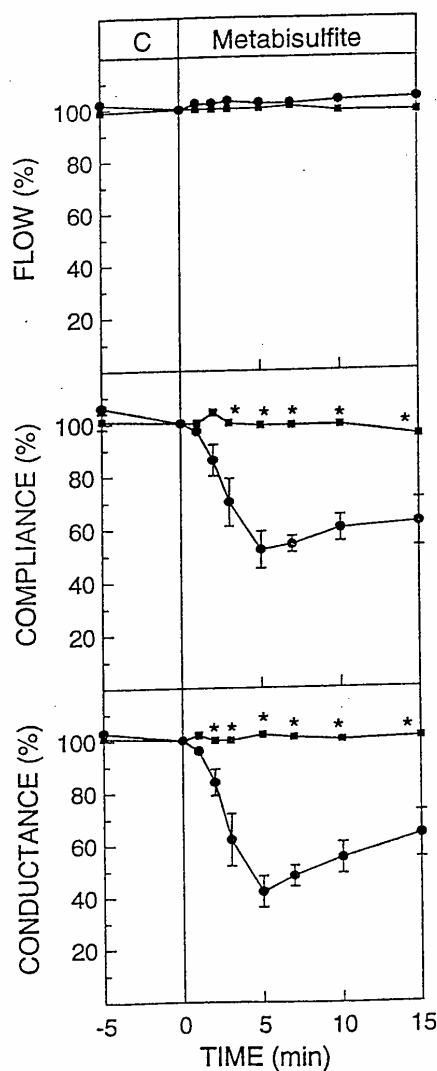


Fig. 2 - Effetto dell'esposizione a 3 mM di MBS nel polmone isolato e perfuso in cavia di controllo (●; n=10) e pretrattati con capsicina (■; n=4). I valori sono media  $\pm$  ES. \*  $p \leq 0.05$

Poiché il contenuto di glutazione sembra svolgere un ruolo importante nel danno acuto da PQ i livelli di questo tripeptide sono stati valutati negli animali sopravvissuti al trattamento con PQ. Nella tab. I è mostrato come i livelli di glutazione non siano significativamente diversi rispetto ai controlli nei ratti trattati solo con PQ o capsicina più PQ.

#### Discussione

Il presente studio ci consente di prospettare un coinvolgimento dei nervi sensoriali sensibili alla

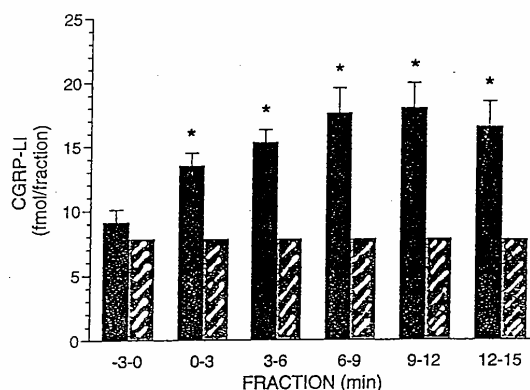


Fig. 3 - Effetto dell'esposizione a 250 ppm  $\text{SO}_2$  sul contenuto di CGRP nell'effluente del liquido di perfusione in polmoni di controllo (colonne piene; n=8) e pretrattati con capsicina (colonne a striscie; n=3). Frazioni raccolte ogni 3 min prima e durante l'esposizione a 250 ppm  $\text{SO}_2$ . Le barre indicano medie  $\pm$  ES (n=5). \*  $< 0.05$ ; \*\*  $< 0.002$ .

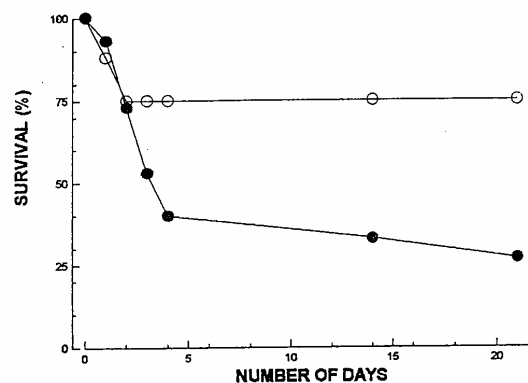


Fig. 4 - Variazioni della vitalità dopo esposizione a PQ (25mg/Kg) in ratti di controllo (●; n=15) e pretrattati con capsicina (○; n=8).

TAB. I - Contenuto di glutazione polmonare in ratti intossicati con PQ.

Trattamento	(n)	GSH ( $\mu\text{g/gr}$ tessuto)
Controllo	(3)	$33.65 \pm 3.85$
Capsicina	(1)	37.75
Paraquat	(3)	$36.45 \pm 1.3$
Capsicina + Paraquat	(5)	$33.65 \pm 2.7$

I dati sono stati ottenuti 21 giorni dopo il trattamento con PQ (25mg/Kg): Tra parentesi è indicato il numero di animali. I valori sono medie  $\pm$  ES.



capsaicina sugli effetti dell'SO<sub>2</sub>, del MBS e del PQ. Tale conclusione può essere dedotta dall'osservazione che la deplezione del contenuto di tachichinine indotta dalla capsaicina previene la broncocostrizione da SO<sub>2</sub> e MBS, e riduce la mortalità da PQ.

A supporto di un ruolo delle tachichinine nel danno conseguente all'esposizione a SO<sub>2</sub> vi è l'aumentato contenuto di CGRP che accompagna la broncocostrizione. Questo peptide è localizzato insieme alla SP ed alla NKA nei nervi sensoriali e il suo aumento indica un'attivazione dei nervi sensoriali stessi. Precedentemente è stato dimostrato che il rosso rutenio, un inibitore della trasduzione del segnale attivato dalla capsaicina, è capace di attenuare la broncocostrizione da SO<sub>2</sub> (18). Un ruolo delle tachichinine nella broncocostrizione conseguente all'inalazione di MBS è stato suggerito anche da altri autori (19).

La presenza di una quota di broncocostrizione da SO<sub>2</sub>, che non è inibita dal trattamento con capsaicina, suggerisce il coinvolgimento di altri mediatori. Nel caso del MBS la broncocostrizione sembra essere dovuta interamente all'attivazione dei nervi sensoriali e al rilascio di tachichinine in quanto il pretrattamento con capsaicina elimina completamente l'effetto del MBS.

La relazione tra intossicazione da PQ e comparsa di fibrosi polmonare è ben documentata, ma il meccanismo e la sequenza degli eventi che determinano la fibrosi polmonare non è ancora stabilito. Il PQ può indurre danno cellulare direttamente tramite la sua radicalizzazione e la produzione di specie reattive dell'ossigeno.

Poiché nei primi giorni dopo l'esposizione al PQ non vi sono differenze di mortalità tra il gruppo di animali trattati solo con PQ e quelli pretrattati con capsaicina si può dedurre che le tachichinine non hanno un ruolo rilevante nella fase acuta del danno. In questo periodo probabilmente i processi lipoperossidativi, le modificazioni dell'equilibrio redox, hanno un ruolo prevalente. Dopo tre settimane però gli animali depletati del loro contenuto di tachichinine mostrano una maggior sopravvivenza, suggerendo un ruolo di questi neuropeptidi nella mortalità da PQ. Infatti il trattamento con N-acetilcisteina e antiossidanti riduce l'infiltrato infiammatorio e la mortalità a breve termine (13,20), ma non modificano quella a lungo termine. Inoltre, poiché tre settimane dopo il trattamento con PQ il contenuto di glutazione non mostra differenze rispetto ai controlli, una partecipazione di questo tripeptide non è ipotizzabile nel danno cronico.

In seguito all'intossicazione da PQ nei primi giorni si ha una fase distruttiva a carico degli alveoli, a cui segue una fase proliferativa (13). Nel corso della fase riparativa la perdita dell'epitelio adiacente il tessuto mesenchimale è seguita dalla crescita di fibroblasti e dalla formazione di collagene (13, 14). Questo indica che il normale epitelio limiterebbe la crescita dei fibroblasti. Le specie reattive rilasciate

dal PQ durante il suo metabolismo e il processo infiammatorio da esso scatenato possono essere uno stimolo alla proliferazione dei fibroblasti e alla conseguente fibrosi.

Il danno dell'epitelio delle vie respiratorie espone le terminazioni dei nervi sensoriali che possono così essere stimulate da mediatori dell'infiammazione, tra cui le specie reattive dell'ossigeno. L'azione della capsaicina sui nervi sensoriali è modulata dalle specie reattive dell'ossigeno, in particolare dal radicale idrossilico (21).

La SP e la NKA stimolano la crescita in cultura di cellule muscolari lisce e di fibroblasti (22). Tuttavia il meccanismo con cui queste tachichinine stimolano la sintesi del DNA non è stato determinato. Il rilascio di questi neuropeptidi durante il processo infiammatorio potrebbe pertanto contribuire a stimolare la proliferazione del tessuto connettivo e indurre la risposta riparativa.

È evidente che una migliore comprensione dei meccanismi preposti al controllo della fibroproliferazione potrebbe fornire indicazioni terapeutiche per varie patologie per le quali al momento l'approccio farmacologico è scarso o nullo.

Atzori L, Corriga AM, Congiu L. Involvement of tachykinins in experimental lung damage. *G Ital Med Lav* 1995; 17: 65 - 70. In the present investigation a possible involvement of tachykinins during sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) and metabisulfite (MBS) induced bronchoconstriction, and paraquat (PQ) -induced mortality was studied. SO<sub>2</sub> (250ppm) inhalation and MBS (3mM) perfusion induced a marked decrease of compliance and conductance in the isolated and perfused lung. SO<sub>2</sub>-induced bronchoconstriction was associated with release of Calcitonin Gene Related Peptide, suggesting activation of capsaicin sensitive sensory nerves. Pretreatment of animals with capsaicin, in order to deplete the tachinin content of sensory nerves, significantly reduced SO<sub>2</sub>- and MBS-induced bronchoconstriction. PQ (25mg/Kg) treatment induced high mortality (75%) after 3 weeks. Pretreatment with capsaicin significantly protected versus PQ induced mortality (25%).

The results suggest that tachykinin content in the respiratory airways participate to SO<sub>2</sub>- and MBS-induced bronchoconstriction and PQ mortality.

## BIBLIOGRAFIA

1. Crapo J, Miller FJ, Mossman, Pryor WA, Kiley JP. Environmental lung diseases. Relationship between acute inflammatory responses to air pollutants and chronic lung diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 145: 1506-1512.
2. Samet JM, Utell MJ. The environment and the lung. *JAMA* 1991; 266: 670-675.
3. Bernstein DI. Occupational asthma. *Med Clin North Amer* 1992; 76: 9179-934.
4. Crystal RG, Ferrans VJ, Basset F. In: Crystal RG, Best JB et al. (ed) *Biologic Basis of pulmonary fibrosis*. The Lung, New York, Raven Press, 1991; 2031-2046.
5. Barnes PJ. Neurogenic inflammation in airways and its modulation: *Arch Int Pharmacodyn* 1990; 303: 67-82.

6. Lou Y-P. Regulation of neuropeptide release from pulmonary capsaicin-sensitive afferents in relation to bronchoconstriction. *Acta Physiol Scand* 1993; 149 (S612): 1-88.
7. Maggi CA. Tachykinin receptors and airway pathophysiology. *Eur Respir J* 1993; 6: 735-742.
8. Rall DP. Review of the health effects of sulfur oxides. *Environ Health Perspect* 1974; 8: 97-121.
9. Frank WR, Amdur MO, Worcester J, Whittenberger JL. Effects of acute controlled exposure to SO<sub>2</sub> on respiratory mechanisms in healthy male adults. *J Appl Physiol* 1962; 17: 252-258.
10. Snashall PD, Baldwin C. Mechanisms of sulfur dioxide induced bronchoconstriction in normal and asthmatic man. *Thorax* 1982; 37: 118-123.
11. Lotvall JO, Skoogh B, Lemen RJ, Elwood W, Barnes PJ, Chung KF. Bronchoconstriction induced by inhaled sodium metabisulfite in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1390-1395.
12. Seale JP, Temple DM, Tennant CM. Bronchoconstriction by nebulized metabisulfite solutions (SO<sub>2</sub>) and its modifications by ipratropium bromide. *Ann Allergy* 1988; 61: 209-213.
13. Bus JS, Gibson JE. Paraquat. Model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect* 1984; 55: 37-46.
14. Fine A, Goldstein RH, Snider GL. In: Crystal RG, Best JB et al. (ed). *Animals models of pulmonary fibrosis. The Lung*, New York, Raven Press, 1991, 2047-2057.
15. Bannenberg G, Atzori L, Xue J, Auberson S, Kimland M, Ryrfeldt A, Lundberg JM, Moldeus P. Sulfur dioxide and sodium metabisulfite induce bronchoconstriction in the isolated perfused and ventilated guinea pig lung via stimulation of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Respiration* 1994; 61: 130-137.
16. Waldeck J. En Matmetod for att undersoka lakemedels effekter pa luftvagarna: Thesis Lunds Technical University, 1987.
17. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959; 82: 70-76.
18. Atzori L, Bannenberg G, Corrigan AM, Lou Y-P, Lundberg JM, Ryrfeldt A e Moldeus P. Sulfur dioxide-induced bronchoconstriction via ruthenium red-sensitive activation of sensory nerves. *Respiration* 1992; 59: 272-278.
19. Sakamoto T, Elwood W, Barnes PJ, e Chung KF. Pharmacological modulations of sodium metabisulphite induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction in the guinea pig. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 481-487.
20. Hoffer E, Avidor I, Benjamionov O, Shenker L, Tabak A, Tamir A, Merzbach D, Taitelman U. N-Acetylcysteine delays the infiltration of inflammatory cells into the lungs of paraquat-intoxicated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 120: 8-12.
21. Adamson IYR, Young L, Bowden DH. Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1988; 130: 377-383.
22. Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard C-J. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 1985; 315: 61-63.

Richiesta estratti: Dr. Luigi Atzori, Dip. Tossicologia-Sez. Patologia Generale, Via Porcell 4, 09100 Cagliari, Italia.



8

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ANCONA  
CLINICA DI MEDICINA DEL LAVORO

---

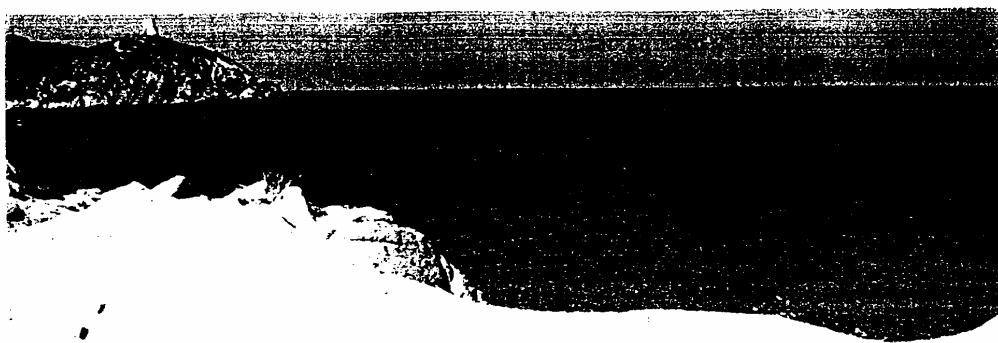
12° Convegno

**Patologia da tossici  
ambientali e occupazionali**

**Ancona, 18 Settembre 1995**

Hotel Jolly, Via XXIX Settembre, 14

---



9

**XXII CONGRESSO NAZIONALE**

**SIP**

**SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA**

**RIASSUNTI**

**4-7 OTTOBRE 1994 CAGLIARI - CHIA LAGUNA - DOMUS DE MARIA**

RUOLO DEI NERVI SENSORIALI NELLA BRONCOCOSTRIZIONE DA  
BIOSSIDO DI ZOLFO, METABISOLFITO E ACIDO CITRICO  
Atzori Luigi, Corriga Anna Maria e Congiu Luigi.  
Dipartimento Tossicologia-Sez. Patologia Generale, Università  
Studi, 09100 Cagliari.

L'esposizione delle vie respiratorie a soluzioni acide produce una marcata broncocostrizione, specialmente in soggetti asmatici. Il meccanismo di ciò non è ancora chiarito. La diminuzione del pH nel tratto respiratorio può aversi dopo rigurgito e aspirazione del succo gastrico, o per inalazione di inquinanti ambientali quali  $\text{SO}_2$ , che a contatto con l'acqua da luogo a diversi derivati (solfiti) e al rilascio di ioni idrogeno.

Il broncospasmo indotto da  $\text{SO}_2$  o dal metabisolfito o dall'acido citrico è debolmente e in maniera incostante inibito da sostanze anticolinergiche. Mentre per i derivati dell'acido arachidonico o dell'istamina non è stato dimostrato ancora un ruolo preciso, recenti osservazioni hanno indicato che un sistema non-adrenergico non-colinergico potrebbe essere coinvolto. Nella presente indagine abbiamo studiato quest'ultima possibilità. L'inalazione di  $\text{SO}_2$  (250 ppm) o di aerosol di metabisolfito (80 mM) o di acido citrico (0.4 M) o la perfusione con metabisolfito (3 mM) del polmone isolato perfuso e ventilato di cavia produce una marcata broncocostrizione, documentata da una diminuzione della compliance e della conduttanza. Nessun effetto è osservato sul tono vasale. Per studiare il ruolo dell'attivazione dei nervi sensoriali nella risposta alle soluzioni acide, un gruppo di animali in età neonatale è stato trattato con capsaicina, a dosi che inducono una degenerazione selettiva dei nervi sensoriali e una quasi completa deplezione del contenuto di tachichinine e Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP). Tale pretrattamento riduce significativamente la broncocostrizione da  $\text{SO}_2$ , metabisolfito e acido citrico. Anche i trattamenti con rosso rutenio, un bloccante degli effetti della capsaicina, o con capsazepina, un antagonista selettivo per i "recettori" della capsaicina, inibiscono la broncocostrizione da soluzioni acide. La broncocostrizione da  $\text{SO}_2$ , metabisolfito e acido citrico è associata con il rilascio di CGRP nel liquido di perfusione. Questo peptide è accumulato in vescicole nei nervi sensoriali assieme a NKA e SP, ed il suo rilascio è considerato un indice dell'attivazione di questi nervi. La perfusione del polmone con un medium privo di  $\text{Ca}^{2+}$  inibisce la broncocostrizione da  $\text{SO}_2$  e il rilascio di CGRP. Un simile effetto da parte del medium privo di  $\text{Ca}^{2+}$  è riportato sulla broncocostrizione da capsaicina. In conclusione, la broncocostrizione da soluzioni acide potrebbe correlarsi all'attivazione dei nervi sensoriali e al rilascio di neuropeptidi. L'effetto risulta essere  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente e legato ad un possibile recettore sensibile alla capsaicina.

Luigi Atzori<sup>a</sup>  
Gerard Bannenberg<sup>a</sup>  
Anna Maria Corrigan<sup>a</sup>  
Ya-Ping Lou<sup>b</sup>  
Jan M. Lundberg<sup>b</sup>  
Åke Ryrfeldt<sup>a</sup>  
Peter Moldéus<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Toxicology and  
Institute of Environmental Medicine, and

<sup>b</sup> Department of Pharmacology,  
Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

**Key Words**

Sulfur dioxide  
Bronchoconstriction  
Guinea-pig lung, perfused  
Sensory nerves

## Sulfur Dioxide-Induced Bronchoconstriction via Ruthenium Red-Sensitive Activation of Sensory Nerves

**Abstract**

The mechanism of sulfur dioxide-induced bronchoconstriction was studied using isolated perfused and ventilated guinea-pig lungs. They were exposed to sulfur dioxide after pretreatment with different compounds, either via the pulmonary artery or via the air passages. Neither the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (30  $\mu$ M) nor the H<sub>1</sub>-receptor antagonist diphenhydramine (15  $\mu$ M), given via the perfusate, attenuated the sulfur dioxide-induced bronchoconstriction. Furthermore, sulfur dioxide exposure did not cause a release of either thromboxane or histamine into the perfusate. In experiments with atropine equivocal results were obtained with regard to protection against sulfur dioxide-evoked bronchoconstriction. Intratracheal instillation of the local anesthetic agent lidocaine (1 mg/50  $\mu$ l) markedly reduced the sulfur dioxide-induced bronchoconstriction. Also, ruthenium red (10  $\mu$ M), an agent with calcium entry-blocking properties and an inhibitor of capsaicin-induced bronchoconstriction, was able to inhibit the effect of sulfur dioxide. The sulfur dioxide-induced bronchoconstriction was associated with release of calcitonin gene-related peptide, a sensory neuropeptide. The effect of sulfur dioxide was also inhibited by a Ca<sup>2+</sup>-free buffer plus EGTA. These results suggest that sulfur dioxide-induced bronchoconstriction in the guinea-pig lung is the result of a local effect on sensory nerves (C-fiber activation). The mechanism seems to be dependent on the Ca<sup>2+</sup>-dependent release of sensory neuropeptides and to be linked to opening of the cation channel, which is associated with the proposed capsaicin receptor on sensory nerves as revealed by the inhibitory effect of ruthenium red.

**Introduction**

Sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) is a major air pollutant which is released into the atmosphere from combustion processes such as those occurring in automobile engines, coal-fired power stations and many industrial processes [1]. SO<sub>2</sub> is a

moderately irritant gas with strong hydrophilic properties [2]. It is thus very soluble in the liquid layer covering the mucosa of the respiratory tract. On contact with water SO<sub>2</sub> rapidly dissociates to bisulfite and sulfite according to the reaction: SO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O  $\leftrightarrow$  H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>  $\leftrightarrow$  H<sup>+</sup>+HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  $\leftrightarrow$  2H<sup>+</sup>+SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>.

Received:  
November 27, 1991  
Accepted after revision:  
July 22, 1992

Prof. Peter Moldéus  
Department of Toxicology  
Karolinska Institutet  
Box 60400  
S-104 01 Stockholm (Sweden)

© 1992 S. Karger AG, Basel  
0025-7931/92/0595-0272  
\$ 2.75/0

A correlation between respiratory disorders and SO<sub>2</sub> levels in the air have been suggested. Numerous laboratory investigations have shown that inhalation of SO<sub>2</sub> causes pulmonary irritation in humans and animals [3]. This may result in various symptoms, one of the prevalent being bronchoconstriction and respiratory distress, especially in asthmatics [4–7]. Some of the pathophysiological responses of the lung to SO<sub>2</sub> seem to be mediated through its dissolution products including lowering of pH [8–10].

Subjects with allergic asthma are more prone to develop severe pulmonary reactions after short-term exposure to relatively low levels of SO<sub>2</sub> [7]. The increase in bronchocomuscular tone induced by SO<sub>2</sub> may result from activation of irritant receptors [11], and subsequent cholinergic mechanisms [5, 12, 13]. Furthermore, activation of pulmonary c-fibers may evoke release of pulmonary neuropeptides [14]. Modifications in the reactivity of these receptors could be present in the asthmatic patient [15].

The possible mechanism involved in SO<sub>2</sub>-induced bronchoconstriction was studied by using the isolated and perfused guinea-pig lung. Previously, we reported that exposure to SO<sub>2</sub> induced a marked and dose-related bronchoconstriction in this model [16].

In order to assess whether SO<sub>2</sub> might be acting by stimulating the release of contractile mediators, inhibitors of such agents (e.g. anticholinergic drug, atropine; cyclooxygenase inhibitor, indomethacin; H<sub>1</sub>-receptor antagonist, diphenhydramine) were added to the perfusate during SO<sub>2</sub> exposure. The effect of ruthenium red (RR), a blocker of transmembrane Ca<sup>2+</sup> fluxes thereby selectively inhibiting the pulmonary effects of capsaicin [17], and the content of calcitonin gene-related peptide (CGRP), coreleased with tachykinins in the lung [14], were evaluated in order to study the effect of SO<sub>2</sub> on sensory nerves. Release of histamine and thromboxane into the perfusate was also studied in some experiments. To investigate whether the SO<sub>2</sub>-induced bronchoconstriction was induced by a local axon reflex, lidocaine, a local anesthetic, was administered via the air passages.

## Materials and Methods

### *Sulfur Dioxide Delivery*

SO<sub>2</sub> of a fixed concentration (500 ppm in air) was delivered from a cylinder (AGA, Sweden) to a glass chamber where it was mixed with breathing air (AGA, Sweden) in order to obtain the different concentrations studied. All flows were continuously monitored with air flow meters (Model s-1357-M-8506, Brooks Instruments B.V., Veenendaal, Holland). The gas was delivered at a flow of 600 ml/min to the pneumotachograph which was connected to the trachea. Before being exposed to SO<sub>2</sub> the lungs were connected to breathing air.

### *Isolated and Perfused Guinea-Pig Lung*

Male guinea pigs from the Dunkin-Hartley strain, weighing about 250–350 g, were used in this study. The animals were anesthetized with pentobarbital (Mebumal Vet., Nordvacc, Sweden) 40 mg/kg body weight. The anesthetic was diluted two times with 0.9% NaCl solution to improve absorption.

The chest was opened, the superior caval vein cut and about 500 U heparine injected into the right ventricle. A small incision was made in the right and left ventricle for cannulation of the pulmonary circulation. Via tracheotomy, an airway cannula was inserted into the trachea. The lung was dissected free with the trachea put into an artificial water-saturated thoracic chamber. The method has been described previously in detail [18]. The lungs were perfused at a constant hydrostatic pressure using Krebs-Ringer buffer pH 7.4 (composition in mM: NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 24.9, KH<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 1.2) with the addition of 12.5 mM HEPES; 5 mM glucose and 2% bovine serum albumin fraction V and 50 nM salbutamol. The chemicals were of analytical grade from a local supplier. The vascular flow rate was 18–22 ml/min. The buffer reservoir and the thoracic chamber were jacketed and warmed with circulating water kept at 37 °C. The perfusate pH was maintained between 7.35 and 7.45 by blowing CO<sub>2</sub> into the buffer as needed. The lung was ventilated at 60 breaths/min by creating an alternating negative pressure (–1 to –11 cm H<sub>2</sub>O) inside the thoracic chamber using a Harvard animal respirator (Model 680, Harvard Apparatus, USA) and a vacuum source connected to the thoracic chamber.

The tracheal airflow was measured with a heated Fleish pneumotachograph (A. Fleisch, Switzerland) and a pressure transducer sensor 164pc (Honeywell, USA). The thoracic pressure changes were monitored with a pressure sensor 174pc (Honeywell, USA). The signals were transformed and amplified via a Coulbourn Labline interface system (Coulbourn Instruments, USA) and recorded directly on a computer where calculation of lung conductance and dynamic compliance were performed [19, 20]. The perfusion flow was measured with a flow meter (Promedico, Sweden), as well as manually, and recorded with time.

The lungs were allowed to stabilize for 30 min before starting the experiment. Only lungs with stable baseline values for perfusion flow, compliance and conductance were used. Before the administration of the test compounds, the lungs were allowed to equilibrate for 20 min in a Krebs-Ringer buffer without albumin in order to avoid binding of our agents to proteins. The test compounds, except for lidocaine, were present in the perfusion medium during the entire experiment. The perfusions were performed using single-pass perfusion.

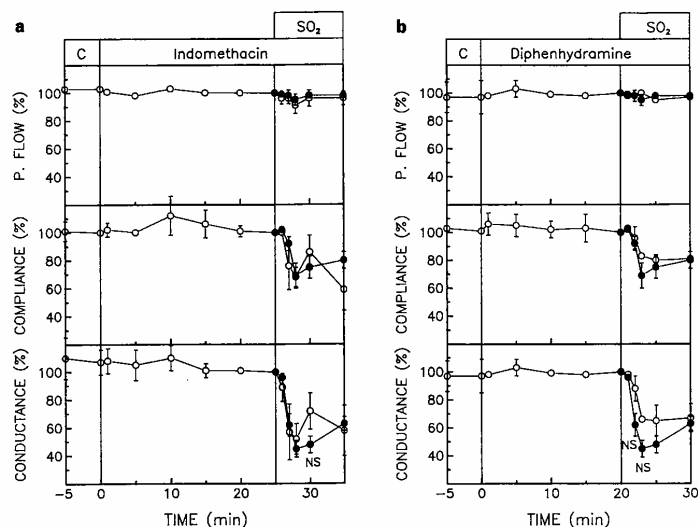
### *Analysis of Calcitonin Gene-Related Peptide in the Buffer Effluent*

For the analysis of CGRP 3-min fractions of the effluent buffer were collected. The first fraction represented a control period before SO<sub>2</sub> exposure and the following fractions were collected during SO<sub>2</sub> breathing. The samples were collected in plastic beakers cooled on ice containing 100 µl acetic acid. The samples were concentrated on Sep-Pak cartridges to reduce the perfusate volume. After elution 0.1 ml of 1% bovine serum albumin (fraction V) was added and the samples were evaporated at 45 °C under N<sub>2</sub> gas. After evaporation, the samples were redissolved in buffer and the content of CGRP was analyzed by radioimmunoassay as previously described [14].

### *Analysis of Histamine*

Histamine was determined by the *o*-phthaldialdehyde spectrofluorimetric procedure with the modification that the extraction proce-

**Fig. 1.** Effect of 30  $\mu$ M indomethacin (**a**) and 15  $\mu$ M diphenhydramine (**b**) on 250 ppm  $\text{SO}_2$  exposure in the isolated and perfused guinea-pig lung:  $\text{SO}_2$  alone ( $\bullet$ ,  $n = 6$ ) or plus indomethacin or diphenhydramine ( $\circ$ ,  $n = 3$ ). The values of perfusion flow, compliance and conductance at the initiation of  $\text{SO}_2$  exposure were taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM.



dures was omitted [22]. Fluorescence was measured with a Shimadzu spectrofluorimeter with excitation at 360 nm and emission at 460 nm.

#### Analysis of Thromboxane

The thromboxane  $\text{A}_2$  concentration in the perfusate was measured as its stable metabolite thromboxane  $\text{B}_2$  using a RIA Kit (NEM, Research Products, Du Pont, Dreieich, FRG).

#### Analysis of Data and Statistics

Values given are means  $\pm$  SEM. The significance of differences was calculated using Student's  $t$  test.

## Results

Exposure of the isolated, perfused and ventilated guinea-pig lung to 250 ppm  $\text{SO}_2$  induced a marked and transitory bronchoconstriction in the lung measured as a decrease in conductance and compliance (fig. 1). No effects were observed on the perfusion flow.

To investigate whether a cyclooxygenase product or histamine were involved in the  $\text{SO}_2$ -induced bronchoconstriction, the lung was perfused with indomethacin (30  $\mu$ M), or diphenhydramine (15  $\mu$ M) 20–25 min prior to and during  $\text{SO}_2$  exposure. Neither of these treatments prevented the effect of  $\text{SO}_2$  on the lung (fig. 1). Moreover, there was no increase in thromboxane or histamine concentrations in the perfusate (table 1).

**Table 1.** Concentration of thromboxane or histamine in the perfusate before and during  $\text{SO}_2$  exposure of isolated perfused and ventilated guinea-pig lungs

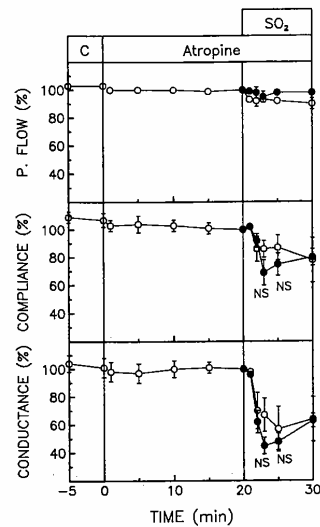
Mediator	Before $\text{SO}_2$ exposure	During $\text{SO}_2$ exposure	Statistical significance
Thromboxane, pg/ml	$< 5^a$ ( $n = 5$ )	$< 5^a$ ( $n = 5$ )	NS
Histamine, ng/ml	$75 \pm 12$ ( $n = 3$ )	$44 \pm 14$ ( $n = 5$ )	NS

<sup>a</sup> Below detection limit.

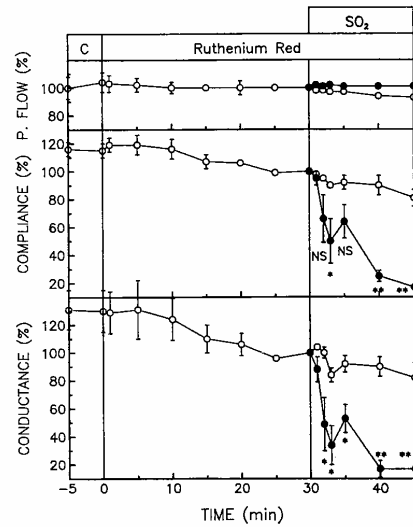
Perfusion of the lung with atropine (10  $\mu$ M), as described for indomethacin and diphenhydramine, was able to protect the lung from the effects of  $\text{SO}_2$  exposure only in one preparation out of five. The mean values of the experiments did not reveal any significant protective effect of atropine on  $\text{SO}_2$ -induced bronchoconstriction in the guinea-pig lung (fig. 2). After atropine treatment the lungs were found to be nonresponsive to acetylcholine injections at dose levels known to induce bronchoconstriction in this model (data not shown).

To evaluate a possible involvement of neuropeptides released by sensory nerves (e.g. C-fibers), the isolated and perfused lungs were treated with 10  $\mu$ M RR 30 min prior to and during  $\text{SO}_2$  exposure. A marked inhibition of the ef-





**Fig. 2.** Effect of 10  $\mu$ M atropine on 250 ppm  $\text{SO}_2$  exposure in the isolated and perfused guinea-pig lung:  $\text{SO}_2$  alone ( $\bullet$ ,  $n = 6$ ) or plus atropine ( $\circ$ ,  $n = 5$ ). The values of perfusion flow, compliance and conductance at the initiation of  $\text{SO}_2$  exposure were taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM.



**Fig. 3.** Effect of 10  $\mu$ M ruthenium red on 250 ppm  $\text{SO}_2$  in the isolated and perfused guinea-pig lung:  $\text{SO}_2$  alone ( $\bullet$ ,  $n = 4$ ) or plus ruthenium red ( $\circ$ ,  $n = 4$ ). The values of perfusion flow, compliance and conductance at the initiation of  $\text{SO}_2$  exposure were taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM.

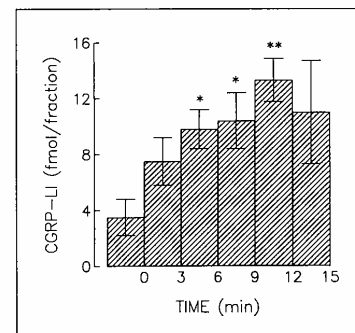
fects of  $\text{SO}_2$  was observed (fig. 3). During the  $\text{SO}_2$  exposure the concentration of CGRP-like immunoreactivity (CGRP-Li) in the pulmonary effluent was significantly increased over the values obtained before exposure, indicating neuropeptide release (fig. 4). The peak amount of CGRP-Li in the effluent buffer was reached after the maximal effect induced by  $\text{SO}_2$  in the lung.

To further study whether a possible local sensory effect was responsible for the  $\text{SO}_2$ -induced bronchoconstriction, the local anesthetic lidocaine (1 mg/50  $\mu$ l i.t.) was instilled into the trachea. This treatment abolished the effect of  $\text{SO}_2$  (fig. 5).

To study the role of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , the lung was perfused for 5 min with a  $\text{Ca}^{2+}$ -free buffer plus 0.5 mM EGTA before being exposed to  $\text{SO}_2$  in the presence of a normal perfusion buffer. This treatment prevented  $\text{SO}_2$ -induced bronchoconstriction (fig. 6).

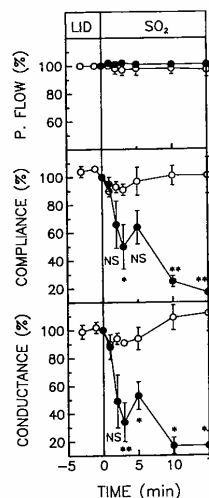
## Discussion

Several mechanisms may be involved in  $\text{SO}_2$ -induced bronchoconstriction.  $\text{SO}_2$  or its products, e.g. sulfite, might

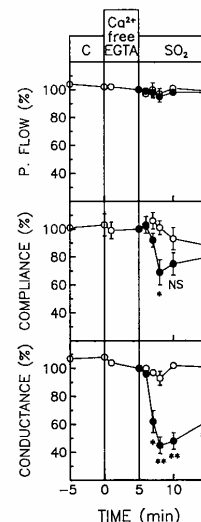


**Fig. 4.** CGRP-Li content of buffer effluent in 3-min fractions collected before and during 250 ppm  $\text{SO}_2$  exposure. Bars indicate means  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.002$  (Student's  $t$  test).

react directly with critical cell(s) in the lung leading to the release of bronchoactive agents such as thromboxane or histamine. These mechanisms appear not to be operating in our model since neither cyclooxygenase inhibition nor a histamine antagonist protected against the  $\text{SO}_2$ -induced



**Fig. 5.** Effect of lidocaine (Lid, 1 mg/50  $\mu$ l intratracheally) on 250 ppm  $\text{SO}_2$  exposure in the isolated and perfused guinea-pig lung:  $\text{SO}_2$  alone ( $\bullet$ ,  $n = 4$ ) or plus lidocaine ( $\circ$ ,  $n = 4$ ). The values of perfusion flow, compliance and conductance at the initiation of  $\text{SO}_2$  exposure were taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM.



**Fig. 6.** Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ -free buffer plus 0.5 mM EGTA on 250 ppm  $\text{SO}_2$  exposure in the isolated and perfused guinea-pig lung:  $\text{SO}_2$  with control buffer ( $\bullet$ ,  $n = 6$ ) or with  $\text{Ca}^{2+}$ -free buffer plus EGTA-treated lung ( $\circ$ ,  $n = 3$ ). The values of perfusion flow, compliance and conductance at the initiation of  $\text{SO}_2$  exposure were taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM.

effects. There was no increased release of histamine and thromboxane into the lung perfusate during  $\text{SO}_2$  exposure either.

$\text{SO}_2$  may also trigger the bronchoconstriction via direct stimulation of receptors on sensory nerves (e.g. irritant receptors, C-fiber receptors, etc.) of the airways [23]. Several studies have suggested a neuronal cholinergic reflex mechanism via the vagus nerve to be involved in  $\text{SO}_2$ -induced bronchoconstriction since atropine seems, at least in some cases, to exert a protective effect [5, 24, 25]. In our lung preparation, the vagus nerve is cut while the local reflex arches are intact. Therefore a neuronal parasympathetic reflex pathway via CNS cannot be involved during  $\text{SO}_2$ -induced bronchoconstriction in the perfused lung. A neurally mediated bronchoconstriction can be produced either through the release of acetylcholine and/or by sensory neuropeptides [23]. In the experiments with atropine, equivocal results were obtained with regard to protection against  $\text{SO}_2$ -evoked bronchoconstriction. Thus, the role of an involvement of the cholinergic system remains unclear. Also in asthmatic patients this mechanism has not been confirmed [12, 24]. The bronchocon-

striction observed in our model appears to be due to stimulation of some local neuronal reflex arch. One indication for this is the protective effect exerted by lidocaine. This local anesthetic agent has been reported to inhibit the effect of capsaicin indicating that a local axon reflex is necessary for capsaicin-mediated substance P release and subsequent functional effects [26].

RR blocks transmembrane  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes evoked by capsaicin and inhibits contraction of smooth muscle induced by capsaicin [27]. Similarly, in our model RR was able to attenuate the  $\text{SO}_2$ -induced bronchoconstriction. In the case of capsaicin its toxic effects seems to be mediated by an excessive entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into the sensory neurons. The protective effect of RR on capsaicin and  $\text{SO}_2$  effects may be mediated by the inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  entry [28]. The involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  during  $\text{SO}_2$ -induced bronchoconstriction is also indicated by the lack of  $\text{SO}_2$  effects on the lung after the removal of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Also the capsaicin-induced release of CGRP from sensory nerves has earlier been shown to be  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent [29].

A local effect of  $\text{SO}_2$  is also suggested by the release of CGRP-Li. This peptide is localized in capsaicin-sensitive

afferents and is released in response to activation of sensory nerve endings [14]. The detectable amounts of CGRP-Li in the perfusate would represent a 'spill over' into the circulation escaping local degradation. Measurement of CGRP-Li is used as an estimate of mediator release from sensory nerves because of its higher stability [14] although it seems clear that the bronchoconstrictive response is caused by tachykinins acting on neurokinin-2 receptors on bronchial smooth muscle [30].

Overall, our results indicate that neuropeptide release, possibly tachykinins, can be responsible for the SO<sub>2</sub>-induced bronchoconstriction. The fact that SO<sub>2</sub> does not affect the perfusion flow may be due to a counteracting effect of CGRP on substance P-evoked vasoconstriction [15]. Since RR has also been reported recently to inhibit citric acid-induced cough in guinea pigs [17], some common mechanisms may exist between the effect of SO<sub>2</sub> and citric acid. Lowering of pH has been shown to activate capsaicin-sensitive nerves in the tracheobronchial mucosa [31] and to release CGRP from the guinea-pig urinary bladder [32]. Sensory neurons which respond to low pH with an in-

crease in cation permeability are largely restricted to the capsaicin-sensitive subpopulation [17]. Thus, local changes in pH induced by SO<sub>2</sub> may influence the cation channel which is associated with the proposed 'capsaicin receptor' as revealed by the data using RR.

In summary, our data indicate that exposure to SO<sub>2</sub> induces bronchoconstriction in the isolated and perfused guinea-pig lung. The response is not mediated by thromboxane or histamine release. The involvement of a cholinergic mechanism is less clear. The effect appears to be Ca<sup>2+</sup>-dependent and the inhibition obtained by RR indicates a possible neuropeptide release involvement. This is further supported by the demonstration of CGRP-Li release during SO<sub>2</sub> exposure.

### Acknowledgements

The present study was supported by grants from the Swedish Environmental Protection Agency, the Swedish Medical Research Council, the Swedish Tobacco Company and the American Council for Tobacco Research.

### References

- Philip-Joet F: Respiratory effects of pollution. *Biomed Pharmacother* 1990;44:443-446.
- Petering DH, Ting-Shih N: Biochemistry of bisulfite-sulfur dioxide. *Environ Res* 1975;9: 55-65.
- Committee on Sulfur Oxides: Epidemiologic studies on the health effects of sulfur oxides; in *Sulfur Oxides*. Washington, National Academy of Sciences, 1978, pp 180-209.
- Frank WR, Amdur MO, Worcester J, Whittenberger JL: Effects of acute controlled exposure to SO<sub>2</sub> on respiratory mechanics in healthy male adults. *J Appl Physiol* 1962;17:252-258.
- Nadel JA, Salem H, Tamplin B, Tokiwa Y: Mechanisms of bronchoconstriction during inhalation of sulfur dioxide. *J Appl Physiol* 1965; 20:164-167.
- Shore SA, Kariya ST, Anderson K, Skornik W, Feldman HA, Pennington J, Godleski J, Drazen JM: Sulfur dioxide induced bronchitis in dogs. Effects on airways responsiveness to inhaled and intravenously administered methacholine. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:840-847.
- Balmes JR, Fine JM, Sheppard D: Symptomatic bronchoconstriction after short-term inhalation of sulfur dioxide. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1117-1121.
- Steinmacker A: A suggested mechanism for sulfite sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77:116-117.
- Fine JM, Gordon T, Sheppard D: The roles of pH and ionic species in sulfur dioxide- and sulfite-induced bronchoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1122-1126.
- Nichol GM, Alton EFWF, Nix A, Geddes DM, Chung KF, Barnes PJ: Effect of inhaled furosemide on metabisulfite- and methacholine-induced bronchoconstriction and nasal potential difference in asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:576-580.
- Widdicombe JG: Reflex control of airways smooth muscle. *Postgrad Med J* 1975;51(suppl 7):36-43.
- Tan WC, Cripps E, Douglas N, Sudlow F: Protective effect of drugs on bronchoconstriction induced by sulfur dioxide. *Thorax* 1982;37:671-676.
- Thompson DC, Szarek JL, Altieri RJ, Diamond L: Nonadrenergic bronchodilation induced by high concentration of sulfur dioxide. *J Appl Physiol* 1990;69:1786-1791.
- Kröll F, Karlsson J-A, Lundberg JM, Persson CGA: Capsaicin-induced bronchoconstriction and neuropeptide release in guinea-pig perfused lungs. *J Appl Physiol* 1990;68:1679-1687.
- Goldie RG: Receptors in asthmatic airways. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:151-156.
- Atzori L, Bannenberg G, Corrigan AM, Moldéus P, Ryrfeldt Å: Sulfur dioxide-induced bronchoconstriction in the isolated perfused and ventilated guinea-pig lung. *Respiration* 1992;59:16-21.
- Lou Y-P, Karlsson J-A, Franco-Cereceda A, Lundberg JM: Selectivity of ruthenium red in inhibiting bronchoconstriction and CGRP release induced by afferent C-fibre activation in the guinea-pig lung. *Acta Physiol Scand* 1991; 142:191-199.
- Ryrfeldt Å, Kröll F, Berggren M, Moldéus P: Hydroperoxide induced effects on lung mechanics and glutathione status in rat isolated perfused and ventilated lung. *Life Sci* 1988; 42:1439-1445.
- Amdur MO, Mead J: Mechanics of respiration in unanesthetized guinea-pigs. *Am J Physiol* 1958;192:364-368.
- Waldeck J: En mätmetod för att undersöka läkemedels effekter på luftvägarna, thesis Lund's Technical University, Lund, 1987.
- Hemsén A, Pernov J, Lundberg JM: Regional extraction of endothelins and conversion of big endothelin to endothelin 1 in the pig. *Acta Physiol Scand* 1991;141:319-324.

- 22 Shore PA, Burkholter A, Cohn VH: A method for the fluorimetric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1959;127:182-186.
- 23 Barnes PJ: Neural control of airway function: new perspectives. *Mol Aspects Med* 1990;11:351-423.
- 24 Snashall PD, Baldwin C: Mechanisms of sulphur dioxide induced bronchoconstriction in normal and asthmatic man. *Thorax* 1982;37:118-123.
- 25 Sheppard D, Wong WS, Uehara CF, Nadel JA, Boushey HA: Lower threshold and greater bronchomotor responsiveness of asthmatic subjects to sulfur dioxide. *Am Rev Respir Dis* 1980;122:873-878.
- 26 Lundberg JM, Saria A: Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. *Nature* 1983;302:251-253.
- 27 Maggi CA, Patacchini R, Santicioli P, Guiliani S, Geppetti P, Meli A: Protective action of ruthenium red towards capsaicin desensitization of sensory fibers. *Neurosci Lett* 1988;88:201-205.
- 28 Wood JN, Winter J, James JF, Rang HP, Yeats J, Bevan S: Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci* 1988;8:3208-3220.
- 29 Franco-Cereceda A, Sari A, Lundberg JM: Differential release of calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y from the isolated heart by capsaicin, ischemia, nicotine, bradykinin and ouabain. *Acta Physiol Scand* 1989;135:173-187.
- 30 Lundberg JM, Lou Y-P: Dactinomycin inhibits non-cholinergic bronchoconstriction by capsaicin-sensitive sensory nerves in the guinea-pig by antagonizing neurokinin 2 receptor activation. *Acta Physiol Scand* 1991;141:141-142.
- 31 Martling C-R, Lundberg JM: Capsaicin sensitive afferents contribute to acute airway edema following tracheal instillation of hydrochloric acid or gastric juice in the rat. *Anesthesiology* 1988;68:350-356.
- 32 Geppetti P, Tramontana M, Patacchini R, Del Bianco E, Santicioli P, Maggi CA: Neurochemical evidence for the activation of the 'efferent' function of capsaicin-sensitive nerves by lowering of the pH in the guinea-pig urinary bladder. *Neurosci Lett* 1990;114:101-106.

11

XXI CONGRESSO NAZIONALE  
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA

**PATOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE  
DA FATTORI ENDOGENI E DA FATTORI AMBIENTALI**

*Con il Patrocinio:*

Università degli Studi di Genova  
Facoltà di Medicina e Chirurgia Università di Genova  
Regione Liguria  
Comune di Santa Margherita Ligure

Genova - Santa Margherita Ligure  
27-30 ottobre 1992

**RUOLO DEI GRUPPI SULFIDRILICI NEL CORSO DELLA BRONCO-E  
VASOCOSTRIZIONE INDOTTA DA PEROSSIDO D'IDROGENO E  
TROMBOSSANO.**

L. Atzori, A.M. Corriga, Å. Ryrfeldt<sup>o</sup>, P. Moldèus<sup>o</sup> e L. Congiu

Dipart. Tossicologia, Sez. Patologia Generale, Università  
Cagliari

<sup>o</sup>Dept. Toxicology, Karolinska Institute, Stoccolma, Svezia

La struttura di diverse proteine contenenti gruppi sulfidrilici può essere modificata da sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno, capaci con tale meccanismo di indurre danno cellulare. Infatti, le specie reattive dell'ossigeno sono ritenute responsabili di diverse patologie respiratorie, specialmente quelle di tipo infiammatorio. Tra le specie reattive dell'ossigeno, il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ) induce bronco- e vasocostrizione ed edema nel polmone. Questi effetti sembrano essere principalmente dipendenti dalla formazione di trombossano ( $TXA_2$ ) (1). Anche un effetto ossidante diretto da parte del  $H_2O_2$ , in particolare a carico dei gruppi sulfidrilici, può essere ipotizzato nella genesi del danno polmonare.

In questa indagine sperimentale abbiamo cercato di chiarire il meccanismo della bronco- e vasocostrizione indotta da  $H_2O_2$ , acido arachidonico (AA) e U44069, un analogo del trombossano, con particolare riguardo al ruolo dei gruppi sulfidrilici.

L'indagine è stata eseguita sul polmone isolato e perfuso di ratto. Questa metodica offre il vantaggio di poter studiare in contemporanea le variazioni della funzione respiratoria e i cambiamenti biochimici (1).

**METODI**

Nei nostri esperimenti sono stati usati ratti maschi Wistar, del peso di 250-350 gr. Il polmone è stato isolato, ventilato e perfuso secondo la tecnica altrove descritta (1). Il polmone è stato esposto, mediante perfusione, all'azione di  $H_2O_2$ , AA e U44069. In alcuni esperimenti la somministrazione di questi agenti era preceduta dal trattamento con diamide. Nel corso degli esperimenti venivano monitorizzati la compliance, la conduttanza polmonare e il flusso di perfusione. Il contenuto di trombossano  $B_2$  ( $TXB_2$ ), il metabolita stabile di  $TXA_2$ , rilasciato nel liquido di perfusione veniva misurato con tecnica radioimmunologica (1).

**RISULTATI**

L'aggiunta nel liquido di perfusione del polmone di  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ ), acido arachidonico (AA) (100  $\mu M$ ) e U44069 (100 pmoli) causa una marcata diminuzione della compliance, della conduttanza e del flusso di perfusione (Fig. 1).

Questi effetti sono accompagnati da rilascio di  $TXA_2$  nel liquido di perfusione (Fig. 2).

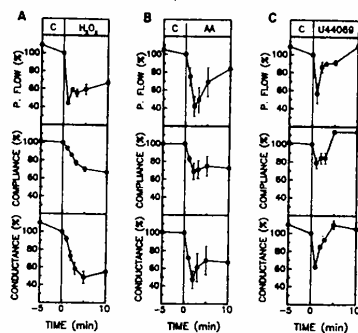


FIG.1-Effetto dell' $H_2O_2$  (500 $\mu$ M), AA(100 $\mu$ M) e U44069(100pmoli) sul flusso di perfusione e la meccanica polmonare. I valori sono media $\pm$ ES.

Treatment	n	TxB <sub>2</sub>	
		pg/ml	pg/min
Control	3	8 $\pm$ 2	106 $\pm$ 26
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 mM)	4	1,300 $\pm$ 144*	12,899 $\pm$ 1,567*
Diamide (0.5 mM)	3	46 $\pm$ 9	134 $\pm$ 103
Diamide + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3	840 $\pm$ 25†	10,351 $\pm$ 1,804‡
AA (0.1 mM)	3	15,186 $\pm$ 5,775§	147,615 $\pm$ 56,308§
Diamide + AA	3	9,580 $\pm$ 3,792	134,380 $\pm$ 11,086

Fig.2-I valori sono media $\pm$ ES;n, n° esperimenti. \* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs controllo, p<0.02;† diamide+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, p<0.002, ‡ diamide+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs controllo, p<0.02; § AA vs control, p<0.002.

Il pretrattamento del polmone con diamide (500 $\mu$ M), una sostanza ossidante i gruppi sulfidrilici, inibisce la bronco- e vasocostrizione indotta da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AA e U44069 (Fig.3). Questo effetto inibente non è però associato ad una inibizione del rilascio di TxB<sub>2</sub> (Fig.3).

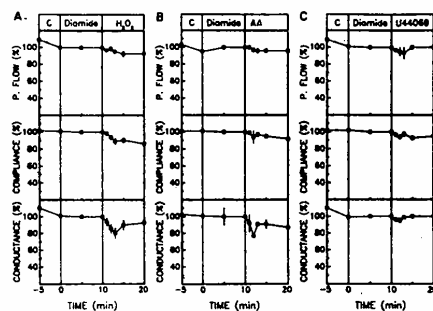


Fig.3-Effetto della diamide (500 $\mu$ M) sulle modificazioni del flusso di perfusione e la meccanica polmonare indotte da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 $\mu$ M), AA(100 $\mu$ M) e U44069 (100pmoli). I valori sono media  $\pm$  ES.

L'effetto della diamide sembra essere specifico, in quanto, non è in grado di influenzare l'effetto della bradichinina e della serotonina, sostanze capaci di indurre bronco- e

vasocostrizione (Fig.4).

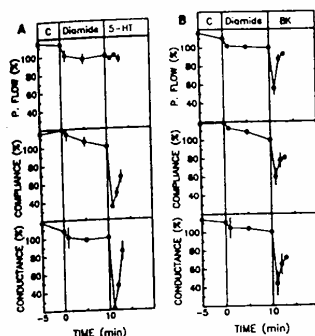


Fig.4-Effetto della diamide (500 $\mu$ M) sulle modificazioni del flusso di perfusione e la meccanica polmonare indotte da serotonina (5-HT) (A) e bradichinina (BK) (B). I valori sono medi  $\pm$  ES.

## DISCUSSIONE

I risultati della presente indagine hanno messo in evidenza che gli effetti indotti da  $H_2O_2$  nel polmone isolato e perfuso di ratto sono associati ad un rilascio di trombossano. La diamide svolge un effetto protettivo pur non modificando il rilascio del trombossano, il che starebbe ad indicare che il meccanismo dell'inibizione della bronco- e vasocostrizione non sia dovuto ad una diminuzione della produzione di trombossano. Poiché la diamide non inibisce la bronco- e vasocostrizione indotta da bradichinina e serotonina, il suo effetto può considerarsi specifico nei riguardi dell'azione del trombossano, in quanto dopo l'attivazione recettoriale specifica queste sostanze utilizzano un meccanismo simile per la trasmissione del segnale alla struttura contrattile cellulare. E', pertanto, probabile che l'azione della diamide sia a livello del sito recettoriale o della G-protein correlata.

E' stato prospettato che nel controllo dell'attività recettoriale un ruolo importante sia svolto dai gruppi sulfidrilici. L'azione ossidante della diamide a livello del recettore per il trombossano potrebbe alterare la trasmissione del segnale il che induce a ritenere che lo stato dei gruppi sulfidrilici dei recettori e della G-protein possa essere importante nella genesi di alcuni processi patologici.

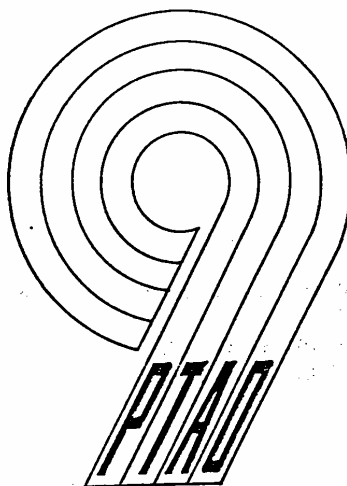
## BIBLIOGRAFIA

- 1) Olafsdottir K, Ryrfeldt Å, Atzori L, Berggren M e Moldèus P *Exp Lung Res* 17: 615-627 (1991)
- 2) Cotgreave I, Weis M, Atzori L e Moldèus P *Glutathione: Metabolism and physiological functions* (Vina J, ed) pp 155-175, CRC Press, Boca Raton, 1990.



ATTI DEL NONO CONVEGNO  
SULLA PATOLOGIA DA TOSSICI  
AMBIENTALI ED OCCUPAZIONALI

12



TORINO , 1 - 2 settembre 1992

1993

Dipartimento di Medicina e Oncologia Sperimentale  
Sezione di Patologia Ambientale  
Università di Torino

**STUDIO SUI MECCANISMI DELLA BRONCOCOSTRIZIONE  
INDOTTA DAL BISSIDO DI ZOLFO**

**Atzori L.\***, Corriga A.M.\*, Bannenberg G.\*, Ryrfeldt Å.\*, Moldæus P.\* e Congiu L.\*

\*Dipartimento di Tossicologia, Sezione Patologia Generale,  
Università degli Studi, Cagliari.

\*Dipartimento di Tossicologia, Karolinska Institute, Stoccolma.

Il biossido di zolfo ( $\text{SO}_2$ ) è immesso nell'atmosfera in particolare dai processi di combustione dei motori delle autovetture e degli impianti di riscaldamento. Questo gas è uno dei maggiori inquinanti ambientali. Uno dei maggiori effetti causati dall'esposizione ad esso è l'induzione della broncocostrizione, in particolare, negli asmatici, atopici e non (1). Recenti indagini hanno dimostrato una stretta correlazione tra i livelli atmosferici di questo gas e l'incidenza di patologie respiratorie, come asma, bronchiti croniche, enfisema e tumori (2,3).

I meccanismi attraverso cui l' $\text{SO}_2$  induce la broncocostrizione devono ancora essere definiti. In certe specie animali un meccanismo colinergico sembra essere responsabile della broncocostrizione indotta da  $\text{SO}_2$  (4). Tuttavia, in altre ricerche è stato dimostrato che un meccanismo non colinergico potrebbe essere coinvolto (5). Anche il rilascio di sostanze autacoidi o l'attivazione del sistema non-adrenergico non-colinergico, potrebbero essere responsabili della broncocostrizione indotta da  $\text{SO}_2$ .

Al fine di chiarire i meccanismi attraverso cui l' $\text{SO}_2$  induce la broncocostrizione abbiamo usato il modello del polmone isolato, ventilato e perfuso. Abbiamo studiato il contributo di un riflesso colinergico e del possibile rilascio di istamina o prodotti dell'acido arachidonico attraverso l'azione della cicloossigenasi. Inoltre, abbiamo verificato l'ipotesi che l'effetto dell' $\text{SO}_2$  possa essere mediato dal rilascio di neuropeptidi. Nel corso della presente indagine è stato studiato anche un possibile effetto locale da parte dell' $\text{SO}_2$  ed il ruolo del calcio extracellulare.

#### **MATERIALI E METODI**

Sono state usate cavie di sesso maschile, del peso di 250-350gr. Gli animali erano anestetizzati con 40mg/Kg di pentobarbital (Mebumal vet., NordVacc, Svezia). I polmoni erano quindi isolati e perfusi come descritto precedentemente (6). Il liquido di perfusione, avente un flusso di 20-30 ml/min, attraversava il polmone in un passaggio singolo, al fine di evitare l'accumulo di metaboliti o sostanze autacoidi che avrebbero potuto complicare l'interpretazione dei risultati. I valori del flusso tracheale e della pressione della camera toracica venivano monitorizzati con dei trasduttori e il loro segnale inviato ad un computer, che eseguiva il calcolo della compliance e della conduttanza (7).

Il polmone era esposto ad una concentrazione costante di  $\text{SO}_2$ , per mezzo di flussometri, attraverso la trachea.

#### **RISULTATI E DISCUSSIONE**

Il meccanismo della broncocostrizione indotta da  $\text{SO}_2$  è stato studiato esponendo il polmone isolato a diversi composti capaci di influenzare la broncocostrizione in associazione all'esposizione al gas. La broncocostrizione può essere mediata sia dalla stimolazione di un riflesso neuronale locale che dal rilascio di sostanze autacoidi. La tecnica del polmone isolato e perfuso comporta il taglio del nervo vago e pertanto un riflesso parasimpatico attraverso il sistema nervoso centrale non può essere invocato. Il

coinvolgimento di alcuni tra i maggiori mediatori responsabili delle modificazioni del tono respiratorio è stato escluso. Infatti, né l'indometacina, un inibitore della cicloossigenasi, né la difenidramina, un antagonista dei recettori  $H_1$ , hanno alcun effetto protettivo sulla broncocostrizione da  $SO_2$  (tab.1).

Tab.I-EFFETTO DI SOSTANZE MODULANTI IL TONO BRONCHIALE SULLA BRONCOCOSTRIZIONE INDOTTA DA  $SO_2$

TRATTAMENTO	COMPLIANCE <sup>§</sup> (%)	CONDUTTANZA <sup>§</sup> (%)
$SO_2$ (250ppm)	70 ± 10	40 ± 5
+ Indometacina(30μM)	70 ± 5	45 ± 10
+ Difenidramina(15μM)	80 ± 4	60 ± 5
+ Atropina(10μM)	85 ± 5	67 ± 15
+ R.R.(10μM)*	95 ± 2*	90 ± 3*
+ Lidocaina(1mg)	92 ± 3*	90 ± 2*
+ $Ca^{2+}$ free medium	99 ± 5*	96 ± 5*

<sup>§</sup>I valori indicano una diminuzione in % rispetto ai controlli esposti solo ad aria (100%).I dati sono medie ± ES.

\*Rosso rutenio.

\*p<0.05

Al contrario un parziale coinvolgimento del sistema colinergico e il rilascio di neuropeptidi dalle terminazioni dei nervi sensoriali sembrerebbe partecipare alla broncocostrizione indotta dall' $SO_2$ . L'intervento del sistema colinergico non sembra essere l'unico meccanismo in quanto un effetto protettivo da parte dell'atropina nei confronti dell' $SO_2$  è osservabile solo parzialmente (Tab.I). La lidocaina, un anestetico locale, inibisce la broncocostrizione indotta dall' $SO_2$ , indicando il coinvolgimento di un arco riflesso neuronale a livello locale (Tab.I).

Al fine di valutare un possibile ruolo dei neuropeptidi rilasciati dai nervi sensoriali, il polmone isolato e perfuso, stato esposto al rosso rutenio prima dell'esposizione all' $SO_2$ . Questo composto blocca i flussi di  $Ca^{2+}$  attraverso le membrane, in particolare quella mitocondriale, e probabilmente con questo meccanismo inibisce la contrazione della muscolatura liscia indotta dalla capsaicina, attraverso il rilascio di neuropeptidi dai nervi sensoriali (8).

Nel nostro modello sperimentale il trattamento con il rosso rutenio risulta capace di proteggere il polmone isolato e perfuso dagli effetti dell' $SO_2$  (Tab.I). Per poter meglio chiarire il ruolo dei neuropeptidi è stato studiato il contenuto del "Calcitonin Gene-Related Peptide" (CGRP) nel liquido di perfusione durante l'esposizione all' $SO_2$ . Il contenuto di questo neuropeptide è risultato aumentato nel perfusato rispetto ai controlli (Tab.II).

Questo neuropeptide è localizzato nelle terminazioni nervose sensibili alla capsaicina ed è rilasciato in risposta allo stimolo delle terminazioni dei nervi sensoriali. In generale, tutti i neuropeptidi rilasciati dai nervi sensoriali vanno incontro ad una rapida inattivazione ad opera di neuropeptidasi. Tra i neuropeptidi, CGRP è uno di quelli con la maggiore emivita e

TAB.II-CONTENUTO DI CGRP DURANTE L'ESPOSIZIONE A SO<sub>2</sub>

Trattamento	CGRP (fmoli/frazione)
Controlli	3.8±1.4
SO <sub>2</sub> (250 ppm)	13.2±1.6*

I valori indicano il contenuto di CGRP nella frazione del liquido di perfusione raccolta 4-6 minuti dopo l'esposizione all'SO<sub>2</sub>.  
I dati sono medie ± ES. \*p<0.002.

per tanto tra i più facilmente dosabili e il suo aumento nel liquido di perfusione può essere perciò considerato come un valido indice di rilascio di neuropeptidi. Ovviamente gli effetti osservati sulla funzionalità respiratoria non sono da attribuirsi a CGRP, ma probabilmente a tachichinine agenti probabilmente sui recettori per le neurochinine di tipo 2.

Poiché il rilascio di neuropeptidi coinvolge la mobilizzazione di Ca<sup>2+</sup>, è stato studiato l'effetto di un liquido di perfusione privo di Ca<sup>2+</sup> sull'esposizione all'SO<sub>2</sub>. In queste condizioni non è stata osservata broncocostrizione e anche i livelli di CGRP risultano simili a quelli dei controlli.

I nervi sensibili all'esposizione alla capsaicina possono essere attivati anche da diminuzioni del pH (8). Poiché cambiamenti del pH possono essere indotti anche dall'SO<sub>2</sub>, è possibile che il gas possa influenzare i canali ionici che sono associati con il cosiddetto "recettore per la capsaicina" tramite modificazioni del pH nel tratto respiratorio.

I soggetti asmatici, ma non i normali, hanno un significativo aumento delle resistenze respiratorie nel corso dell'esposizione ad aerosols acidi (9). Modificazioni della risposta dei nervi sensoriali e dei neuropeptidi da essi rilasciati potrebbero essere importanti nella patogenesi dell'asma.

I dati del nostro studio indicano che la broncocostrizione indotta dall'SO<sub>2</sub> non è mediata dal rilascio di trombassano o

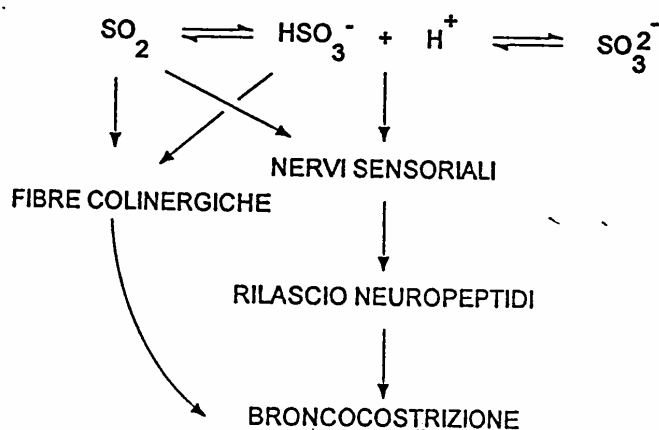


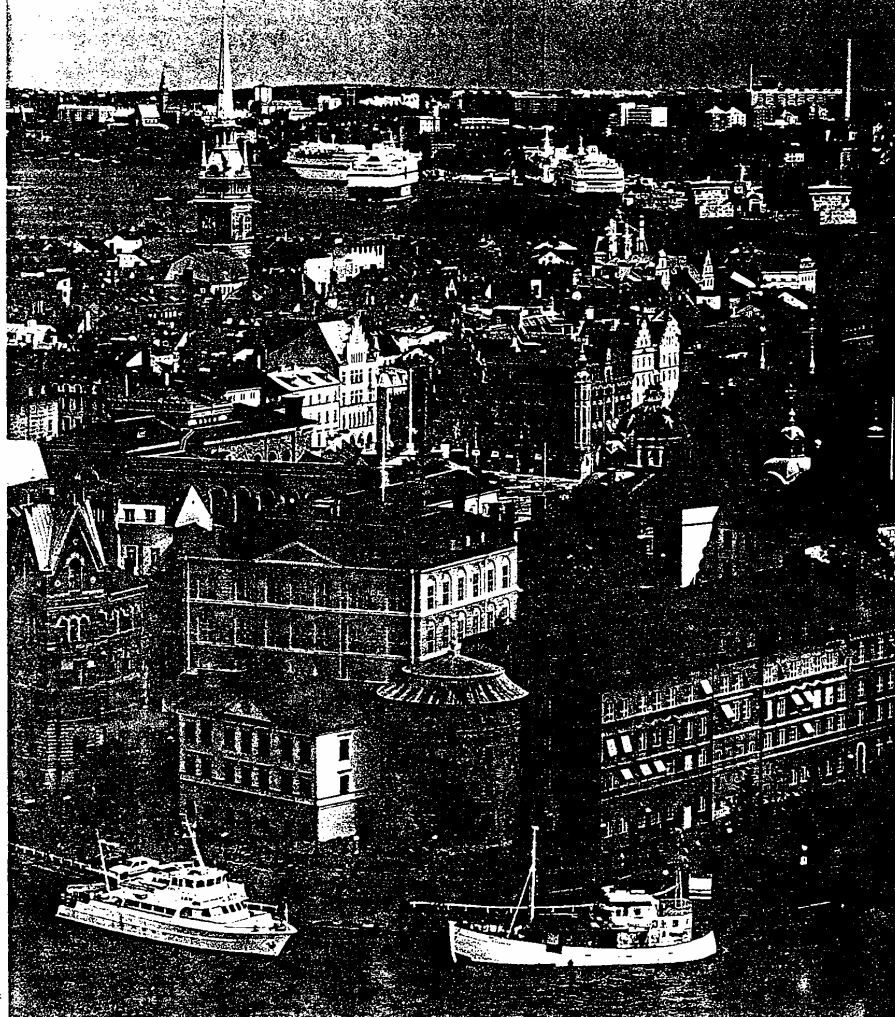
Fig.1.

istamina, nè da un esclusivo meccanismo colinergico. Essa sembra essere il risultato di un effetto locale mediato dal rilascio di neuropeptidi attraverso la mobilizzazione di  $Ca^{2+}$ .  
 Un possibile meccanismo per la broncocostrizione indotta da  $SO_2$  è mostrato nella Fig.1.

- 1) Zweiman B, Slavin RG, Flinberg RJ, Falliers CJ e Aaron TH, J Allergy Clin Immunol 1972; 50: 305-314.
- 2) Koenig JQ, J Allergy Clin Immunol 1987; 79: 833-843.
- 3) Philli-Joet F, Biomed Pharmacotherap 1990; 44:443-446.
- 4) Nadel JA, Salem H, Tamplin B e Tokiwa Y, J Appl Physiol 1965; 20:164-167.
- 5) Snashall PD e Baldwin C, Thorax 1982; 37:118-123.
- 6) Atzori L, Olafsdottir K, Corrigan AM, Bannenberg G, Ryrfeldt A e Moldäus P, J Appl Physiol 1991; 71:1309-1314.
- 7) Waldeck J, En Mätmetod för att undersöka läkemedels effekter på luftvägarna. Thesis, Lund Technical University, Lund, 1987.
- 8) Maggi CA, Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Geppetti P e Meli A. Neurosc Lett 1988; 88:201-205.
- 9) Utekl MJ, Morrow PE e Hyde RW, Ann Occup Hyg 1982; 26:691-697.

# Risk Assessment of Urban Air Emissions, Exposure, Risk Identification and Quantification

13



May 31 - June 3, 1992  
Stockholm, Sweden

Center for Nutrition and Toxicology, (CNT)  
Karolinska Institute  
Novum Research Park

MECHANISMS OF SULFUR DIOXIDE-INDUCED BRONCHOCONSTRICTION IN THE ISOLATED PERFUSED AND VENTILATED GUINEA-PIG LUNG.

Å. Ryrfeldt, L. Atzori, G. Bannenberg, A.M. Corrigan, Y. Low, J. Lundberg and P. Moldeus.  
Department of Clinical Toxicology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

The mechanism of sulfur dioxide-induced bronchoconstriction was studied using isolated perfused and ventilated guinea-pig lungs. They were exposed to sulfur dioxide after pretreatment with different compounds, either via the pulmonary artery or via the air-passages. Neither the cyclo-oxygenase inhibitor indomethacin (30  $\mu$ M) nor the  $H_1$ -receptor antagonist diphenhydramine (15  $\mu$ M), given via the perfusate, attenuated the sulfur dioxide-induced bronchoconstriction. Furthermore, sulfur dioxide exposure did not cause a release of either thromboxane or histamine into the perfusate. A cholinergic mechanism seems unclear since bronchoconstriction was attenuated only in 2 out of 5 experiments by atropine (10  $\mu$ M). Intratracheal instillation of the local anesthetic agent lidocaine (1 mg/50  $\mu$ l) markedly reduced the sulfur dioxide-induced bronchoconstriction. Also, ruthenium red (RR; 10  $\mu$ M), an agent with calcium entry-blocking properties and an inhibitor of capsaicin-induced bronchoconstriction, was able to inhibit the effect of sulfur dioxide. The sulfur dioxide induced bronchoconstriction was associated with release of calitonine gene-related peptide, a sensory neuropeptide. The effect of sulfur dioxide was also inhibited by a  $Ca^{2+}$  free buffer plus EGTA.

These results suggest that sulfur dioxide-induced bronchoconstriction in the guinea-pig lung is the result of a local effect on sensory nerves (C-fiber activation). The mechanism seems to be dependent on the  $Ca^{2+}$  dependent release of sensory neuropeptides and to be linked to opening of the cation channel, which is associated with the proposed capsaicin receptor on sensory nerves as revealed by the inhibitory effect of RR.

## Respiration

Editor: H. Herzog, Basel

## Separatum

Publisher: S. Karger AG, Basel  
Printed in Switzerland

## Original Paper

Respiration 1992;59:16–21

24

L. Atzori  
G. Bannenberg  
A.M. Corrigan  
P. Moldéus  
Å. Ryrfeldt

Department of Toxicology, and Institute of  
Environmental Medicine,  
Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

# Sulfur Dioxide-Induced Bronchoconstriction in the Isolated Perfused and Ventilated Guinea-Pig Lung

## Key Words

Sulfur dioxide  
Sulfite  
Lung mechanics, guinea pig

## Abstract

SO<sub>2</sub> exposure (50–500 ppm) of isolated, perfused and ventilated guinea pig lungs, via the air passages, caused a concentration-related reduction in dynamic compliance and conductance. No changes in pulmonary perfusion flow was noted at any SO<sub>2</sub> concentration. Formed sulfite was detected in lung lavage fluid as well as in the perfusate. Pretreatment of the lungs with a low concentration of SO<sub>2</sub> (10 ppm) for 30 min protected against bronchoconstriction by a high concentration of SO<sub>2</sub> (250 ppm). A similar protective effect was noted by pretreatment with sodium sulfite (3 mM) in the lung perfusate.

## Introduction

During the last decades several studies have addressed the relationship between air pollution and lung diseases in man. A causal association between air pollution and respiratory disorders such as upper respiratory tract infections, chronic bronchitis, bronchial asthma and lung cancer has been found [1–3]. The interest focused on the potential effects of air pollutants on health has led to extensive research in this area.

Sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) is a major air pollutant produced by combustion and processing of sulfur-containing products, particularly in the working environment of factories. SO<sub>2</sub> is also an important constituent of polluted urban air obtained by combustion of diesel fuel.

SO<sub>2</sub> is a moderately irritant gas with strong hydrophilic properties [4, 5]. It is very soluble in the mucosa of the

respiratory tract. SO<sub>2</sub> dissociates to bisulfite and sulfite according to the reaction  $\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{SO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HSO}_3^- \leftrightarrow 2\text{H}^+ + \text{SO}_3^{2-}$  in contact with the moist epithelial surface.

Short-term inhalation of SO<sub>2</sub> has been found to induce bronchoconstriction both in man and animals [6–8]. The asthmatic subject seems to be particularly sensitive to SO<sub>2</sub> exposure and can respond with an acute asthmatic attack [9]. The mechanism behind the SO<sub>2</sub>-induced bronchoconstriction is unclear. Some studies indicate a neuronal reflex mechanism to be involved via vagal efferents [7, 10] while there are also reports suggesting a direct effect of SO<sub>2</sub> and/or sulfite on, e.g., mast cells or other cells of the air passages [11, 12].

In this investigation we studied the acute effects of SO<sub>2</sub> exposure using a perfused and ventilated guinea-pig lung preparation. Moreover, studies were performed to see whether a concentration of SO<sub>2</sub>, known to be without any

Received:  
February 28, 1991  
Accepted after revision:  
October 9, 1991

Å. Ryrfeldt, MD  
Department of Toxicology  
Karolinska Institute  
Box 60400  
S-104 01 Stockholm (Sweden)

©1992 S. Karger AG,  
Basel  
0025-7931/92/0591-0016  
\$ 2.75/0



effect on lung mechanics, could modify the response to a subsequent high concentration of  $\text{SO}_2$ . Mechanistic aspects of  $\text{SO}_2$ -induced bronchoconstriction were also considered.

## Methods

Male guinea pigs of the Dunkin-Hartley strain weighing about 250–350 g were used in this study. The animals were anesthetized with pentobarbital (Mebumal Vet., NordVacc, Sweden) 40 mg/kg body weight. The lungs were then surgically removed as previously described and suspended in an humidified thoracic chamber [13]. The perfusion medium used was a Krebs-Ringer bicarbonate buffer (composition in mM: NaCl 118.0, KCl 4.7,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  24.9,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2) with the addition of 12.5 mM HEPES, 5 mM glucose and 2% bovine serum albumin defatted, fraction V (Boehringer-Mannheim, FRG). These and the other chemicals were of analytical grade and obtained from a local supplier. The buffer level in the reservoir chamber was kept constant (10–15 cm above the lung) throughout the experiments. The buffer pH was kept at 7.35–7.45 by  $\text{CO}_2$  administration and thermostated to 37 °C.

Once put into the thoracic chamber, the lungs were ventilated at 50 breaths/min by creating an alternating negative pressure (–0.1 to 1.1 KPa) inside the thoracic chamber using a Harvard animal respirator (Model 680, Harvard Apparatus, USA).

The tracheal airflow was measured with a heated Fleisch pneumotachograph type 000 (A. Fleisch, Switzerland) and a pressure sensor (164pc, Honeywell, USA). The thoracic pressure changes were monitored with a pressure sensor (174pc, Honeywell, USA). The signals were transformed and amplified via a Coulbourn Labline Interface system (Coulbourn Instruments, USA) and recorded directly on a computer where calculation of lung conductance (Gaw) and dynamic compliance (Cdyn) were performed [14, 15]. The perfusion flow was measured with a flowmeter (Promedico AB, Sweden), as well as manually, and recorded with time.

The test atmosphere ( $\text{SO}_2$  in air) was generated by delivering a known flow rate of gas from cylinders containing 50 or 500 ppm of  $\text{SO}_2$  (AGA AB, Sweden). The  $\text{SO}_2$  was then diluted by additional air entering a glass mixing chamber. All flows were continuously monitored with flow meters (Brooks Instrument B.V., Holland). A schematic drawing of the experimental set up is shown in figure 1. Before the lungs were exposed to  $\text{SO}_2$ , they were ventilated with air.

The lung preparation was allowed to stabilize for 30 min. After that the lungs were perfused for 20 min with a Krebs-Ringer buffer without albumin, before administration of the test compounds. Most of the lung preparations showed bronchoconstriction from the very beginning and, in many cases, it was not possible to use the preparations. Because of this, salbutamol (50 nM in perfusate), a  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulating agent, was used to obtain workable and stable preparations.

Sulfite-treated lungs were perfused with 3 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , dissolved in the buffer, for 15 min before and during the exposure to  $\text{SO}_2$ .

After exposing the lung to 250 ppm of  $\text{SO}_2$ , sulfite was measured in the perfusate after derivatization with monobromobimane as described by Cotgreave and Moldéus [16]. Sulfite was measured as well in the bronchoalveolar lavage of lungs exposed to 250 ppm  $\text{SO}_2$ . The lung perfusion buffer was used as the lavage fluid. Lavage volumes of

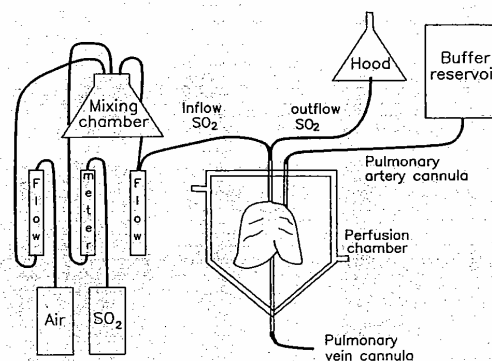


Fig. 1. Schematic drawing of the isolated perfused and ventilated lung setup.

twice 7 ml were instilled in each lung and withdrawn through a syringe connected to the trachea. Net recovery of wash volume was  $62 \pm 10\%$  (mean  $\pm$  SEM).

## Results

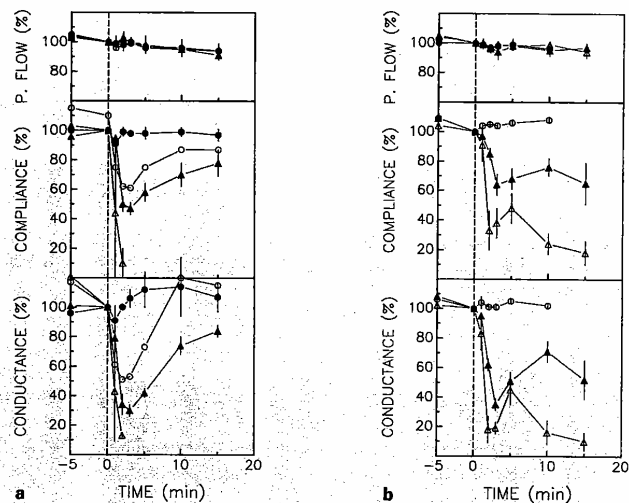
Most of our lung preparations (about 3 of 4), were in a bronchoconstricted condition when put into the perfusion chamber. Such contracted lungs could not be used for perfusion experiments. In order to improve the number of lung preparations which could be used, we started to perfuse the lung preparations with buffer containing salbutamol (50 nM). The salbutamol treatment led to that almost all preparations could be used.

Lungs perfused with salbutamol present in the perfusate showed improvement in Gaw and Cdyn values compared with control lungs (lungs perfused without salbutamol but showing Gaw and Cdyn values acceptable to be used for subsequent  $\text{SO}_2$  exposure). However, perfusion flow and tidal volume were not affected (table 1).

### Effects of $\text{SO}_2$ in Control and Salbutamol-Treated Guinea Pig Lungs

In order to evaluate the acute effects of  $\text{SO}_2$  on lung functions, isolated and perfused lungs were exposed to various concentrations of  $\text{SO}_2$  in the inhaled air.  $\text{SO}_2$  exposure produced a concentration-related reduction in Cdyn and Gaw (fig. 2), both in lungs perfused with or without salbutamol present in the perfusate. The lungs perfused

**Fig. 2.** Effects of SO<sub>2</sub> exposure on perfusion flow and lung mechanics in the isolated perfused and ventilated guinea-pig lung in the absence (a) or presence (b) of 50 mM salbutamol. SO<sub>2</sub> concentrations in ppm: 50 (●), 100 (○), 250 (▲), 500 (△). Values are means ± SEM (n = 2–8).



without salbutamol were more sensitive to SO<sub>2</sub> exposure, responding with more pronounced bronchoconstriction. No effects were seen on perfusion flow even without the presence of salbutamol.

In lungs perfused without the presence of salbutamol, 100 ppm of SO<sub>2</sub> induced a significant reduction in Cdyn and Gaw during the first 5 min. The bronchoconstriction was more pronounced at 250 ppm SO<sub>2</sub>. After the initial contraction, the lungs recovered to an almost normal breathing pattern after 15 min of SO<sub>2</sub> exposure. Exposure of the lungs to 500 ppm SO<sub>2</sub> caused immediate collapse. Lungs treated with salbutamol showed no or marginal effects on Cdyn and Gaw when exposed to 100 ppm SO<sub>2</sub> (fig. 2b). Exposure to 250 ppm SO<sub>2</sub> induced a transitory reduction in Cdyn and Gaw with partial recovery. 500 ppm SO<sub>2</sub> caused a pronounced reduction in breathing with a partial recovery, but after 15 min of SO<sub>2</sub> exposure the lungs collapsed. Thus salbutamol treatment reduced the response to SO<sub>2</sub> but similar effect profiles were obtained as without the drug.

#### *Pretreatment with a Low SO<sub>2</sub> Concentration*

Experiments were performed to investigate whether pretreatment of the isolated lungs with a low concentration of SO<sub>2</sub> could modify the response to a subsequent high concentration of SO<sub>2</sub>. After exposing the lungs during 30 min to 10 ppm of SO<sub>2</sub>, a concentration which will not induce any bronchoconstriction, the SO<sub>2</sub> concentration

**Table 1.** Lung tidal volume (TV), conductance (Gaw), compliance (Cdyn), and perfusion flow (PF) baseline values in isolated guinea-pig lung perfused with and without salbutamol (mean ± SEM)

	TV ml	Gaw ml/s/kPa	Cdyn ml/kPa	PF ml/min
Without salbutamol	1.44	38.41	1.59	24.18
±	±	±	±	±
(n = 14)	0.12	4.95	0.12	1.28
With salbutamol	1.57	64.79	2.45	23.89
±	±	±	±	±
(n = 35)	0.07	3.11	0.10	0.80

The number of experiments is given in parantheses.

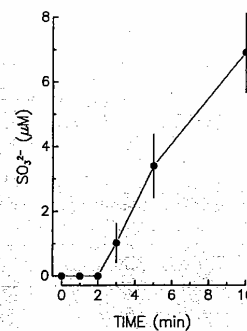
was increased to 250 ppm. As shown in figure 3 the preexposure of the lung to a low concentration of SO<sub>2</sub> dramatically reduced the effect of the high concentration of SO<sub>2</sub> on Cdyn and Gaw.

#### *SO<sub>2</sub>-Induced Sulfite Release*

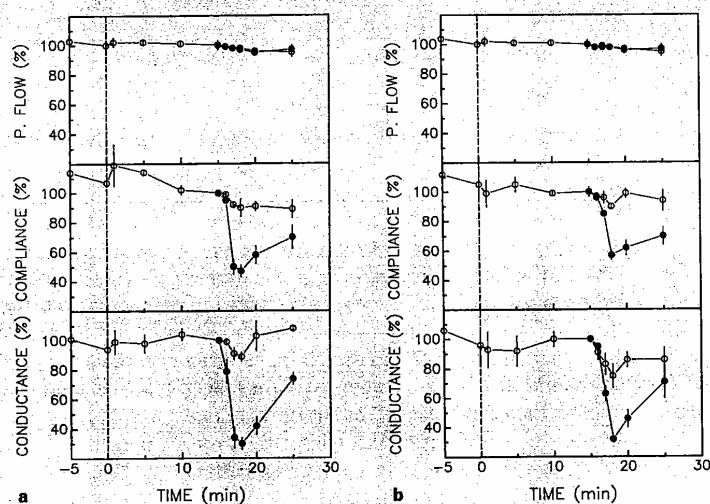
SO<sub>2</sub> in the presence of water is rapidly converted to sulfurous acid and then to sulfite. When the isolated and perfused lung was exposed to 250 ppm SO<sub>2</sub>, the effluent buffer was collected and the sulfite concentration mea-



**Fig. 3.** Effects of 250 ppm SO<sub>2</sub> on conductance (G<sub>aw</sub>) and compliance (C<sub>dyn</sub>) with (■) and without (▨) pretreatment with 10 ppm SO<sub>2</sub> for 30 min. Values represent percent change (reduction in breathing) from the baseline values. Values are means ± SEM (n = 4-6).



**Fig. 4.** Concentration of sulfite in the buffer effluent during exposure to 250 ppm SO<sub>2</sub>, studied in the isolated and perfused guinea-pig lung. Values are means ± SEM (n = 5).



**Fig. 5.** Effect of 3 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> treatment on 250 ppm SO<sub>2</sub> exposure in the isolated perfused and ventilated guinea-pig lung in the absence (a) or presence (b) of 50 mM salbutamol. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> was present in the perfusate 15 min prior to and during the exposure to SO<sub>2</sub> (10 min). SO<sub>2</sub> with (○) and without (●) Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Values are means ± SEM (n = 3-8).

sured. As shown in figure 4, sulfite could not be measured in the perfusate during the first minutes after start of SO<sub>2</sub> exposure. Then after 3 min of SO<sub>2</sub> exposure it was possible to detect sulfite. Thereafter, the concentration of sulfite increased in the perfusate with exposure time. In the lavage fluid an amount of  $0.22 \pm 0.03$  μmol (mean ± SEM) sulfite was measured. Values are corrected for recovery.

#### Modulating Effect of Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> Treatment on SO<sub>2</sub>-Induced Bronchoconstriction

Treatment of isolated lungs with sodium sulfite (3 mM) 15 min before and during exposure to 250 ppm SO<sub>2</sub> protected the lungs against bronchoconstriction (fig. 5). Only a marginal protective effect was noted with 1 mM sodium sulfite (data not shown).

## Discussion

The results of our study show that the isolated and perfused guinea-pig lung can be a suitable model to study the toxic effects of SO<sub>2</sub>. The guinea-pig lung was chosen since it proved to be sensitive to inhalation of SO<sub>2</sub>. Some experiments were also performed with lungs obtained from rats. However, the rat lung was shown to be very resistant to SO<sub>2</sub> exposure. Even inhalation of 500 ppm SO<sub>2</sub> did not induce any significant bronchoconstriction. The drawback with the guinea pig lung preparation was that it easily became constricted during the surgical procedure. Even considerable rinsing of the pulmonary circulation with buffer to eliminate released spasmogens did not mitigate the bronchoconstriction. To overcome this problem we used a low concentration of a  $\beta$ -adrenoceptor-stimulating agent in the perfusate. Although there was a slight reduction in sensitivity to SO<sub>2</sub> with salbutamol, similar response profiles (reduction in Gaw and Cdyn) were obtained as without salbutamol. We showed that SO<sub>2</sub> exposure caused a concentration-related reduction in Gaw and Cdyn both with and without salbutamol present in the perfusate. This shows that both central and peripheral parts of the lungs were affected. No effects on perfusion flow was noted at any SO<sub>2</sub> concentration studied. Although, from a qualitative point of view, similar effect profiles to SO<sub>2</sub> exposure were obtained with and without salbutamol, it cannot be totally excluded that perfusion with a  $\beta$ -adrenoceptor-stimulating agent can modify the reactivity of the lung preparation in some other way than just the noted reduction in sensitivity to SO<sub>2</sub> exposure. However, in our opinion, this would not influence the outcome of our experiments in any major way.

The mechanism behind the SO<sub>2</sub>-induced bronchoconstriction is at present unknown. When the SO<sub>2</sub> gas reaches the lung lining fluid it reacts with water to form HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> and H<sup>+</sup>. It is then conceivable that any of these molecular species including SO<sub>2</sub> itself can trigger the bronchoconstriction via stimulation of receptors (e.g. irritant receptors, C-fiber receptors or others) of the airways.

SO<sub>2</sub> does not seem to cause bronchoconstriction merely as a result of pH modification in the respiratory tract [17] or in the vascular bed (range pH 6.8–8.0; unpublished results).

There are several studies suggesting a neuronal reflex mechanism to be involved via the vagus nerve for the SO<sub>2</sub>-induced bronchoconstriction since atropine, an anticholinergic agent, seems at least in some cases to exert a protective effect [7]. However, it should be pointed out that in our experimental model the vagus nerve is cut. Therefore

a neuronal reflex pathway via CNS cannot be involved in this case. The bronchoconstriction noted in our model may be due to stimulation of some local neuronal reflex arch or a direct effect of SO<sub>2</sub> or its formed products on certain cells leading to release of bronchoactive agents.

An interesting finding in our experiments was that despite constant exposure to SO<sub>2</sub> the bronchoconstriction was transitory in nature, reaching a maximal response within a few minutes of commencing SO<sub>2</sub> exposure and then gradually subsiding. This effect was particularly evident at 100 and 250 ppm. There are some reports indicating tachyphylaxis to SO<sub>2</sub> exposure [11, 18]. The transient effect noted in our studies might be due to the formation of some metabolite and/or release of some mediator by SO<sub>2</sub>. This hypothesis may be supported by the fact that exposing the lungs for 30 min to a low concentration of SO<sub>2</sub> protected against a subsequent high concentration of SO<sub>2</sub>. One compound which is formed when SO<sub>2</sub> is dissolved in water is sulfite (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). We showed that sulfite was present in the lung lavage as well as in the perfusate. At the end of the SO<sub>2</sub> exposure (250 ppm), the sulfite concentration in the lung epithelial lining fluid can be in the millimolar-range (about 2 mM), calculating the lung epithelial lining fluid volume to be about 0.10 ml for a guinea-pig lung. The calculation of the lung epithelial lining fluid volume is based upon the assumption that the thickness of the surface lining layer of the alveoli is approximately 0.1  $\mu$ m [19] and the alveolar surface area is about 1 m<sup>2</sup> [20]. This shows that considerable local sulfite concentrations can be built up during SO<sub>2</sub> exposure. We found also that when we treated the lungs with sodium sulfite via the pulmonary circulation, SO<sub>2</sub> exposure did not induce any bronchoconstriction. This shows clearly that sulfite in some way protected the lung against SO<sub>2</sub>-induced bronchoconstriction in our lung model. Sulfite is a strongly nucleophilic substance highly specific for attack on the disulfide bond of proteins, which can be membrane proteins, including many receptors, mediating critical cell functions [21, 22].

Work is in progress to elucidate further the mechanism behind the SO<sub>2</sub> induced bronchoconstriction as well as the protective effect of sulfite.

## References

- 1 Zweiman B, Slavin RG, Flinberg RJ, Falliers CJ, Aaron TH: Effects of air pollution on asthma: A review. *J Allergy Clin Immunol* 1972;50:305-314.
- 2 Shy CM, Goldsmith JR, Hackney JD: *Health Effects of Air Pollution*. New York, American Lung Association, 1978.
- 3 Dodge R, Solomon P, Moyers J, Hayer C: A longitudinal study of children exposed to sulfur oxides. *Am J Epidemiol* 1985;121:720-736.
- 4 Petering DH, Ting Shih N: Biochemistry of bisulfite-sulfur dioxide. *Environ Res* 1975;9:55-65.
- 5 Charan NB, Myers GC, Lakshminaryan S, Spencer IM: Pulmonary injury associated with acute sulfur dioxide inhalation. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:555-559.
- 6 Frank WR, Amdur MO, Worcester J, Whittenberger JL: Effects of acute controlled exposure to SO<sub>2</sub> on respiratory mechanics in healthy male adults. *J Appl Physiol* 1962;17:252-258.
- 7 Nadel JA, Salem H, Tamplin B, Tokiwa Y: Mechanism of bronchoconstriction during inhalation of sulfur dioxide. *J Appl Physiol* 1965;20:164-167.
- 8 Shore SA, Kariya ST, Anderson K, Skornik W, Feldman HA, Pennington J, Godleski J, Drazen JM: Sulfur-dioxide induced bronchitis in dogs. Effects on airways responsiveness to inhaled and intravenously administered methacholine. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:840-847.
- 9 Balmes JR, Fine JM, Sheppard D: Symptomatic bronchoconstriction after short-term inhalation of sulfur dioxide. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1117-1121.
- 10 Widdicombe JG: Reflex control of airways smooth muscle. *Postgraduate Med J* 1975;51(suppl 7):36-43.
- 11 Snashall PD, Baldwin C: Mechanisms of sulfur dioxide induced bronchoconstriction in normal and asthmatic man. *Thorax* 1982;37:118-123.
- 12 Tan WC, Cripps E, Douglas N, Sudlow MF: Protective effect of drugs on bronchoconstriction induced by sulfur dioxide. *Thorax* 1982;37:671-676.
- 13 Ryrfeldt Å, Kröll F, Berggren M, Moldéus P: Hydroperoxide and cigarette smoke induced effects on lung mechanics and glutathione status in rat isolated perfused and ventilated lungs. *Life Sci* 1988;42:1439-1445.
- 14 Amdur MO, Mead J: Mechanics of respiration in unanesthetized guinea-pigs. *Am J Physiol* 1958;192:364-368.
- 15 Waldeck J: En mätmetod för att undersöka läkemedels effekter på luftvägarna; thesis Lunds Technical University, Lund 1987.
- 16 Cotgreave IA, Moldéus P: Methodologies for the application of monobromobimane to the simultaneous analysis of soluble and protein thiol components of biological systems. *J Biochem Biophys Methods* 1986;13:231-249.
- 17 Fine JM, Gordon T, Sheppard D: The roles of pH and ionic species in sulfur dioxide and sulfite induced bronchoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1122-1126.
- 18 Frank NR, Amdur MO, Whittenberger JL: A comparison of the acute effects of SO<sub>2</sub> administered alone or in combination with NaCl particles on the respiratory mechanics of healthy adults. *J Air Water Pollut* 1964;8:125-133.
- 19 Peterson BT, Idell S, Macarthur C, Gray LD, Cohen AB: A modified bronchoalveolar lavage procedure that allows measurement of lung epithelial lining fluid volume. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:314-320.
- 20 Gehr P, Crapo JD: Morphometric analysis of the gas exchange region of the lung; in Gardner RM, Crapo JD, Massaro D (eds): *Toxicology of the Lung*. New York, Raven Press, 1988, pp 1-42.
- 21 Gunnison AF: Sulphite toxicity: A critical review of in vitro and in vivo data. *Food Cosmet Toxicol* 1981;19:667-682.
- 22 Steinacker A: A suggested mechanism of action for sulfite sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1986;77:116-117.

15

## Vasoconstriction and bronchoconstriction induced by 2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone, an endoplasmic reticular $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor, in isolated and perfused rat lung

L. Atzori, G. Bannenberg, A. M. Corrigan, Å. Ryrfeldt and P. Moldeus<sup>1</sup>

Department of Toxicology and Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Box 60400, S-104 01, Stockholm, Sweden

### Abstract

The microsomal  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (tBuBHQ) induced bronchoconstriction and vasoconstriction in the isolated perfused and ventilated rat lung. These effects were accompanied by increased levels of thromboxane and prostacyclin in the effluent perfusate. The effect of tBuBHQ was inhibited by L-655,240, a thromboxane receptor antagonist, indicating thromboxane- $\text{A}_2$ -mediated bronchoconstriction and vasoconstriction. Accordingly, the cyclooxygenase inhibitor indomethacin largely blocked the effects of tBuBHQ. The involvement of a phospholipase in the generation of thromboxane  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) was supported by dibucaine protection on tBuBHQ effects. The results from this study indicate that tBuBHQ, probably by inhibiting the microsomal  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, can trigger the arachidonic acid cascade leading to the formation of  $\text{TXA}_2$ , which in turn causes bronchoconstriction and vasoconstriction in rat lung.

### Introduction

The stimulated release of a variety of vasoactive and bronchoactive substances or their impaired metabolism has been recognized as a pulmonary response to acute lung injury [1, 2]. Thromboxane, leukotrienes and platelet-activating factor are now viewed upon as likely ultimate mediators of the pulmonary vasoconstriction and bronchoconstriction associated with several experimental models of acute lung injury [3–6]. However, the initial events that trigger the chain of reactions leading to the altered formation of these mediators have remained largely unknown.

Excessive formation of certain eicosanoids, such as  $\text{TXA}_2$  and leukotrienes, has been shown to alter pulmonary vascular tone, breathing and vascular permeability [7–10]. Their precursor, arachidonic acid, is released from lipid stores by phospholipases upon an appropriate stimulus [11, 12]. Triggering of the arachidonic acid cascade by a rise in the cytosolic calcium concentration has been shown to follow agonist-induced stimulation of a variety of cell types and reflects the enhanced activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipases [13]. Rises in cytosolic calcium can occur through release from intracellular storage pools and by influx of extracellular calcium into the cell [14].

2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (tBuBHQ) has been shown to be a potent and selective in-

<sup>1</sup> Author for correspondence.

hibitor of microsomal calcium-sequestration by exerting a direct effect on the endoplasmic reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase [15]. In isolated rat hepatocytes tBuBHQ specifically inhibits the ATP-dependent sequestration of  $\text{Ca}^{2+}$  into the endoplasmic reticulum and releases  $\text{Ca}^{2+}$  from this pool, resulting in elevated cytosolic calcium concentrations [16, 17]. In the perfused rat liver tBuBHQ infusion was shown to mobilize calcium and alter calcium-dependent permeability of tight junctions to infused horseradish peroxidase [18]. To assess the importance of intracellularly stored calcium in the generation of vasoconstriction and bronchoconstriction we studied the effects of the endoplasmic reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor tBuBHQ in the isolated and perfused rat lung.

#### Materials and methods

Bovine serum albumin (fraction V) (BSA) and ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)- $N,N,N',N'$ -tetraacetic acid (EGTA) were from Boehringer Mannheim GmbH, Germany. tBuBHQ was from EGA-Chemie, Steinheim/Albuch, Germany. Dibucaine and indomethacin were from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. Hydrogen peroxide was from Riedel-deHaen AG, Seelze, Germany. L-655,240 was provided by Dr. Ford-Hutchinson, Merck-Frosst Canada Inc., Canada. All the other chemicals were of analytical grade and were obtained from local commercial sources.

#### Preparation of perfused rat lungs

On the day of experiment, rats (190–370 g) were anesthetized with pentobarbital sodium (Mebumal Vet., Nord Vacc, Sweden; 40 mg/kg injected intraperitoneally). The chest was opened, the superior caval vein cut and about 500 U of heparin was injected into the right ventricle of the heart. The pulmonary artery was cannulated via an incision in the right ventricle. An outlet cannula was secured in the left atrial appendage via an incision in the apex of the heart. Tracheostomy was performed and the lung and heart excised and suspended in a well-humidified artificial thoracic chamber. The method has been described previously in detail [19]. The lungs were ventilated at a rate of 80 breaths/min by an alternating negative pressure (–0.1 to –0.8 kPa) inside the thoracic chamber. This was

created by a vacuum source and an animal respirator (model 680, Harvard apparatus, USA). The pressure inside the chamber was monitored with a water manometer and a pressure sensor (174 pc, Honeywell, USA). The tracheal airflow was measured with a heated Fleisch pneumotachograph, type 0000 (A. Fleisch, Switzerland) and a pressure sensor (164 pc, Honeywell, USA). The signals were transformed and amplified via a Coulbourn lab-linc interface system (Coulbourn Instruments, USA) or recorded directly on a computer, where calculations of lung conductance ( $G_{aw}$ ) and dynamic compliance ( $C_{dyn}$ ) were performed [20, 21]. The lungs were perfused at a constant hydrostatic pressure with Krebs–Ringer buffer pH 7.4 (composition in mM: NaCl, 118.0; KCl, 4.7;  $\text{CaCl}_2$ , 2.5;  $\text{MgSO}_4$ , 1.2;  $\text{NaHCO}_3$ , 24.9;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2) with the addition of 5 mM glucose, 12.5 mM Hepes and 2% BSA. The basal perfusion flow was 15–20 ml/min and was measured manually. The pH of the perfusion buffer was maintained between 7.35 and 7.45 by bubbling  $\text{CO}_2$  (g) into the buffer as needed. The buffer reservoir and the thoracic chamber were jacketed and warmed with circulating water kept at 37 °C.

#### Experimental protocols

The lungs were allowed to stabilize for 30 min before the experiments were started. To rinse the vascular system of the lungs from circulating cells and released autocooids the perfusate of the first 10 min was discarded. Then the lungs were perfused for another 20 min using a recirculating system. Due to the binding of our agents we had to use a perfusion medium without albumin. The lungs were allowed to equilibrate for 10 min in Krebs–Ringer buffer without BSA before the administration of the test compound. Only lungs with stable baseline values for perfusion flow,  $C_{dyn}$  and  $G_{aw}$ , were used. Baseline values for  $C_{dyn}$  and  $G_{aw}$  were  $2.70 \pm 0.43$  ml/kPa and  $83 \pm 13$  ml/s/kPa ( $n=20$ , mean  $\pm$  SD), respectively. The perfusate was recirculated until perfusion of the lung with tBuBHQ was started and single-passage perfusion was performed. During all the experiments the lung was monitored for changes in perfusion flow,  $C_{dyn}$  and  $G_{aw}$ . An augmented breath (lowering of the chamber pressure to approximately –1 kPa during one inspiration) was used to maintain a stable lung function.

### Analytical procedures

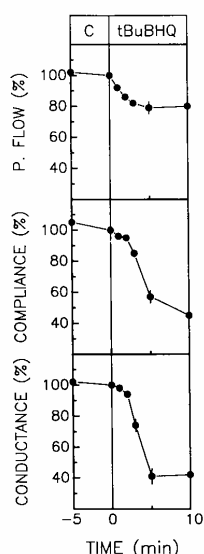
Thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), the stable hydrolysis product of TXA<sub>2</sub>, and 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, the stable hydrolysis product of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), were measured by radioimmunoassay, RIA kit, NEN Research Products, Du Pont, Dreieich, Germany.

### Results

Infusion of tBuBHQ (10 μM) via the pulmonary artery to the perfused and ventilated rat lung induced vasoconstriction and bronchoconstriction, as measured by a decrease in perfusion flow, compliance and conductance (Fig. 1). After 5 min of exposure to tBuBHQ a 20% decrease in the perfusion flow was noted. A more pronounced decrease in compliance and conductance was observed (Fig. 1).

In parallel with these functional effects tBuBHQ also stimulated the production of TXA<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> as measured by the increased content of TXB<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> in the effluent perfusate (Table 1).

As Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipase may catalyze



**Figure 1**  
Effect of tBuBHQ (10 μM) on perfusion flow and lung mechanics in the perfused rat lung. Values are means ± SEM, n = 5.

**Table 1**  
tBuBHQ-induced TXB<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> formation in perfused rat lung.

	TXB <sub>2</sub> (pg/ml)	6-keto-PGF <sub>1α</sub> (ng/ml)
control (9)	3 ± 5	0.274 ± 0.094
tBuBHQ (3) (10 μM)	784 ± 221*	1.670 ± 0.994*
dibucaine (100 μM) + tBuBHQ (4) (10 μM)	> 1	0.121 ± 0.106**

The perfusate levels of TXB<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> were measured after 5 and 10 minutes of tBuBHQ infusion. tBuBHQ vs. control: \* p < 0.005; dibucaine + tBuBHQ vs. tBuBHQ and dibucaine + tBuBHQ vs. control: \*\* p < 0.05. Values are means ± SEM.

the release of arachidonic acid, which can be subsequently metabolized to TXA<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub>, dibucaine, a phospholipase inhibitor [22], was used to assess the involvement of phospholipases in the formation of bronchoactive and vasoactive eicosanoids. The lung was perfused for 20 min with dibucaine (100 μM) prior to infusion of tBuBHQ in the presence of dibucaine. Dibucaine significantly reduced the effects of subsequent infusion of tBuBHQ on compliance and conductance and almost completely attenuated the effect on the flow (Fig. 2). No increase in TXB<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> was observed during these conditions (Table 1).

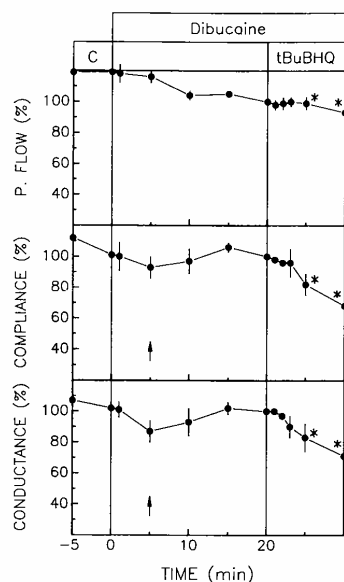
To inhibit the formation of prostanoids the lung was perfused for 20 min with the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (30 μM) before tBuBHQ in the presence of indomethacin. Indomethacin largely blocked the effect of tBuBHQ on compliance and conductance and delayed the effect on the perfusion flow (Fig. 3).

To establish whether TXA<sub>2</sub> was responsible for the bronchoconstricting and vasoconstricting effects of tBuBHQ the lung was perfused for 20 min with the TXA<sub>2</sub> receptor antagonist L-655,240 (2 μM) and, subsequently, with tBuBHQ. The pretreatment with L-655,240 markedly reduced the bronchoconstricting and vasoconstricting effects of tBuBHQ (Fig. 4).

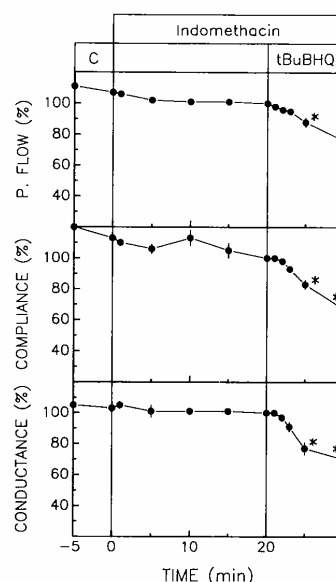
### Discussion

The major observation of this study is that the endoplasmic reticular Ca<sup>2+</sup>-ATPase-inhibiting





**Figure 2**  
Effect of dibucaine (100  $\mu$ M) on the tBuBHQ response in the isolated perfused rat lung. Infusion regiments are indicated in the figure. An augmented breath (↑) was induced at the indicated point. Asterisk indicates a significant difference ( $*p < 0.05$ ) from tBuBHQ alone (see Fig. 1). Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 5$ .



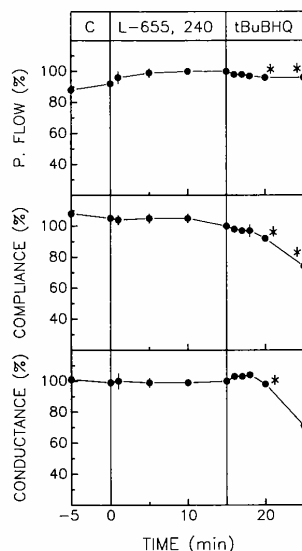
**Figure 3**  
Effect of indomethacin (30  $\mu$ M) on the tBuBHQ response in the isolated perfused rat lung. Infusion regiments are indicated in the figure. Asterisk indicates a significant difference ( $*p < 0.05$ ) from tBuBHQ alone (see Fig. 1). Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 4$ .

agent tBuBHQ causes pulmonary bronchoconstriction and vasoconstriction, presumably through an increased formation of  $TXA_2$ .  $TXA_2$  can cause smooth muscle contraction via interaction with  $TXA_2$ -receptors on smooth muscle cells [23]. The central role of  $TXA_2$  during tBuBHQ-induced vasoconstriction and bronchoconstriction is clearly demonstrated by the complete abolishment of the vasoconstriction and strong delay of bronchoconstriction by the  $TXA_2$ -receptor antagonist L-655,240.

The generation of  $PGI_2$  indicates that other eicosanoids may have been formed as well, although the final effects appear to be dominated by  $TXA_2$ . Accordingly, the cyclooxygenase inhibitor indomethacin attenuated the effects of tBuBHQ. It has been shown previously that both indomethacin and L-655,240 inhibit the formation and effect, respectively, of  $TXA_2$  in the isolated perfused and

ventilated rat lungs. Indomethacin inhibits the cyclooxygenase pathway [24, 25] whereas L-655,240 interacts at the thromboxane receptor level [26]. A shifting of the arachidonic acid metabolism to other pathways might explain why only a smaller part of the effects by tBuBHQ is inhibited by indomethacin.

The inhibition of the endoplasmic reticular  $Ca^{2+}$ -ATPase generally results in an increase of cytosolic free  $Ca^{2+}$ . This would trigger the arachidonic acid cascade by stimulating a calcium-dependent phospholipase. The involvement of a phospholipase in the generation of  $TXA_2$  is supported by the inhibitory effect of dibucaine on the bronchoconstricting and vasoconstricting effects of tBuBHQ. Most likely, the phospholipase responsible for the release of arachidonic acid is phospholipase  $A_2$ , which can directly deacylate arachidonic acid from membrane phospholipids and can be



**Figure 4**  
Effect of L-655,240 (2  $\mu$ M) on the tBuBHQ response in the isolated perfused rat lung. Infusion regiments are indicated in the figure. Asterisk indicates a significant difference (\* $p < 0.05$ ) from tBuBHQ alone (see Fig. 1). Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 4$ .

stimulated by rises in cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  [13]. The free arachidonic acid can then be metabolized to various eicosanoids.

A limitation of the study clearly resides in the inability to directly measure the inhibition of the endoplasmic reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by tBuBHQ in this experimental model. Nevertheless, the potent bronchoconstricting and vasoconstricting effect of tBuBHQ is apparently due to its ability to trigger the arachidonic acid cascade, and the knowledge that triggering of the arachidonic acid cascade can be calcium-dependent suggests that also in the perfused lung this hydroquinone exerts its effect on intracellular calcium homeostasis. Another limitation is that the effect of tBuBHQ on calcium homeostasis is unlikely to be limited to one single cell type in the lung. Even though the endothelium and macrophages presumably represent the initial targets in which tBuBHQ exerts its effect, subsequent diffusion of tBuBHQ into other cell types may certainly have occurred. For example, a direct

action of tBuBHQ on vascular and bronchial smooth muscle and alveolar contracting cells (viz. smooth muscle and myofibroblasts) may explain why none of the inhibitors used in this study completely abolished, but only merely delayed, the occurrence of bronchoconstriction and vasoconstriction due to tBuBHQ. Smooth muscle cells contract after the release of sarcoplasmic reticular calcium upon stimulation by an agonist [27]. Whether tBuBHQ has direct effects on calcium sequestration in contractile cells has as yet not been investigated.

In conclusion, this study demonstrates that infusion of the endoplasmic reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-inhibiting agent tBuBHQ triggers the arachidonic acid cascade leading to  $\text{TXA}_2$ -mediated bronchoconstriction and vasoconstriction in rat lung.

#### Acknowledgements

This study was supported by the Swedish Medical Research Council, the Swedish National Environmental Protection Board and funds from the Karolinska Institute.

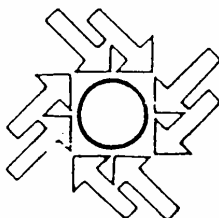
Received 30 March 1991; accepted by W. Lorenz, 16 October 1991

#### References

- [1] P. J. Barnes, K. F. Chung and C. P. Page, *Inflammatory mediators and asthma*. Pharmacol. Rev. 40, 49–84 (1988).
- [2] S. I. Said and H. D. Foda, *Pharmacological modulation of lung injury*. Am. Rev. Respir. Dis. 139, 1553–1564 (1989).
- [3] R. H. Demling, *Role of prostaglandins in acute pulmonary microvascular injury*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 384, 517–534 (1982).
- [4] W. D. Watkins, P. C. Huttemeier, D. Kong and M. B. Peterson, *Thromboxane and pulmonary hypertension following E. coli endotoxin infusion in sheep: Effect of an imidazole derivative*. Prostaglandins 23, 273–285 (1982).
- [5] B. Samuelsson, *Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation*. Science 220, 568–576 (1983).
- [6] D. F. Rogers, S. Dijk and P. J. Barnes, *Bradykinin-induced plasma exudation in guinea-pig airways: Involvement of platelet activating factor*. Br. J. Pharmacol. 101, 739–735 (1990).
- [7] J. Fröllich, M. Ogletree and K. Brigham, *Gram-negative endotoxemia in sheep: Pulmonary hypertension correlated to pulmonary thromboxane synthesis*. Adv. Prostaglandin Thromboxane Res. 7, 745 (1980).
- [8] G. H. Gurtner, A. Knoblauch, P. L. Smith, H. Sies and N. F. Adkinson, *Oxidant- and lipid-induced pulmonary vasoconstriction mediated by arachidonic acid metabolites*. J. Appl. Physiol. 55, 949–954 (1983).
- [9] I. S. Farrukh, A. M. Sciuto, E. Spannake, G. H. Gurtner and J. R. Michael, *Leukotriene  $D_2$  increases pulmonary vascular permeability and pressure by different mechanisms in the rabbit*. Am. Rev. Respir. Dis. 134, 229–232 (1986).

- [10] K. Olafsdottir, L. Atzori, Å. Ryrfeldt, M. Berggren, M. Kumlin and P. Moldéus, *Mechanisms of hydroperoxide-induced broncho- and vasoconstriction in isolated and perfused rat lung*. Pharmacol. Toxicol. 68, 181–186 (1991).
- [11] R. J. Flower and G. J. Blackwell, *The importance of phospholipase-A<sub>2</sub> in prostaglandin biosynthesis*. Biochem. Pharmacol. 25, 285–291 (1976).
- [12] R. Burgoyne and A. Morgan, *The control of free arachidonic acid levels*. Trends Biol. Sci. 15, 365–366 (1990).
- [13] S. Rittenhouse-Simmons and D. Deykin, *The mobilization of arachidonic acid in platelets exposed to thrombin or ionophore A23187*. J. Clin. Invest. 60, 495–498 (1977).
- [14] E. Carafoli, *Intracellular calcium homeostasis*. Ann. Rev. Biochem. 56, 395–433 (1987).
- [15] G. A. Moore, D. J. McConkey, G. E. N. Kass, P. J. O'Brien and S. Orrenius, *2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone – a novel inhibitor of liver microsomal Ca<sup>2+</sup> sequestration*. FEBS Lett. 224, 331–336 (1987).
- [16] G. E. N. Kass, S. Duddy, G. A. Moore and S. Orrenius, *2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone rapidly elevates cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration by mobilizing the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup>-pool*. J. Biol. Chem. 264, 15192–15198 (1989).
- [17] S. K. Duddy, G. E. N. Kass and S. Orrenius, *Ca<sup>2+</sup>-mobilizing hormones stimulate Ca<sup>2+</sup> efflux from hepatocytes*. J. Biol. Chem. 264, 20863–20866 (1989).
- [18] J. Llopis, G. E. N. Kass, S. K. Duddy, G. C. Farrell, A. Gahm and S. Orrenius, *Mobilization of the hormone-sensitive calcium pool increases hepatocyte tight junctional permeability in the perfused rat liver*. FEBS Lett. 280, 84–86 (1991).
- [19] Å. Ryrfeldt and E. Nilsson, *Lung uptake and antianaphylactic effects of WD 2131 (a β-adrenergic agonist) in perfused guinea-pig lungs*. Acta Pharmacol. Toxicol. 48, 390–396 (1981).
- [20] M. O. Amdur and J. Mead, *Mechanisms of respiration in unanesthetized guinea pigs*. Am. J. Physiol. 192, 364–368 (1958).
- [21] J. Waldeck, *En mätmetod för att undersöka läkemedels effekter på luftvägarna*. Thesis, Lunds Technical University (1987).
- [22] G. Scherphof and H. Westenberg, *Stimulation and inhibition of pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> by local anaesthetics as a result of their interaction with the substrate*. Biochim. Biophys. Acta 398, 442–451 (1975).
- [23] J. Svensson, K. Strandberg, T. Tuvemo and M. Hamberg, *Thromboxane A<sub>2</sub>: Effects on airway and vascular smooth muscle*. Prostaglandins 14, 425–436 (1977).
- [24] I. S. Farrukh, J. R. Michael, S. P. Peters, A. M. Sciuto, N. F. Adkinson, H. S. Freeland, A. Paky, E. W. Spannhake, W. R. Summer and G. H. Gurtner, *The role of cyclooxygenase and lipoxygenase mediators in oxidant-induced lung injury*. Am. Rev. Respir. Dis. 137, 1343–1349 (1988).
- [25] P. B. Zanaboni, J. D. Bradley, L. J. Baudendistel, R. O. Webster and T. E. Dahms, *Cyclooxygenase inhibition prevents PMA-induced increases in lung vascular permeability*. J. Appl. Physiol. 69, 1494–1501 (1990).
- [26] L. Atzori, K. Olafsdottir, A. M. Corrigan, G. Bannenberg, Å. Ryrfeldt and P. Moldéus, *Thiol modifications in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thromboxane induced vaso- and bronchoconstriction in rat perfused lung*. J. Appl. Physiol. 71, 1309–1314 (1991).
- [27] I. W. Rodger, *Excitation-contraction coupling and uncoupling in airway smooth muscle*. Br. J. Pharmacol. 20, 255S–265S (1985).

16



**Società Italiana di Patologia**

**Riunione Scientifica Intercongressuale**

**Roma, 19 dicembre 1991**

**COMUNICAZIONI**

MECCANISMO DELLA VASO- E BRONCOCOSTRIZIONE  
INDOTTA DAL 2,5-DI(TERT-BUTIL)-1,4-BENZOIDROCHINONE  
SUL POLMONE DI RATTO ISOLATO E PERFUSO

L.ATZORI, A.M.CORRIGA, P.MOLDEUS\* e L.CONGIU

Istituto Patologia Generale, Università Studi, 09100 Cagliari

\*Department Toxicology, Karolinska Institute, Stoccolma

2,5,-Di(tert-butyl)-1,4-benzoidrochinone (tBuB) è un potente e selettivo inibitore della  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi microsomale ed è pertanto capace di elevare il contenuto di  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico, inibendone il suo uptake e facilitandone la sua fuoriuscita da questo pool. L'infusione del tBuB (10  $\mu\text{M}$ ) nel polmone di ratto isolato, perfuso e ventilato induce vaso- e broncocostrizione come dimostrato dalla diminuzione del flusso del perfusato, della compliance e della conduttanza. Questi effetti sono accompagnati da un parallelo aumento dei livelli di trombossano e prostacicline nell'effluente del perfusato. L'effetto del tBuB è inibito da L-655,240 (2  $\mu\text{M}$ ), uno specifico antagonista del trombossano, indicando che la vaso- e broncocostrizione è in questo caso mediata dal rilascio di questo eicosanoide. A sostegno di ciò anche la somministrazione d'indometacina (30  $\mu\text{M}$ ), un inibitore della cicloossigenasi, inibisce significativamente l'effetto del tBuB. L'inibizione della  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi microsomale aumentando il contenuto di  $\text{Ca}^{2+}$  libero citosolico potrebbe determinare il rilascio dell'acido arachidonico e il suo conseguente metabolismo attraverso l'attivazione di una fosfolipasi  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente. Questa ipotesi è stata verificata con l'impiego di dibucaina (100  $\mu\text{M}$ ) un inibitore della fosfolipasi  $\text{A}_2$ . Questa sostanza riduce significativamente l'effetto sulla funzionalità polmonare e sui livelli del trombossano da parte del tBuB. I risultati di questo studio dimostrano che il tBuB probabilmente inibendo la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi microsomale può innescare il rilascio dell'acido arachidonico e la sua conseguente conversione a trombossano, che poi sarebbe il responsabile della vaso- e broncocostrizione osservata.

# Thiol modification in $H_2O_2$ - and thromboxane-induced vaso- and bronchoconstriction in rat perfused lung

LUIGI ATZORI, KRISTIN OLAFSDÓTTIR, ANNA MARIA CORRIGA, GERARD BANNENBERG, ÅKE RYRFELDT, AND PETER MOLDEUS  
*Department of Toxicology and Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, S-104 01 Stockholm, Sweden*

ATZORI, LUIGI, KRISTIN OLAFSDÓTTIR, ANNA MARIA CORRIGA, GERARD BANNENBERG, ÅKE RYRFELDT, AND PETER MOLDEUS. *Thiol modification in  $H_2O_2$ - and thromboxane-induced vaso- and bronchoconstriction in rat perfused lung*. J. Appl. Physiol. 71(4): 1309–1314, 1991.—Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), arachidonic acid (AA), and U-44069, a thromboxane analogue, all induced vaso- and bronchoconstriction in the isolated perfused rat lung. The role of protein sulfhydryl modifications in these processes was investigated. The thiol oxidizing agent diamide inhibited both vaso- and bronchoconstriction induced by  $H_2O_2$ , AA, or U-44069. Diamide had only a marginal effect on glutathione and protein thiol levels and no effect on lung mechanics. The diamide inhibition was reversible, and  $H_2O_2$ -induced vaso- and bronchoconstriction was almost maximal after 10 min of perfusion with buffer. The recovery was more rapid if dithiothreitol, a thiol reducing agent, was used in the buffer.  $H_2O_2$ - and AA-induced vaso- and bronchoconstriction is caused by thromboxane release. Diamide did not influence  $H_2O_2$ - or AA-dependent thromboxane formation, indicating that neither AA release nor AA metabolism to thromboxane is sensitive to thiol oxidation. Thus our results indicate that the site of diamide-induced thiol oxidation is the thromboxane receptor or its signal transduction.

diamide; dithiothreitol; arachidonic acid; thromboxane receptor; signal transduction

EXPOSURE OF LUNG TISSUE to reactive oxygen species is of significant importance in the development of different forms of acute and chronic lung injury (10, 22). The treatment of the lung with  $H_2O_2$  or other hydroperoxides is associated with the appearance of vaso- and bronchoconstriction (e.g., decreased conductance and compliance) as well as development of edema (10, 25). The mechanisms by which peroxides induce lung functional and biochemical modifications are still poorly understood.

Studies from different laboratories seem to support the view that the effects of hydroperoxide are partially mediated by release of endogenous vaso- and bronchoactive compounds (7). Arachidonic acid (AA) metabolites (e.g., thromboxane and leukotrienes) are suggested as important mediators in  $H_2O_2$ -induced lung toxicity (13). Thromboxane, which is a powerful inducer of vaso- and bronchoconstriction as well as platelet aggregation, has been proposed to be the major contributor (14) to the lung effects. The mechanism of thromboxane action is

unclear but probably involves a receptor-mediated activation of phosphatidylinositol metabolism (31).

The activity of many enzymes and receptors is controlled by the redox status of cysteine residues in the proteins. There are examples of both up- and downregulation of activities after modification of protein thiol groups (9).

Most commonly, the regulation occurs through thiol disulfide exchange with soluble thiols such as glutathione, forming protein glutathione mixed disulfides. Formation of glutathione protein mixed disulfides can be enhanced by an increase in intracellular oxidized glutathione (3). Thus, glutathione oxidizing agents, such as hydroperoxides or diamide, may increase the amount of mixed disulfides. As a matter of fact, in a number of experimental systems, hydroperoxides have been shown to induce formation of glutathione protein mixed disulfides (6).

The purpose of the present investigation was to investigate a possible involvement of sulfhydryl groups in hydroperoxide-induced vaso- and bronchoconstriction.

## MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats weighing 250–350 g were anesthetized with pentobarbital sodium (Mebumal Vet, Nord Vacc, Sweden; 40 mg/kg ip). Via tracheotomy, an airway cannula was inserted into the trachea. The chest was opened, the superior vena cava was cut, and ~500 U of heparin were injected into the right ventricle. A small incision was made in the right and left ventricle, respectively, for cannulation of the pulmonary artery and vein. The lung was dissected free and, with the trachea, placed in an artificial water-saturated thoracic chamber. The method has been described previously in detail (28). The lungs were perfused at a constant hydrostatic pressure by use of Krebs-Ringer buffer pH 7.4 (composition in mM: 118.0 NaCl, 4.7 KCl, 2.5  $CaCl_2$ , 1.2  $MgSO_4$ , 24.9  $NaHCO_3$ , 1.2  $KH_2PO_4$ ) with the addition of 12.5 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, 5 mM glucose, and 2% bovine serum albumin (defatted, fraction V, Boehringer-Mannheim, Germany). The chemicals were analytical grade and obtained from a local supplier. The flow rate was 15–20 ml/min. The buffer reservoir and the thoracic chamber were jacketed and warmed with circulating water kept at 37°C. The perfus-

ate pH was maintained between 7.35 and 7.45 by blowing  $\text{CO}_2$  into the buffer as needed.

The lungs were ventilated with air at 80 breaths/min by creating an alternating negative pressure ( $-1$  to  $-8$   $\text{cmH}_2\text{O}$ ) inside the thoracic chamber by means of an animal respirator (model 680, Harvard Apparatus) and a vacuum source connected to the thoracic chamber. The tracheal airflow was measured with a heated pneumotachograph (Fleisch no. 0000, Switzerland) and a pressure sensor (164pc, Honeywell). The thoracic pressure changes were monitored with a pressure sensor (174pc, Honeywell). The signals were transformed and amplified via a Lablinc interface system (Coulbourn Instruments) and transmitted directly to a computer where lung conductance and dynamic compliance were calculated (1, 32). Conductance was calculated as the inverted resistance. Baseline values for conductance and compliance were  $77.3 \pm 2.3$  (SE)  $\text{ml} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$  and  $2.92 \pm 0.08$   $\text{ml/kPa}$  ( $n = 22$ ), respectively. To rinse the vascular system of the lungs from circulating cells and released autacoids, the perfusate of the first 10 min was discarded. Then the lungs were equilibrated for another 20 min by recirculation. The experiments started 30 min after the lung was placed in the thoracic chamber. Before the administration of the test compound, the lungs were allowed to equilibrate for 10 min in an albumin-free Krebs-Ringer buffer.

During all the experiments the lungs were monitored for changes in perfusion flow, compliance, and conductance. At the end of the experiment a sample of the lung was immediately frozen in liquid nitrogen and then ground. This lung powder was used to measure the content of reduced glutathione (GSH) by high-performance liquid chromatography according to Reed et al. (27).

To clarify the role of sulfhydryl groups in the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -mediated vaso- and bronchoconstriction, the lungs were exposed to diamide (azodicarboxylic acid-bis-dimethylamide, Sigma Chemical, St. Louis, MO) and monobromotrimethylammoniumbromide (qBBBr) (Calbiochem, La Jolla, CA) for 10 min, and then  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added. In the recovery experiments the lungs were perfused with Krebs-Ringer buffer either with or without dithiothreitol (DTT) (Boehringer-Mannheim, Germany).

In experiments where the thromboxane analogue U-44069 (from Dr. Pike, Upjohn, Kalamazoo, MI), the thromboxane antagonist L655,240 (kindly provided by S. E. Dahlén, Dept. of Pharmacology, Karolinska Institutet) (16), and the agonists 5-hydroxytryptamine (5-HT, Sigma Chemical) and bradykinin (Sigma Chemical) were used, these agents were added to the perfusate at the concentrations and time indicated.

At the end of the experiments a tissue sample of the lung was weighed and then dried in an oven at  $100^\circ\text{C}$  for at least 4 days. The lung was then weighed again and the wet-to-dry ratio measured. The ratio was used as an index for lung edema.

The thromboxane  $\text{A}_2$  ( $\text{TxA}_2$ ) concentration in the perfusate was measured as its stable metabolite thromboxane  $\text{B}_2$  ( $\text{TxB}_2$ ) by means of a radioimmunoassay RIA kit (New England Nuclear Research Products, Du Pont, Dreieich, Germany).

**Statistical analysis.** The significance of differences was calculated using Student's *t* test.

## RESULTS

**Sulfhydryl reagents and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced vaso- and bronchoconstriction.** The effects of  $\text{H}_2\text{O}_2$  alone and in combination with a sulfhydryl reagent on lung mechanics and GSH content in isolated perfused rat lungs are shown in Table 1. The treatment of lungs with  $0.5$   $\text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  induced a pronounced reduction in perfusion flow (37%) as well as in conductance (37%) and compliance (54%). However, the reduction in GSH content was less pronounced (20%). To investigate whether sulfhydryl groups could be of importance in controlling  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced vaso- and bronchoconstriction, isolated and perfused lungs were pretreated with sulfhydryl reagents. The sulfhydryl oxidizing agent diamide ( $0.5$  and  $1$   $\text{mM}$ ) protected against the effects of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The high diamide concentration markedly reduced the lung GSH content, but only a marginal effect was noted at the low diamide concentration (15% reduction) (unpublished observations). The thiol alkylating agents qBBBr and dithiodinitroic acid, which do not penetrate cell membranes, did not affect GSH content or  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced vaso- and bronchoconstriction (unpublished observations). We also used the penetrating alkylating agents monobromobimane and *N*-ethylmaleimide (unpublished observations). Both of these agents, however, exerted marked toxic effects in the lung.

Similarly to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , also AA ( $0.1$   $\text{mM}$ ) and U-44069, a stable  $\text{TxA}_2$  analogue ( $100$   $\text{pmol}$ ), markedly reduced perfusion flow, conductance, and compliance (Fig. 1). The potency of the compounds was of the following order: U-44069 > AA >  $\text{H}_2\text{O}_2$ . After a 10-min perfusion period with control buffer, the lungs were perfused with diamide ( $0.5$   $\text{mM}$ ) for 10 min, and no changes in lung mechanics were noted in comparison with perfusion with control buffer. The treatment of the lungs with  $\text{H}_2\text{O}_2$ , AA, or U-44069, after diamide treatment, caused only slight effects on perfusion flow and ventilation (Fig. 2). Thus, diamide exerted a protective effect against  $\text{H}_2\text{O}_2$ , AA-, and U-44069-induced vaso- and bronchoconstriction.

**$\text{H}_2\text{O}_2$ - and AA-induced  $\text{TxB}_2$  formation—effect of diamide.** To investigate whether diamide was affecting  $\text{H}_2\text{O}_2$ - or AA-mediated thromboxane formation, perfusate samples were collected from single-pass perfusion experiments to measure  $\text{TxB}_2$ , the stable thromboxane metabolite. Table 2 shows that  $\text{H}_2\text{O}_2$  or AA induced a marked increase in  $\text{TxB}_2$  perfusate concentration compared with control lungs. Diamide pretreatment reduced the  $\text{H}_2\text{O}_2$ - or AA-induced  $\text{TxB}_2$  levels  $\sim 50\%$  compared with pretreatment without diamide. However, because the perfusion flow in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  or AA was reduced  $\sim 50\%$  compared with  $\text{H}_2\text{O}_2$  or AA in combination with diamide, the total amount of  $\text{TxB}_2$  formed was not significantly influenced by the diamide treatment (Table 2).

**$\text{H}_2\text{O}_2$ - and AA-induced lung edema (wet-to-dry weight ratios).** The wet-to-dry weight ratio of the control lungs was somewhat higher than other reported values (7, 21).

TABLE 1. Effects of  $H_2O_2$  plus diamide on GSH content and functions in isolated and perfused rat lung

Treatment	n	GSH, nmol/mg protein	%Reduction		
			Perfusion flow	Compliance	Conductance
Control	5	12.4±0.6	0	0	0
$H_2O_2$ (0.5 mM)	6	9.9±0.5	37±6	37±8	54±6
Diamide (0.5 mM) + $H_2O_2$ (0.5 mM)	3	10.6±0.5	0±2	7±6	15±8

Values are means ± SE; n, no. of experiments. GSH, glutathione.

This small increase in wet-to-dry weight ratio, which does not affect the lung functions, is most likely due to the fact that our perfusion medium was albumin free. Because of high protein binding of our agents, we had to use a perfusion medium without albumin.  $H_2O_2$ - or AA-treated lungs showed a significant increase in the wet-to-dry weight ratio compared with control lungs (Table 3). When the lungs were pretreated with diamide, significantly lower wet-to-dry weight ratios were obtained.

**Reversal of the diamide inhibition.** Perfusion of the lung with Krebs-Ringer buffer after treatment with diamide allowed the lung to recover from the inhibitory effect of diamide (Fig. 3). This recovery was time dependent and more rapid on respiration than on perfusion flow. Thus, if the lung was perfused with buffer for 5 min after diamide treatment, the  $H_2O_2$ -induced bronchoconstriction was 100% of the  $H_2O_2$  response in control lung, whereas there was still no obvious vasoconstriction. If the lung was perfused for 10 min, an almost complete recovery of both broncho- and vasoconstriction was observed (Fig. 3). The recovery was considerably more rapid if the thiol reducing agent DTT (1 mM) was present in the perfusate buffer (Fig. 3).

**Effect of diamide or L655,240 on 5-HT- and brady-**

**kinin-induced vaso- and bronchoconstriction.** To study the specificity of the inhibitory effects of diamide or L655,240 on vaso- and bronchoconstriction induced by  $H_2O_2$ , AA, or U-44069, experiments were performed with the two agonists 5-HT and bradykinin. Of these agonists, 5-HT is more potent as a bronchoconstrictor, whereas in general bradykinin induces both vaso- and bronchoconstriction (29). The agonists were injected after diamide or L655,240 treatment. As shown in Figs. 4 and 5, neither L655,240 nor diamide treatment had any significant effect on bradykinin- or 5-HT-induced constrictions.

**Effect of qBBR on  $H_2O_2$ -induced vaso- and bronchoconstriction.** qBBR is a charged water-soluble analogue to monobromobimane that specifically binds both soluble and protein-bound thiol groups. This analogue is considered not to penetrate cell membranes. Figure 4 shows that qBBR did not prevent the vaso- and bronchoconstriction induced by  $H_2O_2$ . Furthermore, when the lung was then treated with diamide after qBBR,  $H_2O_2$  had no effects (Fig. 6).

## DISCUSSION

We have previously demonstrated that hydroperoxides induce both vaso- and bronchoconstriction in the perfused and ventilated rat lung (25, 26). The results of the present study confirm that in this model thromboxane is the major mediator responsible for the changes in the lung function. Our results also indicate that sulfhydryl groups may be important in the thromboxane signal transduction but apparently not for the  $H_2O_2$ -induced AA release and thromboxane synthesis. Thus, although the thiol oxidizing agent diamide inhibits  $H_2O_2$ -, AA-, and U-44069-induced vaso- and bronchoconstriction, diamide has no significant effect on thromboxane formation induced by either  $H_2O_2$  or AA. A similar phenomenon has been observed after hyperoxia in the isolated perfused rabbit lung (15). Whereas hyperoxia inhibited *tert*-butylhydroperoxide-induced vasoconstriction, no effect on thromboxane release was observed.

Diamide has been shown to affect a number of cellular processes including amino acid and ion transport (24) and platelet functions (17). Diamide oxidizes both soluble thiols and thiol groups in protein. Both protein disulfides and protein mixed disulfides with soluble thiols such as cysteine or GSH may be formed as a consequence of diamide treatment. We could only observe a minor decrease in the level of reduced glutathione and no observable change in protein sulfhydryl content. Thus the effect of diamide in our system and at the concentration used must be rather specific. Furthermore, qBBR, which

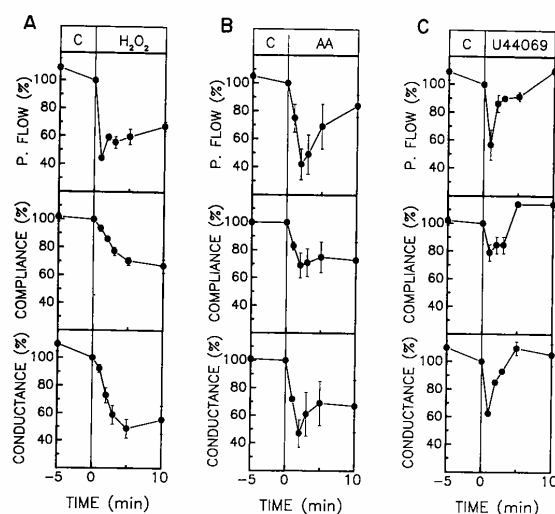


FIG. 1. Effect of  $H_2O_2$  (500  $\mu$ M, A), AA (100  $\mu$ M, B), and U-44069 (100 pmol, C) on perfusion flow and lung mechanics in isolated perfused rat lung.  $H_2O_2$  and AA were added to perfusate; U-44069 was administered by bolus injection. Values are means ± SE of ≥3 experiments.



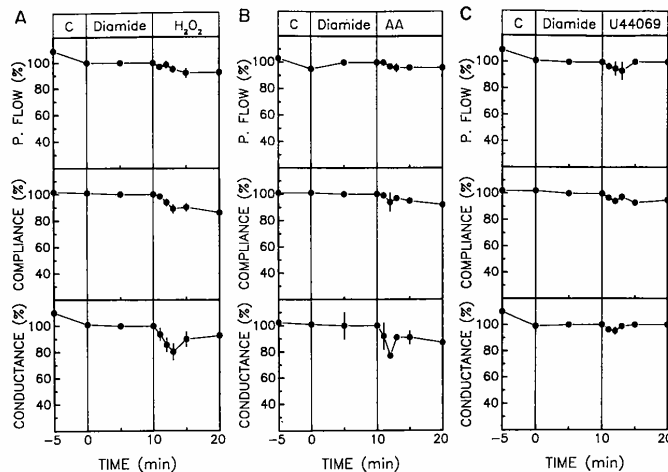


FIG. 2. Effect of diamide (500  $\mu$ M) on  $H_2O_2$ - (500  $\mu$ M, A), AA- (100  $\mu$ M, B), and U-44069- (100 pmol, C) induced changes in perfusion flow and lung mechanics in isolated perfused rat lung. Values are means  $\pm$  SE of 3 experiments.

has been demonstrated to bind to extracellular protein sulfhydryl groups, did not affect the diamide-induced alterations. These results indicate that the sulfhydryl groups oxidized by diamide must be located intracellularly or in the plasma membrane at a position that makes them unavailable to quaternary bromobimane attack.

The thiol oxidation caused by diamide is apparently readily reversed, because the lung recovered with regard to  $H_2O_2$ -induced vaso- and bronchoconstriction within 10 min. This recovery process does not require the presence of an exogenously added thiol reducing agent, although DTT speeds up the process. The mechanism by which the thiol reduction occurs is not clear but is most likely catalyzed by the normal thiol-disulfide exchange.

The site of diamide action appears to be at the thromboxane signal transduction level rather than on any of the steps leading to thromboxane formation. The thromboxane signal transduction involves stimulation, which results in activation of phospholipase C via a GTP binding protein (G-protein) (20). This in turn results in release of inositol phosphates, a common pathway in the vaso- and bronchoconstriction induced by different mediators such as 5-HT, bradykinin, histamine, and acetylcholine (12). The fact that diamide does not interfere

with 5-HT- or bradykinin-induced vaso- and bronchoconstriction indicates that the sulfhydryl target is before phospholipase C activation, probably at the site of the thromboxane receptor or the G-protein.

Although modifications such as phosphorylation/dephosphorylation, methylation, carboxylation, and ADP ribosylation generally are mechanisms important in controlling enzyme structure and function, recent evidence suggests that sulfhydryl modification may also be an important factor (19). The activity of several enzymes has thus been shown to be dependent on the oxidation state of cysteine residues. In addition, several receptors are thought to be controlled by modification of their sulfhydryl status. For example, experiments with the purified acetylcholine receptor have suggested that thiol-disulfide exchange may be involved in the control of this receptor (32). Modification of thiol groups in the ion channel is thus believed to inhibit the flow of  $Ca^{2+}$  through it. Furthermore, thiols have the ability to activate purified acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunit and to allow ligand binding. Similarly, sulfhydryl reagents can activate purified  $\beta$ -adrenergic receptors by a mechanism involving conformational change after reduction of critical protein disulfides (5). The insulin, angiotensin, glucocorticoid, and histamine  $H_1$  receptors are other receptor systems where sulfhydryl modifications are indicated (17).

TABLE 2.  $H_2O_2$ - and AA-induced  $TxB_2$  formation in perfused rat lung

Treatment	n	$TxB_2$	
		pg/ml	pg/min
Control	3	8 $\pm$ 2	105 $\pm$ 26
$H_2O_2$ (0.5 mM)	4	1,200 $\pm$ 144*	12,689 $\pm$ 1,597*
Diamide (0.5 mM)	3	46 $\pm$ 9	134 $\pm$ 103
Diamide + $H_2O_2$	3	640 $\pm$ 25†‡	10,251 $\pm$ 1,804‡
AA (0.1 mM)	3	15,166 $\pm$ 5,775§	147,615 $\pm$ 56,209§
Diamide + AA	3	9,590 $\pm$ 3,792	134,260 $\pm$ 11,088

Values are means  $\pm$  SE; n, no. of experiments. Perfusate levels of thromboxane  $B_2$  ( $TxB_2$ ) were measured between 5 and 6 min of perfusion after  $H_2O_2$  or arachidonic acid (AA) addition. \*  $H_2O_2$  vs. control,  $P < 0.02$ ; † diamide +  $H_2O_2$  vs.  $H_2O_2$ ,  $P < 0.002$ ; ‡ diamide +  $H_2O_2$  vs. control,  $P < 0.02$ ; § AA vs. control,  $P < 0.002$ .

TABLE 3. Wet-to-dry weight ratios at the end of rat lung perfusion

Treatment	n	Wet-to-Dry Weight Ratio
Control	7	7.2 $\pm$ 0.2
$H_2O_2$ (0.5 mM)	4	12.1 $\pm$ 0.6*
Diamide (0.5 mM)		
+ $H_2O_2$ (0.5 mM)	5	9.1 $\pm$ 0.2
AA	3	16.8 $\pm$ 2.4†
Diamide + AA	3	9.1 $\pm$ 0.7

Values are means  $\pm$  SE; n, no. of experiments. Lungs were weighed and dried immediately after perfusion. \*  $H_2O_2$  vs. control and diamide +  $H_2O_2$ ,  $P < 0.005$ ; † AA vs. control and AA vs. diamide + AA,  $P < 0.05$ .

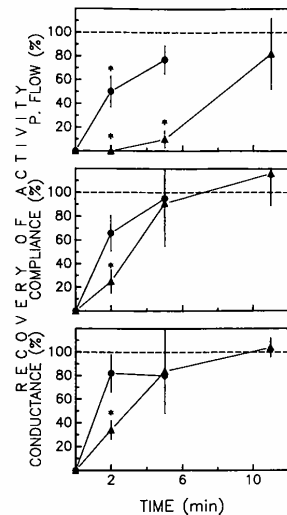


FIG. 3. Reversal of diamide inhibition of  $H_2O_2$ -induced broncho- and vasoconstriction in presence (●) and absence (▲) of dithiothreitol (DTT, 1 mM). The 100% values represent maximal response induced by  $H_2O_2$  alone. Single points indicate response obtained with  $H_2O_2$  after diamide exposure by perfusing lungs for different time periods with control buffer or buffer containing DTT. Values are means  $\pm$  SE of 3 experiments. \* $P < 0.05$ , compared with maximal exposure obtained with  $H_2O_2$  alone (100%).

In addition to controlling receptors, thiol-disulfide exchange may also affect G-proteins. For instance, the G-protein involved in the signal transduction from the  $\beta$ -adrenergic receptor (23, 30) contains thiol groups essential for its function. Our results using diamide and the

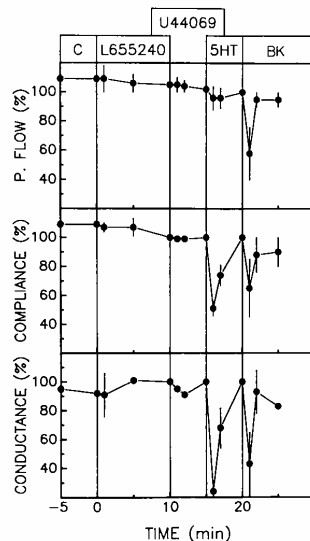


FIG. 4. Effect of L655,240 (1  $\mu$ M) on U-44069- (100 pmol), 5-hydroxytryptamine- (5-HT, 100 nmol), and bradykinin- (BK, 100 nmol) induced changes in perfusion flow and lung mechanics in isolated perfused rat lung. Values are means  $\pm$  SE of 3 experiments.

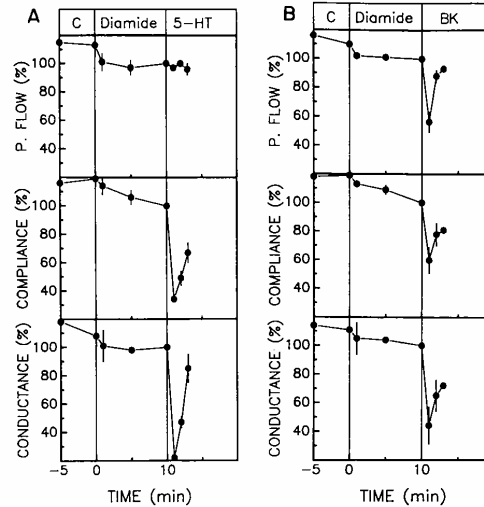


FIG. 5. Effect of diamide (500  $\mu$ M) on 5-HT- (A) and bradykinin- (B) induced changes in perfusion flow and lung mechanics in isolated perfused rat lung. Values are means  $\pm$  SE of 3 experiments.

isolated perfused lung also suggest that the thromboxane receptor or a related G-protein involved in thromboxane signal transduction contains sulfhydryl groups important for their functions.

In conclusion, our results support the hypothesis that thiol-disulfide exchange reactions can control the thromboxane signal transduction at the receptor or G-protein level. The lung contains at least 40 different cell types. If critical biochemical changes occur in a specific cell population (e.g., smooth muscle cells, endothelial cells), these changes could be masked by the other cells

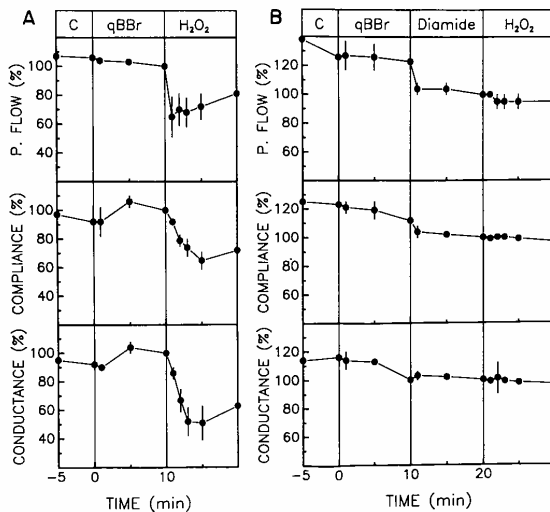


FIG. 6. Effect of monobromotrimethylammonium bromide (qBBR, 500  $\mu$ M) on  $H_2O_2$ - (500  $\mu$ M, A) and diamide- (500  $\mu$ M, B) induced changes in perfusion flow and lung mechanics in isolated perfused rat lung. Values are means  $\pm$  SE of 3 experiments.

present. Thus experiments using models simpler than the isolated perfused lung (e.g., platelets, smooth muscle cells) are under way to clarify what type of alteration as well as which protein or proteins are affected by diamide treatment.

This study was supported by the Swedish Medical Research Council, the Swedish Environmental Protection Board, the Swedish Tobacco Company, the European Society of Toxicology, and the European Medical Research Council.

Present address of K. Olafsdóttir: Dept. of Pharmacology, University of Iceland, PO Box 8216, 128 Reykjavik, Iceland.

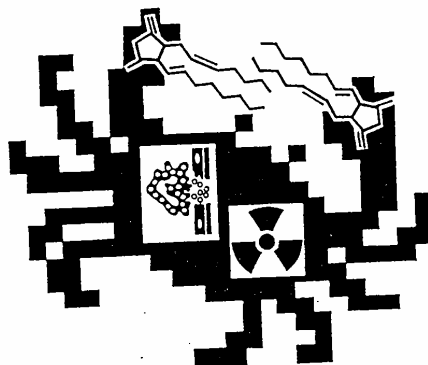
Address for reprint requests: P. Moldéus, Dept. of Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Box 60400, S-104 01 Stockholm, Sweden.

Received 7 January 1991; accepted in final form 6 May 1991.

## REFERENCES

1. AMDUR, M. O., AND J. MEAD. Mechanics of respiration in unanesthetized guinea pigs. *Am. J. Physiol.* 192: 364–368, 1958.
2. AMMON, H. P. T., AND M. MARK. Thiols and pancreatic  $\beta$ -cell function: a review. *Cell Biochem. Funct.* 3: 157–171, 1985.
3. BELLOMO, G., F. MIRABELLI, D. DI MONTE, P. RICHELMI, G. FINARDI, AND S. ORRENIUS. Formation and reduction of glutathione-protein mixed disulfides during oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 36: 1313–1320, 1987.
4. BIRNBAUMER, L., AND A. M. BROWN. G proteins and the mechanism of action of hormones, neurotransmitters, and autocrine and paracrine regulatory factors. *Am. Rev. Respir. Dis.* 14: S106–S114, 1990.
5. BRAVO, C., J. A. GARCIA-BARO, AND J. A. SOBRINO. Activation of mammalian endplate receptors by iontophoretic application of reducing and oxidizing sulphydryl reagents. *Rev. Esp. Fisiol.* 41: 243–248, 1985.
6. BRIGELIUS, R., R. LENZER, AND H. SIES. Increase in hepatic mixed disulfide and glutathione disulfide levels elicited by paraquat. *Biochem. Pharmacol.* 31: 1637–1641, 1982.
7. BURGHUBER, O., M. M. MATHIAS, I. F. MCMURTRY, J. T. REEVES, AND N. F. VOELKEL. Lung edema due to hydrogen peroxide is independent of cyclooxygenase products. *J. Appl. Physiol.* 56: 900–905, 1984.
8. BURGHUBER, O. C., R. J. STRIFE, J. ZIRROLI, P. M. HENSON, J. E. HENSON, M. M. MATHIAS, J. T. REEVES, R. C. MURPHY, AND N. F. VOELKEL. Leukotriene inhibitors attenuate rat lung injury induced by hydrogen peroxide. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131: 778–785, 1985.
9. COTGREAVE, I. A., L. ATZORI, AND P. MOLDEUS. Thiol-disulphide exchange: physiological and toxicological aspects in sulphur-containing drugs and related organic compounds. In: *Sulfur-Containing Drugs and Related Organic Chemicals*, edited by L. A. Damani. Chichester, UK: Ellis Horwood, 1989, vol. 2, pt. B, p. 101–119.
10. FARRUKH, I. S., J. R. MICHAEL, W. R. SUMMER, N. F. ADKINSON, AND G. H. GURTNER. Thromboxane-induced pulmonary vasoconstriction: involvement of calcium. *J. Appl. Physiol.* 58: 34–44, 1985.
11. FRANK, K. L. Oxidant injury to pulmonary endothelium. In: *The Pulmonary Circulation and Acute Lung Injury*, edited by S. I. Said. New York: Future, 1988, p. 283–320.
12. GRIGORIAN, G. Y., T. Y. MIRZEPOYAZOKE, T. J. RESENK, S. M. DANILOV, AND V. A. TKACHUK. Regulation of phosphoinositide turnover in endothelium from human pulmonary artery, aorta and umbilical vein. Antagonistic action on the  $\beta$ -adrenoceptor coupled adenylate cyclase system. *J. Mol. Cell Cardiol.* 21: 119–123, 1989.
13. GURTNER, G. H., I. S. FARRUKH, N. F. ADKINSON, A. M. SCINTO, J. M. JACKSON, AND J. R. MICHAEL. The role of arachidonate mediators in peroxide-induced lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 480–483, 1987.
14. GURTNER, G. H., A. KNOBLANCH, P. L. SMITH, H. SIES, AND N. F. ADKINSON. Oxidant and lipid-induced pulmonary vasoconstriction mediated by arachidonic acid metabolites. *J. Appl. Physiol.* 55: 943–954, 1983.
15. GURTNER, G. H., J. R. MICHAEL, I. S. FARRUKH, A. M. SCINTO, AND N. F. ADKINSON. Mechanism of hydroperoxide-induced pulmonary vascular paralysis: effect of antioxidant pretreatment. *J. Appl. Physiol.* 59: 953–958, 1985.
16. HALL, R. A., J. GILLARD, Y. GUINDON, G. LETTS, E. CHAMPION, D. ETHIER, J. EVANS, A. W. FORD-HUTCHINSON, R. FORTIN, T. R. JONES, A. LORD, H. E. MORTON, J. ROKACH, AND C. YOAKIM. Pharmacology of L-655,240 (3-[1-(4-chlorobenzyl)-5-fluoro-3-methyl-indol-2-yl]2,2-dimethyl propanoic acid); a potent selective thromboxane-prostaglandin endoperoxide antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 135: 193–201, 1985.
17. HILL, T. D., J. C. WHITE, AND G. H. R. RAO. The influence of glutathione depleting agents on human platelet function. *Thromb. Res.* 53: 457–465, 1989.
18. HOLLENBERG, M. D. Biochemical mechanisms of receptor regulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 6: 299–302, 1985.
19. HUGANIR, R. L., AND P. GREENGARD. Regulation of receptor function by protein phosphorylation. *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 472–477, 1987.
20. JASCHONEK, K., AND C. P. MULLER. Platelet and vessel associated prostacyclin and thromboxane  $A_2$ /prostaglandin endoperoxide receptors. *Eur. J. Clin. Invest.* 18: 1–8, 1988.
21. JOHNSON, A., P. PHILLIPS, D. HOKING, M.-F. TSAN, AND T. FERRO. Protein kinase inhibitor prevents pulmonary edema in response to  $H_2O_2$ . *Am. J. Physiol.* 256 (Heart Circ. Physiol. 25): H1012–H1022, 1989.
22. JOHNSON, K. I., J. E. FANTONE, J. KAPLAN, AND P. A. WARD. In vivo damage of rat lungs by oxygen metabolites. *J. Clin. Invest.* 67: 983–993, 1981.
23. KRAMER, K., B. RADEMAKER, W. H. M. ROZENDAL, H. TIMMERMAN, AND A. BAST. Influence of lipid peroxidation on beta-adrenoceptors. *FEBS Lett.* 198: 80–84, 1986.
24. LEIBACH, F. H., D. J. PILLIAN, S. MENDICINO, AND D. PASHLEY. The role of glutathione in transport activity in kidney. In: *Functions of Glutathione in Liver and Kidney*, edited by H. Sies and A. Wendel. New York: Springer-Verlag, 1978, p. 84–91.
25. OLAFSDOTTIR, K., L. ATZORI, A. RYRFELDT, M. BERGGREN, M. KUMLIN, AND P. MOLDEUS. Mechanisms of hydroperoxide-induced broncho- and vasoconstriction in isolated and perfused rat lung. *Pharmacol. Toxicol.* 68: 181–186, 1991.
26. OLAFSDOTTIR, K., A. RYRFELDT, L. ATZORI, M. BERGGREN, AND P. MOLDEUS. Hydroperoxide-induced broncho- and vasoconstriction in the isolated rat lung. *Exp. Lung Res.* 17: 615–627, 1991.
27. REED, D. J., J. R. BABSON, P. W. BEATTY, A. E. BRODIE, W. W. ELLIS, AND D. W. POTTER. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.* 106: 55–62, 1980.
28. RYRFELDT, A., F. KRÖLL, M. BERGGREN, AND P. MOLDEUS. Hydroperoxide and cigarette smoke induced effects on lung mechanics and glutathione status in rat isolated perfused and ventilated lung. *Life Sci.* 42: 1439–1445, 1988.
29. RYRFELDT, A., K. OLAFSDOTTIR, M. BERGGREN, AND P. MOLDEUS. Effects of some autotoxins on breathing and perfusion flow in the isolated perfused rat lung. *Pharmacol. Toxicol.* 66: 312–314, 1990.
30. SEVERNE, Y., C. WEMERS, AND G. VAUQUELIN. Agonist/*N*-ethylmaleimide mediated inactivation of  $\beta$ -adrenergic receptors. *Biochem. Pharmacol.* 34: 1611–1617, 1985.
31. SIESS, W., F. L. SIEGEL, AND E. G. LAPETINA. Arachidonic acid stimulates the formation of 1,2-diacylglycerol and phosphatidic acid in human platelets. *J. Biol. Chem.* 258: 11236–11242, 1983.
32. WALDEK, J. *En mätmetod för att undersöka läkemedels effekter på luftvägarna* (Thesis). Lund, Sweden: Lund Technical University, 1987.
33. YEE, A. S., D. E. CORLEY, AND M. G. MCNAMEE. Thiol-group modification of *Torpedo californica* acetylcholine receptor: subunit localization and effects on function. *Biochemistry* 25: 2110–2119, 1986.

18



2<sup>nd</sup> International Conference on  
**Eicosanoids and other Bioactive  
Lipids in Cancer, Inflammation  
and Radiation Injury**

Berlin, September 17-21, 1991

Universitätsklinikum Steglitz  
Hindenburgdamm 30  
D-1000 Berlin 45 (Steglitz)

---

Abstract Book

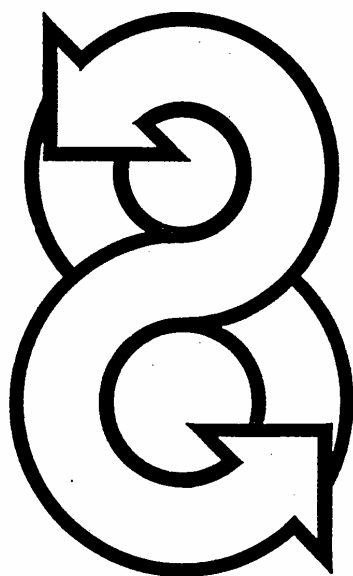
THIOL MODIFICATION IN  $H_2O_2$  AND THROMBOXANE  
INDUCED VASOCONSTRICTION AND  
BRONCHOCONSTRICTION IN RAT PERFUSED LUNG  
Gerard BANNENBERG, Luigi ATZORI, Kristin  
OLAFSDOTTIR, Anna Maria CORRIGA, Åke RYRFELDT  
and Peter MOLDEUS

Department of Toxicology and Institute of Environmental  
Medicine, Karolinska Institutet, Box 60400, S-104 01  
Stockholm, Sweden

Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), arachidonic acid (AA) and U44069, a thromboxane analogue, all induced vaso- and bronchoconstriction in the isolated perfused rat lung. The role of protein sulfhydryl modifications in these processes was investigated. The thiol oxidizing agent diamide inhibited both vaso- and bronchoconstriction induced by either of  $H_2O_2$ , AA or U44069. Diamide had only a marginal effect on glutathione or protein thiol levels and no effect on lung mechanics. The diamide inhibition was reversible and vaso- and bronchoconstriction, induced by  $H_2O_2$ , almost maximal after 10 min of perfusion with buffer. The recovery was more rapid if dithiothreitol, a thiol reducing agent, was used in the buffer.  $H_2O_2$  and AA induced vaso- and bronchoconstriction is caused by thromboxane release. Diamide did not influence  $H_2O_2$  or AA dependent thromboxane formation indicating that neither AA release nor AA metabolism to thromboxane is sensitive to thiol oxidation. Thus our results indicate that the site of diamide induced thiol oxidation is at the thromboxane receptor or its signal transduction.

19

**ATTI DELL'OTTAVO CONVEGNO  
SULLA PATOLOGIA DA TOSSICI  
AMBIENTALI ED OCCUPAZIONALI**



**PTAO**

**TORINO, 16 - 17 settembre 1991**

**1991**

**Dipartimento di Medicina e Oncologia Sperimentale  
Sezione di Patologia Ambientale**

# EFFETTI DEL BIOSSIDO DI ZOLFO SUL POLMONE ISOLATO E PERFUSO DI CAVIA

L.Atzori°, G.Bannenberg, A.M.Corriga°, Å.Ryrfeldt, P.Moldèus e L.Congiu°

°Istituto Patologia Generale, Università degli Studi di Cagliari, via Porcell 4, 09100 Cagliari(I)

Department of Toxicology, Karolinska Institute, Box 60400, S-104 01 Stockholm(S)

Il biossido di zolfo(SO<sub>2</sub>) è uno degli inquinanti ambientali più comuni essendo la sua presenza spesso assai elevato sia negli ambienti di lavoro che non.Esso è generato attraverso diversi processi , p.e. durante la combustione del carbone, dei carburanti negli autoveicoli e nei processi industriali(1).

L'SO<sub>2</sub> è un gas moderatamente irritante con forti proprietà idrofiliche.Esso è assai solubile sullo strato liquido che ricopre la mucosa del tratto respiratorio.A contatto con l'acqua l'SO<sub>2</sub> da subito origine a bisulfito e solfito secondo la seguente reazione:  
$$SO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3^- \rightleftharpoons 2H^+ + SO_3^{2-}$$

Diversi studi epidemiologici hanno indicato una correlazione tra livelli elevati di SO<sub>2</sub> e incidenza di patologie respiratorie (2).Indagini sperimentali hanno mostrato che brevi inalazioni di SO<sub>2</sub> producono una rapida broncocostrizione sia nell'uomo che negli animali(3,4).Specialmente i soggetti asmatici risultano essere particolarmente sensibili anche a basse concentrazioni di SO<sub>2</sub> (3).

I meccanismi attraverso cui SO<sub>2</sub> induce la broncocostrizione sono per il momento sconosciuti.Alcuni studi indicherebbero un riflesso neuronale attraverso vie vagali efferenti.Altri dati postulerebbero un possibile effetto diretto del gas su specifici recettori sensibili a stimoli irritanti o un meccanismo mediato attraverso il rilascio di sostanze broncocostrittrici (4,5).

Nella presente indagine abbiamo studiato gli effetti dell'SO<sub>2</sub> sulla meccanica respiratoria usando per la prima volta il modello sperimentale del polmone di cavia isolato e perfuso.

## MATERIALI E METODI

Sono stati usate cavie di sesso maschile del peso di 250-350g.Gli animali erano anestetizzati con pentobarbital(Mebumal vet., NordVacc, Svezia) 40mg/Kg.I polmoni erano quindi rimossi come precedentemente descritto e sospesi in una camera toracica umidificata(6).Il polmone era perfuso con una soluzione Krebs-Ringer pH 7.4 tamponata con bicarbonato e contenente 2% di albumina bovina serica, 5 mM glucosio e 12.5 mM Hepes.

I valori del flusso tracheale e della pressione della camera toracica venivano monitorizzati con dei trasduttori.Questi segnali trasformati e amplificati tramite un Colbourne Lablinc interface system(Colbourn Instruments, U.S.A.) venivano inviati ad un computer, che eseguiva il calcolo della compliance dinamica(Cdyn) e della conduttanza respiratoria(Gaw)(7).Il flusso del liquido di perfusione veniva misurato tramite un flussometro(Promedica AB, Lund, Svezia).

Le concentrazioni di esposizione dell'SO<sub>2</sub> venivano ottenute tramite miscele tra concentrazioni note del gas e aria e continuamente monitorizzate tramite flussometri.

# RISULTATI

L'esposizione del polmone isolato e perfuso di cavia all' $\text{SO}_2$  produce una diminuzione dose-dipendente della compliance e della conduttanza (Fig.1). Nessun effetto è osservato sul flusso del perfusato.

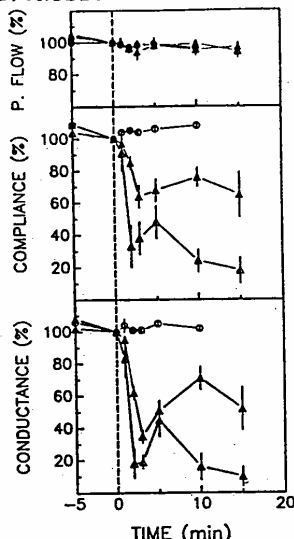


Fig.1-Effetto dell' $\text{SO}_2$  sulla meccanica polmonare e sul flusso di perfusione. Concentrazioni di  $\text{SO}_2$  in ppm: 100 (O), 250 ( $\Delta$ ), 500 ( $\Delta$ ). I valori indicano la media  $\pm$  SEM.

Per valutare se concentrazioni di  $\text{SO}_2$  che non inducono effetti sulla broncocostrizione siano in grado di modificare la reattività del polmone a concentrazioni elevate di  $\text{SO}_2$ , il polmone veniva esposto per 30 min a 10 ppm di  $\text{SO}_2$  e successivamente a 250 ppm di  $\text{SO}_2$ . Come mostrato nella Fig.2 il pretrattamento con una concentrazione bassa e apparentemente non tossica di  $\text{SO}_2$  è in grado di prevenire in maniera significativa gli effetti di una dose di  $\text{SO}_2$  broncocostrittrice.

Poiché l' $\text{SO}_2$  in presenza di acqua è rapidamente convertito in solfito per valutare se l'effetto protettivo delle basse concentrazioni di  $\text{SO}_2$  fosse dovuto alla presenza di solfito il polmone veniva perfuso 15 min prima e poi durante l'esposizione a 250 ppm di  $\text{SO}_2$  con 3 mM solfito di sodio. Questo trattamento riduce significativamente il grado di broncocostrizione indotto dal gas (Fig.3).

## DISCUSSIONE

I risultati del nostro studio mostrano che il polmone isolato e perfuso di cavia può essere un modello adatto per studiare gli effetti tossici dell' $\text{SO}_2$ .

Quando il gas raggiunge lo strato liquido che ricopre il polmone reagisce con l'acqua ed è rapidamente convertito in



bisulfito e solfito e rilascia idrogenioni. Ognuna di queste molecole potrebbe indurre la broncocostrizione direttamente o tramite il rilascio di sostanze broncocostrittrici.

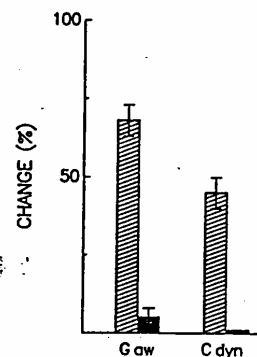


Fig.2-Effetto di 250 ppm di SO<sub>2</sub> sulla conduttanza e sulla compliance con (■) e senza (▨) il pretrattamento con 10 ppm SO<sub>2</sub> per 30 min. I valori rappresentano modificazioni in percentuale rispetto ai valori basali. I valori indicano la media ± SEM

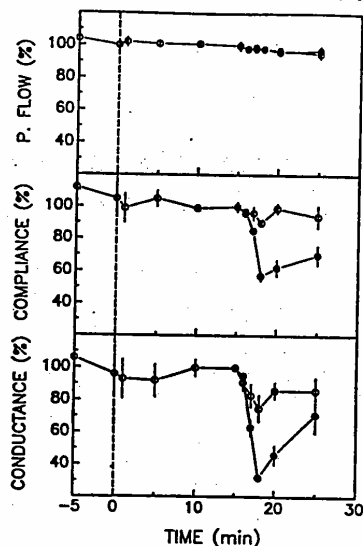


Fig.3-Effetto del trattamento con 3mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> sull'esposizione a 250 di ppm SO<sub>2</sub> del polmone isolato e perfuso. Il solfito di sodio era presente nel perfusato 15 min prima e durante l'esposizione all'SO<sub>2</sub>. SO<sub>2</sub> con (○) e senza (●) Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. I valori indicano la media ± SEM.

L'effetto dell'SO<sub>2</sub> non sembra essere dovuto a modificazioni

del pH sia nel tratto respiratorio(8) che in quello circolatorio (dati non pubblicati).

Una interessante osservazione nei nostri esperimenti è che la broncoconstrizione da  $\text{SO}_2$  appare essere transitoria raggiungendo il massimo effetto dopo alcuni minuti. L'effetto transitorio potrebbe essere dovuto alla formazione di qualche metabolita o alla modificazione di qualche recettore. Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che il pretrattamento con basse concentrazioni di  $\text{SO}_2$  protegge verso alte concentrazioni del gas.

Il solfito è un composto che si produce dal contatto dell' $\text{SO}_2$  con l'acqua. Nel presente lavoro abbiamo mostrato come questo metabolita dell' $\text{SO}_2$  che di per se non induce broncoconstrizione sia in grado di proteggere nei confronti dell'effetto indotto dall' $\text{SO}_2$ .

Il solfito è una sostanza fortemente nucleofila con una spiccata reattività per i gruppi disolfuri delle proteine. Numerose attività proteiche dipendono per la loro attività dallo stato redox dei loro gruppi sulfidrilici(9). Basse concentrazioni di  $\text{SO}_2$  e il solfito potrebbero esercitare la loro azione modificando l'attività di qualche recettore. Anche la suscettibilità dei pazienti asmatici potrebbe essere dovuta a modificazioni dei gruppi sulfidrilici dei recettori.

Una interessante osservazione è che il mancato effetto sulla funzione respiratoria da parte di basse concentrazioni di  $\text{SO}_2$  è in grado di modificare la reattività polmonare, forse tramite modificazioni di attività recettoriali. Questo fatto pone degli interrogativi sui livelli di indicatori da usare nello stabilire la dose soglia di una sostanza tossica.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Philip-Joet F: Respiratory effects of pollution. Biomed Pharmacother 1990; 44:443-446
- 2) Zweiman B, Slavin RG, Flinberg Rj, Falliers CJ, Aaron TH: Effects of air pollution on asthma: a review. J All Clin Immunol 1972; 50:305-314
- 3) Frank WR, Amdur MO, Worcester J, Whittenberger JL: Effects of acute controlled exposure to  $\text{SO}_2$  on respiratory mechanics in healthy male adults. J Appl Physiol 1962; 17:252-258
- 4) Nadel JA, Salem H, Tamplin B, Tokiwa Y: Mechanism of bronchoconstriction during inhalation of sulfur dioxide. J Appl Physiol 1965; 20:164-167
- 5) Widdicombe JC: Reflex control of airways smooth muscle. Postgraduate Med J 1975; 51(s7):36-43
- 6) Olafsdóttir K, Atzori L, Ryrfeldt A, Kumlin M, Moldèus P: Mechanisms of hydroperoxide-induced broncho- and vasoconstriction in isolated and perfused rat lung. Pharmacol Toxicol 1991; 68:181-186
- 7) Waldeck J: En Mätmetod för att undersöka läkemedels effekter på luftvägarna. Thesis, Lunds Technical university, Lund, 1987
- 8) Fine JM, Gordon T, Sheppard D: The roles of pH and ionic species in sulfur dioxide and sulfite induced bronchoconstriction. Am Rev Resp Dis 1987; 136:1122-1126
- 9) Cotgreave IA, Weis M, Atzori L, Moldèus P: Glutathione and protein function. In: Glutathione: Metabolism and Physiological functions. (ed. Vina J), CRC Press, Boca Raton, 1990, pp.155-175

## Mechanisms of PCBs Mixture Toxicity on Isolated Rat Hepatocytes

Luigi ATZORI, Costantino FLORE\*, Anna Maria CORRIGA,  
Paolo CHERCHI\*, Duilio CASULA\*, and Luigi CONGIU

*Istituto Patologia General,  
Universita degli Studi, Via Porcell 4, 09100 Cagliari, Italy  
\* Istituto di Medicina del Lavoro, Universita degli Studi  
Via S. Giorgio, 09100 Cagliari, Italy*

(Received July 9, 1990 and in revised form February 4, 1991)

**Abstract:** Exposure of isolated hepatocytes to a polychlorinated biphenyl mixture induced a rapid loss of cell viability. The effect was not dose-dependent. The biochemical effects in the cellular toxicity did not involve glutathione content, protein sulphydryl groups and lipid peroxidation. A transient increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  was observed after exposing the hepatocytes to the polychlorinated biphenyl mixture. Our findings indicate that polychlorinated biphenyls are able to kill hepatocytes and suggest that elevation of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration could be responsible of the toxicity.

**Key words:** Polychlorinated biphenyls mixture—Hepatotoxicity

### INTRODUCTION

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a group of compounds widely used, especially in the past, for their chemical stability, heat resistance and low volatility.<sup>1-3)</sup> For their properties they must be considered as long-life environmental contaminants. These chemically inert compounds tend to accumulate in the organisms, mainly in the fat tissue.<sup>4)</sup> As consequence of PCBs exposure different symptoms are reported, chiefly involving the skin and the immune system, but also the liver. The degree of toxicity is often depending on the number of chlorine on the biphenyl rings,<sup>2)</sup> but still unknown are the mechanisms by which PCBs exert their toxic effect. Due to their low reactivity they are too often considered to be un toxic and few informations are available about their effects on the cells.

In the present study we investigated if a PCBs mixture used as a dielectric oil in tension reducing machines exerted any toxic effect on isolated rat hepatocytes and tried to clarify the mechanism of it.

## MATERIALS AND METHODS

*Chemicals*

The PCBs mixture was characterized by mean of HP5890A gas chromatograph with a 5970 mass selective detector and an ultra 1 capillary column. It contains approximately 60 different isomers of PCBs with hexachlorobiphenyl being most abundant. The composition of the mixture is the following: 3 Cl: 1%; 4 Cl: 7%; 5 Cl: 23%; 6 Cl: 41%; 7 Cl: 20%; 8 Cl: 2%; 9 Cl: 0%.

Because it was not possible to determine the molecular weight of the mixture the concentration was expressed as part per million (ppm) in the incubation solution.

Collagenase (grade II) was obtained from Boehringer (Mannheim, FRG), the other chemicals of reagent grade were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

*Isolation and incubation of hepatocytes*

Male Wistar rat (200–300 g) which were allowed free access to food and water, were used in this study. Hepatocytes were isolated by the collagenase perfusion method of Moldéus *et al.*<sup>5)</sup>

Yields of 2–4  $10^6$  cells/liver were routinely obtained. Incubations were performed at 37°C using  $10^6$  cells/ml in Krebs-Henseleit buffer (pH 7.4), supplemented with 12.6 mM Hepes, under an atmosphere of 95% O<sub>2</sub>: 5% CO<sub>2</sub>.

The hepatocytes were incubated in buffer containing different concentrations of PCBs dissolved in dimethylsulfoxide. The control experiments were performed in the presence of the dimethylsulfoxide. In some experiments N-acetylcysteine was added 10 min before PCBs.

Aliquots were removed from the incubations flasks at various time intervals and analyzed for cell viability, glutathione and protein sulfhydryl content.

Cell viability was assayed by the Trypan Blue exclusion test. Glutathione content was measured according to Saville<sup>6)</sup> and the protein sulfhydryl groups were determined with the use of dithionitrobenzoic acid according to Sedlak and Lindsay.<sup>7)</sup>

*Measurements of cytosolic Ca<sup>2+</sup>*

Hepatocytes isolated as described were loaded with 5  $\mu$ M Fura 2-tetraacetoxymethylester at 37°C for 20 min. The hepatocytes were then washed three times in a bicarbonate buffer and suspended at a concentration of  $10^6$  cells/ml. After 10 min incubation aliquot of cells were transferred to fluorimetric cuvette. Changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> were monitored in a Sigma ZWII dual wavelength fluorimeter, using the ratio of excitation wavelengths 350/380 nm, with the emission cutoff at 450 nm. Calibrations and calculations of free cytosolic Ca<sup>2+</sup> were performed according to Nicotera *et al.*<sup>8)</sup>

## RESULTS

As shown in Fig. 1 exposure of isolated hepatocytes to the PCBs mixture induces 100% death of the cells. The higher concentrations (1000 and 100 ppm) start to kill the cells after 30 min. In the case of the lower concentrations (10 and 1 ppm) not toxic effects were observed. The effect of PCBs mixture does not seem to be dose-dependent, but it appears that it has to be present at a threshold concentration in order to induce the cell death. On the other hand, the maximal effect is reached after 60 min by using 1000 ppm PCBs mixture and after 120 min by using 100 ppm PCBs mixture, this suggesting a time-dependent effect.

During the first 30 min all the cells, irrespectively of the concentration used, showed at the microscopical evaluation the formation of blebs on the membrane. In the cells treated with the lower concentrations they disappeared after 30 min; while in the case of the cells treated with the higher concentrations the hepatocytes started to die after 30 min.

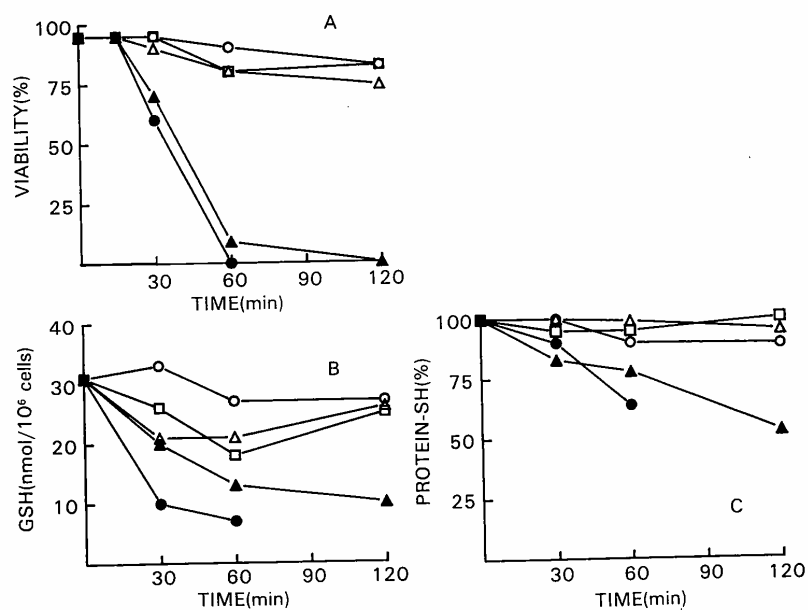


Fig. 1. Effect of PCBs mixture on viability (a), glutathione (b) and protein sulfhydryl (c) content in isolated hepatocytes. Cells were incubated either alone (○—○) or with the following concentration of PCBs mixture: 1000 ppm (●—●), 100 ppm (▲—▲), 10 ppm (△—△) or 1 ppm (□—□). One experiment typical of four is illustrated.

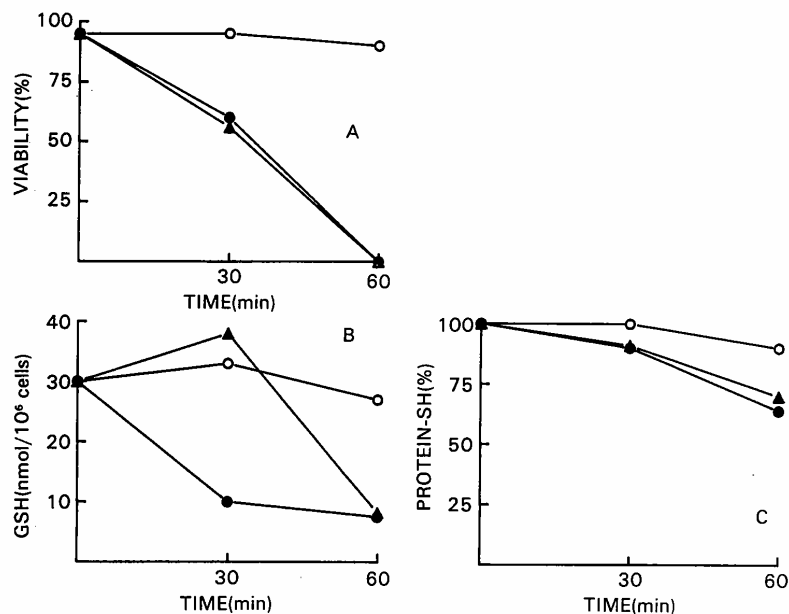


Fig. 2. Effect of NAC on viability (a), glutathione (b) and protein sulfhydryl (c) content in isolated hepatocytes. Cells were incubated either alone (○—○) or with 1000 ppm PCBs mixture (●—●) or with 1 mM NAC plus 1000 ppm PCBs mixture (▲—▲). One experiment typical of three is illustrated.

In order to evaluate a possible role for glutathione in the PCBs mixture induced cytotoxicity its content was also measured. At the concentration of 10 and 1 ppm a transitory depletion (30%) after 30 min it was observed, then the glutathione levels gradually returned to normal and were not different from control after 120 min of incubation. In the cells treated with 1000 and 100 ppm PCBs mixture a more marked depletion in the GSH content was observed during the first hour in parallel to cell death.

Protein sulfhydryl groups are considered to be critical for different cellular functions, small changes in protein sulfhydryl groups may result in cell damage and death.<sup>9)</sup> The content in protein sulfhydryl groups after PCBs mixture incubation was evaluated. When the hepatocytes were exposed to PCBs mixture the lower concentrations did not affect the protein sulfhydryl group content. In the case of the higher concentrations a significant decrease was observed after 60 min at the time in which the viability starts to be greatly affected.

In order to better clarify a possible role for the sulfhydryl groups during the PCBs toxicity, hepatocytes were incubated with 1 mM N-acetylcysteine, a precur-

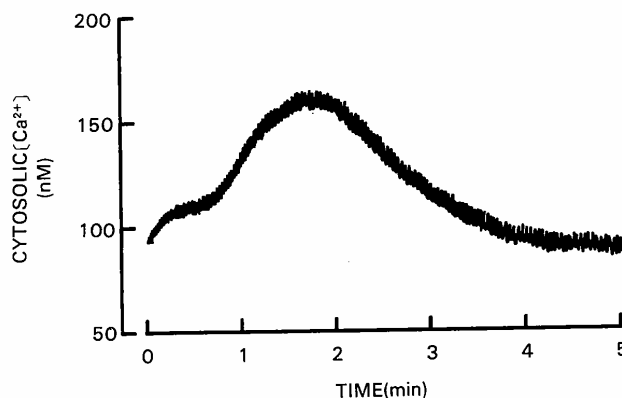


Fig. 3. Cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in isolated hepatocytes exposed to 1000 ppm PCBs mixture. One experiment typical is illustrated.

sor of glutathione and a good reducing agent, and 1000 ppm PCBs mixture. In association with N-Acetylcysteine PCBs mixture does not deplete the glutathione content after 30 min, but not protection is observed on the cell viability. After 120 min the treatment with PCBs mixture also in the presence of N-acetylcysteine induced 100% mortality and the glutathione content is similar to the PCBs mixture alone treated hepatocytes. Coincubation of PCBs mixture and N-acetylcysteine gave similar protein sulfhydryl group content compared to PCBs mixture alone.

For measuring the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration the isolated hepatocytes were loaded with Fura-2 prior to treatment with 1000 ppm PCBs mixture. As shown in Fig. 3 addition of 1000 ppm PCBs mixture to the hepatocytes increase the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  content. The increase in the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration occurs into the first minutes after exposure to PCBs, then modifications are not observed in the  $\text{Ca}^{2+}$  content up to 20 min.

#### DISCUSSION

The results of this study demonstrate that exposure to a PCBs mixture ordinarily used by workers is able to induce the death of isolated hepatocytes. The result is quite relevant when considering that the liver is not considered to be particularly sensitive to PCBs exposure, if compared to immune system and skin. The concentration response curve to the PCBs mixture was very steep. By observing the curves of cytotoxicity, it appears that the cells have to be exposed to a critical concentration to activate some killing mechanism. In terms of viability the effect seems to be "all or none". In fact when we compare the two

high concentrations (1000 and 100 ppm) they are quite similar in the sense that they induce more or less the same pattern of events, also in the case of the lower concentrations (10 and 1 ppm) the effects are quite similar. Probably the hepatocyte is able to control the effects of PCBs up to a critical concentration, above which the toxic process is started. The observations of the blebs, considered to be an index of cytoskeletal sufference,<sup>10)</sup> also at the lower concentrations and their consequent disappearance should be considered in the sense that the hepatocytes can overcome some of the effects induced by the PCBs mixture.

PCBs are quite inert compounds and undergo to metabolism slowly, therefore their toxicity should be assumed to be direct and not through more reactive metabolites.

Nowadays some events have been proposed as critical for most of the cytotoxic effects occurring in the cells. These processes involve modifications of cellular glutathione levels, oxidation of protein sulfhydryl groups, lipid peroxidation and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  modifications.

By exposing the hepatocytes to the PCBs mixture increase in malondialdehyde, considered to be an index of lipid peroxidation, was not observed (data not shown) except at the time in which the hepatocytes were all dead. Because glutathione is an important factor in controlling the redox status of the cells<sup>9)</sup> investigation was carried on to verify if the cytotoxicity induced by PCBs was associated to glutathione modifications. The level of glutathione depletion achieved with PCBs alone together with the lack of protection by N-acetylcysteine seem to suggest no involvement of glutathione in the PCBs cytotoxicity. The more marked depletion observed after 60 min of exposure is possible to be considered a consequence of the cell death rather than a cause. The same considerations can be drawn in the case of the protein sulfhydryl groups.

Quite important could be the observation of the small and transitory elevation of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration few minutes after exposing the cells to the PCBs mixture. It is well known that intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  modifications are involved in different physiopathological processes. In the recent years Orrenius and coworkers showed the importance of  $\text{Ca}^{2+}$  modifications in cell toxicity by using different models.<sup>11)</sup>

They also demonstrated that 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) was able to induce thymocytes killing by binding to a corticosteroid receptor-like protein. This binding increase the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and bioactivating an endonuclease induce cell death by increasing DNA fragmentation.<sup>12)</sup> This mechanism is probably one overexpression of the physiological process of the apoptosis, which can be induced for instance by glucocorticosteroids. Certainly the strict analogy in terms of chemical structure and biological effects between TCDD and PCBs indicate the possibility that the same events induced by TCDD may take place in the presence of PCBs. Moreover, it has been shown that metabolites of



PCBs bind to a lung protein with characteristics similar to the steroid receptor.<sup>13)</sup> The fact that relatively high concentrations of PCBs bind to a lung protein with characteristics similar to the steroid receptor<sup>13)</sup>. The fact that relatively high concentrations of PCBs are used when compared to TCDD should be explained with the different cell type used, hepatocytes vs. thymocytes. Furthermore, the activation of a critical number of receptor could be necessary to induce the cell death. Studies with PCBs should be performed with thymocytes or immune system cells in order to clarify the mechanisms of PCBs toxicity. Moreover, because PCBs can accumulate in the organism we should also consider that apparently no toxic concentrations can reach by time a dose able to induce pathological effects.

In conclusion, we have shown that PCBs is able to induce cytotoxicity in isolated hepatocytes by a direct mechanism or maybe by a mechanism involving  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge Prof. P. Moldéus for reading the manuscript and Mrs. A. L. Marcus for the typing of it. Special thanks to Dr. K. Olafsdottir, Department of Pharmacology, University of Iceland, Reykjavik, for performing the analysis of the PCBs mixture.

#### REFERENCES

- 1) Fishbein L. Toxicity of chlorinated biphenyls. *Ann Rev Pharmacol* 1974; 14: 139-56.
- 2) Safe S. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology and mechanism of action. *CRC Crit Rev Toxicol* 1984; 12: 319-85.
- 3) Jones GRN. Polychlorinated biphenyls: where do we stand now? *Lancet* 1989; 2:791-4.
- 4) Flore C, Garau VL, Meloni M, Avataneo G, Tocco MG, Cherchi P, Casula D. Contenuto di PCB nel tessuto adiposo di soggetti non esposti professionalmente. *Med Lav* 1989; 80: 132-5.
- 5) Moldéus P, Högborg J, Orrenius S. Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol* 1978; 152: 60-71.
- 6) Saville B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* 1958; 83: 670-2.
- 7) Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
- 8) Nicotera PL, Thor H, Orrenius S. Cytosolic-free  $\text{Ca}^{2+}$  and cell killing in hepatoma 1c1c7 cells exposed to chemical anoxia. *FASEB J.* 1989; 3: 59-64.
- 9) Bellomo G, Orrenius S. Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology* 1985; 5: 876-82.
- 10) Jewell SA, Bellomo G, Thor H, Orrenius S, Smith MT. Bleb formation in hepatocytes during metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* 1982; 217: 1257-9.
- 11) Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera PL. Role of  $\text{Ca}^{2+}$  in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10: 281-5.
- 12) McConkey DJ, Hartzell P, Duddy SK, Håkansson H, Orrenius S. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin kills immature thymocytes by  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated endonuclease activity. *Science* 1988; 242:

- 256-9.
- 13) Lund J, Nordlund L, Gustafsson J-Å. Partial purification of a binding protein for polychlorinated biphenyls from rat lung cytosol: Physicochemical and immunochemical characterization. *Biochemistry* 1988; 27: 7895-901.

21



*Metabolismo della Cellula in Patologia  
Spontanea e Sperimentale*

---

Modena, 28 - 31 Ottobre 1990



B9

## MECCANISMI DI VASO- E BRONCOCOSTRIZIONE INDOTTI DA IDROPEROSSIDI NEL POLMONE ISOLATO E PERFUSO DI RATTO.

Atzori L.<sup>1,2</sup>, Ryrfeldt A.<sup>1</sup>, Corrigan A.M.<sup>1</sup>, Congiu L.<sup>2</sup>, Moldéus P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipart. Tossicologia, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; <sup>2</sup>Istituto Patologia Generale, Università Degli Studi, Cagliari, Italy.

Un notevole ruolo nella genesi di eventi patologici polmonari è svolto da processi ossidativi (1). Specie attive dell'ossigeno quali il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ), l'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e il radicale idrossilico ( $OH^{\cdot}$ ) si producono nel corso di diversi processi biologici. Oltre che tramite un meccanismo diretto recenti studi hanno indicato che le specie attive dell'ossigeno sarebbero capaci di esercitare il loro danno a livello polmonare stimolando la produzione di metaboliti dell'Acido Arachidonico (AA) (es. trombossano, prostacicline, leucotrieni). Nel presente lavoro abbiamo studiato gli effetti di diversi idroperossidi sul polmone isolato e perfuso di ratto e cercato di chiarire i meccanismi della loro azione.

### Materiali e Metodi

Il polmone era isolato da ratti maschi Wistar, perfuso e ventilato come descritto precedentemente (2). Le variazioni di pressione polmonare e di flusso aereo a livello della trachea venivano monitorizzate per ottenere la compliance dinamica e la conduttanza. Il volume del perfusato veniva quantizzato da un flussometro. Il contenuto di trombossano e prostacicline era misurato con metodo radioimmunologico usando  $TXB_2$  e 6 Keto  $PGI_{\alpha}$  RIA kit (Du Pont).

B10

# Risultati e Discussione

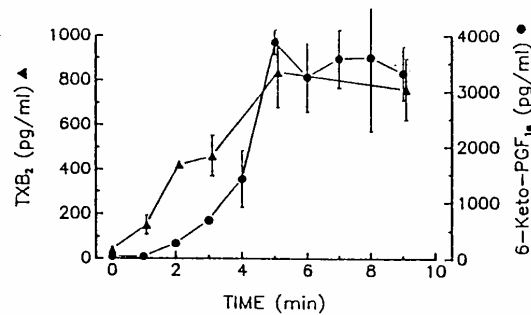
La somministrazione di  $H_2O_2$ , terbutilidroperossido, cumeneidroperossido, acido idroperossilinoico e estere etilico dell'acido idroperossilinoico nel liquido di perfusione del polmone di ratto causa, con diversa intensità, una diminuzione della compliance, della conduttanza e del flusso circolatorio (Tab. I) e comparsa di edema.

Tab. I. Effetto di diversi idroperossidi (500  $\mu$ M) sulla meccanica del polmone perfuso di ratto.

Hydroperoxide (n)	P. Flow	% Initial value	
		Compliance	Conductance
$H_2O_2$ (5)	62.8 $\pm$ 8.0	52.5 $\pm$ 8.2	46.2 $\pm$ 5.7
TBH (5)	52.2 $\pm$ 7.6	56.8 $\pm$ 6.8	40.0 $\pm$ 6.3
CuOOH (2)	79.5 $\pm$ 4.5	76.5 $\pm$ 4.5	52.8 $\pm$ 1.3
LAEOOH (2)	87.5 $\pm$ 7.5	91.9 $\pm$ 3.2	74.1 $\pm$ 5.9
LAOOH (2)	89.0 $\pm$ 6.0	97.0 $\pm$ 1.0	97.0 $\pm$ 1.0

I valori sono presi al massimo della risposta dopo la somministrazione dell'idroperossido.

Gli idroperossidi causano un aumento tempo-dipendente dei livelli di trombassano e prostaciline nel liquido di perfusione (Fig. 1).



Il pretrattamento con antiossidanti (es. DPPD) attenua gli effetti indotti dagli idroperossidi sul polmone, ma anche la vaso- e broncocostrizione e l'edema indotto dall'AA (Tab. II).

Tab. II. Effetto del DPPD sulla produzione di  $TXB_2$  da parte di  $H_2O_2$  o AA nel polmone perfuso di fatto.

Treatment		$TXB_2$ (pg/ml)
Control	(3)	$12 \pm 2.5$
$H_2O_2$	(11)	$1111 \pm 95$
$H_2O_2$ + DPPD	(3)	$213 \pm 26$
AA	(3)	$2672 \pm 444$
AA + DPPD	(3)	$686 \pm 138$

Il dato sembrerebbe indicare che gli antiossidanti agiscono su radicali formati durante il metabolismo dell'AA.

In conclusione, questi risultati indicano che gli idroperossidi inducono vaso- e broncocostrizione e edema tramite una aumentata produzione di trombossano.

Il meccanismo con il quale gli idroperossidi inducono il rilascio di AA non è chiaro e al momento esistono diverse ipotesi.

#### Bibliografia

- 1) Taylor A.E. et al., in: "The pulmonary circulation and acute lung injury". (Said Ed.), N.Y., pp. 307-320, 1985.
- 2) Ryrfeldt A. et al., Life Sci. 42, 1439-1445, 1988.

22



FONDAZIONE GIOVANNI LORENZINI

7th International Conference on  
**PROSTAGLANDINS**  
**AND RELATED COMPOUNDS**

Florence (Italy), May 28-June 1, 1990

Palazzo dei Congressi - Centro Affari  
Piazza Adua, 1

---

ABSTRACT BOOK

---

**Influence of Thromboxane A<sub>2</sub> on Rat Pulmonary Tissue in vivo.**

Tadashi Arima, Moto Matsuura, Tatsuhiko Shiramatsu, Isao Matsumoto Takao Mori  
Department of Anesthesiology, Saitama Medical School  
(38 MOROHONGO MOROYAMA-MACHI, IRUMA-GUN, SAITAMA-KEN, 350-04 JAPAN)

Both plasma and urinary thromboxane A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>) levels are known to increase during septic shock and their degree to correlate with the severity of shock, suggesting its possible involvement in the pathogenesis of respiratory distress syndrome(RDS). The purpose of this study was to examine the influence of TXA<sub>2</sub> on the pulmonary tissue in vivo and its possible pathogenic participation in RDS. Method: Anesthetized male wistar rats were divided into 6 groups including TXA<sub>2</sub> untreated and 30, 50, 100, 150 and 200 µg/kg treated groups. TXA<sub>2</sub> at a volume of 0.5ml was given through the tail vein followed by 1 hour observation period. The animals were then killed by 100mg/kg of i.p. pento-barbital and the lung specimen was pathologically examined under microscope. Results: Characteristic findings common to TXA<sub>2</sub> treated groups included various in degree of hydrops in the perivascular region of the pulmonary parenchyma, which further progressed to alveolar hydrops, perivascular hemorrhage in the pulmonary parenchyma, capillary hemorrhage of the alveolar septum and detachment of the alveolar epithelium with the increased doses. Hydrops around the pulmonary vessel tended to originate in the surroundings of small artery and vein along the bronchiole or small bronchus followed by its extension and aggravation. Consideration: These changes noted in this study are considered to be TXA<sub>2</sub>-induced acute circulatory disturbances. In a biological state showing abnormally increased TXA<sub>2</sub>, pulmonary vasoconstriction and its accompanying pulmonary hydrops were suggested to have a pathogenic role in the appearance of RDS.

**HYDROGEN PEROXIDE INDUCED BRONCHO- AND VASOCONSTRICTION IN ISOLATED PERFUSED AND VENTILATED RAT LUNG. ROLE OF THROMBOXANE AND SULFHYDRYL GROUPS.**

L. Atzori, K. Olofsdottir, A. Ryrfeldt, A.M. Corrigan and P. Moldéus.  
Department of Toxicology, Karolinska Institutet, Box 60400, S-104 01 Stockholm, Sweden.

Oxygen-derived free radicals are important mediators released during inflammation. Recently we found that hydroperoxides can induce vaso- and bronchoconstriction in the isolated perfused and ventilated rat lung. Infusion of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (0.5 mM) into the lung circulation induced vasoconstriction (50%), bronchoconstriction (60%) and edema. These effects were associated with the release of TxB<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1α</sub>. Similar effects to those induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were observed with arachidonic acid (AA) and a thromboxane analogue. The effects induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AA and the thromboxane analogue were attenuated by pretreatment of the lung with a thromboxane antagonist, implying that thromboxane plays a central role in the lung injury caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pretreatment of the lung with diamide, a well known sulfhydryl-oxidizing compound, blocks the effect induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AA and the thromboxane analogue but not the effect of serotonin and bradykinin, indicating a specific role for sulfhydryl groups in controlling thromboxane signal transduction.



**DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA RELATIVA ALL'ATTIVITÀ DI AGGIORNAMENTO E DI FORMAZIONE. ( DPR n° 445/2000)**

Ai sensi degli artt. 46 e 47, D.P.R. n. 445 del 28.12.2000 e succ. mod. ed int.  
 La sottoscritta Anna Maria Natalia Corriga nata a Meana Sardo, (Prov. NU), il 22/12/1960, residente in \_\_\_\_\_,  
 consapevole delle sanzioni penali cui può andare incontro, nel caso di dichiarazioni mendaci, di formazione o uso di atti falsi, richiamate dall'art.  
 76 del D.P.R. n° 445/2000

**DICHIARA**

- Di aver effettuato i seguenti soggiorni di studio o di addestramento professionale per attività attinenti alla disciplina nelle seguenti strutture italiane o straniere ( indicare, per ciascun periodo di soggiorno/ addestramento/ frequenza: denominazione completa della struttura, periodo di frequenza della stessa, finalità della frequenza e se inviati dall'Azienda di appartenenza mediante l'Istituto del comando per aggiornamento)

N.	DENOMINAZIONE ENTE O AZIENDA CHE ORGANIZZATO IL PERCORSO FORMATIVO	PERIODO DI FREQUENZA	FINALITÀ DELLA FREQUENZA	COMANDO (SI/NO)
1	Karolinska Institutet – Department of Toxicology	Febbraio 1989 27/03/1991	Ricerca e formazione	no

- Di aver partecipato ai seguenti corsi, congressi, convegni e seminari ect. ( specificare per ogni corso, congresso, convegno e seminario ect.: l'organizzatore, il titolo, il luogo e le date di svolgimento, se la partecipazione è intervenuta in qualità di relatore/docente o in qualità di discente e, con riguardo, ai corsi/seminari se si è sostenuto, qualora previsto, l'esame finale)

N.	DENOMINAZIONE ENTE O AZIENDA CHE ORGANIZZATO IL PERCORSO FORMATIVO	LUOGO E PERIODO DI SVOLGIMENTO	DENOMINAZIONE PERCORSO FORMATIVO	RUOLO SVOLTO (PRECISARE SE RELATORE, DOCENTE, DISCENTE)	ESAME FINALE (SI/NO)
	Istituto Superiore di Sanità – Roma	ROMA- 9-13 Settembre 1996	Corso di base in Epidemiologia	discente	sì
1	Istituto Superiore di Sanità – Roma	ROMA- 23 – 27 Settembre 1996	Corso avanzato in Epidemiologia	discente	sì

**ALLEGATO F**

3	Istituto Superiore di Sanità – Roma	ROMA- 2-6 Dicembre 1996	Corso di Epidemiologia Ambientale	discente	si
4	organizzato da Fondazione Medtronic Italia, presso l'Azienda Ospedaliera "G. Brotzu	10-11 Ottobre e 14-15 Novembre 2002 – Cagliari	"Evoluzione e valorizzazione personale e di team"	discente	si
5	Società Italiana Studio Arteriosclerosi – Sezione Sardegna	Monerrato (CA) 23/11/2002	VI Riunione Scientifica Annuale Società Italiana Studio Arteriosclerosi	discente	si
6	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari 2002	Corso aggiornamento professionale obbligatorio per Coordinatori infermieristici; materia: - "Valutazione della qualità" (n° 4 ore) X	Docente	si
6	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari 2002	Corso aggiornamento obbligatorio per Infermieri Area Chirurgica materia: - "La pianificazione del lavoro" (n° 6 ore) X	Docente	si
6	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari 2002	Corso aggiornamento obbligatorio per Infermieri Area Internistica; materia: - "La pianificazione del lavoro" (n° 4 ore) X	Docente	si
6	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari 2002	Corso aggiornamento obbligatorio per Infermieri Area Pediatrica; materia: - "La pianificazione del lavoro" (n° 1 ora) X	Docente	si
6	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari 2002	Corso aggiornamento professionale obbligatorio per Tecnici di Laboratorio; materia: - "La pianificazione del lavoro" (n° 4 ore) X	Docente	si
6	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari 2002	Corso aggiornamento professionale obbligatorio per Tecnici di Radiologia; materia: - "La pianificazione del lavoro" X	Docente	si

**ALLEGATO F**

			(n° 2 ore)		
6	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari 2002	Corso aggiornamento professionale obbligatorio per O.T.A. e A.S.S.; materia: -"Il comfort in ospedale" (n° 5 ore)	Docente	si
7	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari 2002	Corso aggiornamento professionale obbligatorio per operatori infermieri e tecnici; materia: - "Elaborazione scheda valutazione del personale" (n° 4 ore)	Docente	si
8	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari 13-14 Marzo 2003 20-21 Marzo 2003	Corso di formazione manageriale per dirigenti sanitari	Discente	si
9	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari 26-maggio 2003	Trattamento appropriato dell'arresto cardiaco	Discente	si
10	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari Novembre- Dicembre 2003	Corso di aggiornamento sulle infezioni Ospedaliere per Coordinatori infermieri; materia : "Il rischio biologico negli operatori sanitari" ( n° 4 ore)	Docente	si
11	Organizzato dall'A.S.L. 8 - CA	Cagliari 26/05/04	Giornate Nazionali donazione e trapianto d'organo: "Informazione e sensibilizzazione sulla donazione d'organo."	Discente	no
12	Organizzato dall'A.S.L. 8 – CA	Cagliari 28/05/04	Corso di formazione "La morte encefalica e la donazione di organi"	Discente	si
13	Sardiniammeeting con Ematologia e CTMO, P.O. Binaghi – ASL 8	Cagliari 04-06-04	Corso di aggiornamento "Management delle infezioni fungine nel paziente critico	Discente	si
14	organizzato da AIPO (Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri),	Cagliari 30-06-04	Corso di formazione: "La fibrosi polmonare idiopatica	Discente	si
15	Provider: I.E.M.S.S. geie (codice corso n°S 952)	Anno 2004	Attività di tipo FAD: - Introduzione alla qualità in sanità (valutazione superata il 24-8-04	Discente	si
16	Società Italiana Studio Arteriosclerosi – Sezione Sardegna	Monerrato (CA) 2/10/2004	Convegno "Rischio cardiovascolare"	Discente	no

**ALLEGATO F**

17	organizzato da "Casa di carità arti e mestieri"	Cagliari dal 29/09/04 al 17/12/04	Corso di formazione: C8 Gestione del rifiuto sanitario", Corso di formazione: "Radioprotezione- Corso di formazione per il personale operante con radiazioni ionizzanti D. Lgs. 230/95"	Discente	si
18	Organizzato dall'A.S.L. 8 – CA	Cagliari 03/12/04		Discente	si
19	Organizzato dall'A.S.L. 8 – CA	Cagliari 02/12/04 09/12/04 13/12/04	Corso di formazione: "Le regole della comunicazione interpersonale"	Discente	si
20	Organizzato da Università degli Studi di Cagliari	Cagliari 28/04/05	Convegno: "Asma e attività motoria: perché tanta paura?"	Discente	no
21	RUPAR Formazione	Cagliari 19/04/05 26/04/05 03/05/05 10/05/05 17/07/05	Corso: linguaggi e strumenti di comunicazione pubblica e istituzionale e diritto all'informazione.	Discente	no
22	Società Italiana Studio Arteriosclerosi	Cagliari 9/10/05	Convegno: "Salute e Ambiente"	Discente	si
23	organizzato dall'Azienda Ospedaliera "Blanchi-Melacrino-Morelli" di Reggio Calabria (I)	Reggio Calabria (I) 10/11/05	Corso di formazione per Dirigenti Sanitari : "Il Risk management nelle Aziende Ospedaliere" Argomento trattato: "Controllo delle infezioni nosocomiali: un aspetto multidisciplinare".	Docente	Si
24	organizzato dall'Azienda Ospedaliera G. Brotzu	Cagliari 28/11/05	Corso "Trattamento appropriato dell'arresto cardiaco	Discente	si
25	Organizzato dall'A.S.L. 8 – CA	Cagliari 13 /11/06 16/11/06 20/11/06 30/11/06	Corso di formazione: "Comunicazione e relazione d'aiuto"	Discente	si
26	Regione Autonoma Sardegna (R.A.S.)	Cagliari 01/02/07	Convegno Informativo Medir: "Rete dei Medici di Medicina Generale/Pediatri di Libera Scelta e Fascicolo Sanitario Elettronico"	Discente	no

**ALLEGATO F**

27	SIDERA s.r.l.	Cagliari 8-9/06/07	Corso di formazione: "Il Risk Management in oncologia: prospettive di sviluppo e applicazioni"	Discente	si
28	Regione Autonoma Sardegna (R.A.S.)	Cagliari 22/07/08	Incontro di presentazione del "Progetto SISAR – avvio del CUP nell'area della provincia di Cagliari"	Discente	no
29	promosso dalla Regione Autonoma Sardegna,  Lotto 1 Corso n° 070091 (Determina n° 31879/2251/FP del 19/07/07)	Cagliari Da gennaio 08 a novembre 08	CORSO IPOCRATE: Progetto di formazione per Dirigenti "Integrazione delle politiche nella gestione organizzativa delle reti di presa in carico dei cittadini/utenti del Servizio Sanitario: – "La qualità, l'appropriatezza dei servizi e delle cure e la centralità del cittadino"; – "Metodi e strumenti per il governo in rete del sistema"; – "Programmazione, valutazione e gestione dei servizi manageriali"	Discente	si
30	Organizzato dall'A.S.L. 8 – CA	Selargius -Cagliari 18/03/09	Progetto Formativo Aziendale: "Il Risk Management, il Patient Safety e la gestione del rischio clinico"	Discente	no
31	organizzato da A.M.N.D.O. (Associazione Nazionale dei Medici delle Direzioni Ospedaliere)	Roma 19-20 Marzo 2009	6° Convegno Nazionale sulle Sale Operatorie: "IL Teatro Operatorio – scene, copioni ed attori del futuro"	Discente	si
32	Organizzato dall'A.S.L. 8 – CA	Cagliari 8/04/09	Progetto Formativo Aziendale: "Il Risk Management, il Patient Safety e la gestione del rischio clinico: aspetti legali ed assicurativi"	Discente	no
33	organizzato da "Scuola di Direzione Aziendale dell'Università Bocconi" per la ASL n°8 - CA	Cagliari Dal 9/09/08 Al 03/02/09 (10 Giorni)	Progetto Formativo Aziendale: "Le Direzioni sanitarie di presidio. Competenze tecniche, organizzative e gestionali"	Discente	no
34	Organizzato dall'A.S.L. 8 – CA	Cagliari 19-20 novembre 2010	Progetto Formativo Aziendale: "Organizzare e gestire la sicurezza nei Presidi Ospedalieri: funzioni e compiti della"	Discente	si

**ALLEGATO F**

			direzione sanitaria del presidio"		
35	Organizzato dall'A.S.L. 8 – CA	Cagliari 20/01/11	Progetto Formativo Aziendale: "Corso di Formazione in radioprotezione dei lavoratori e della popolazione – D.Lgs. 230/95 e s.m.i."	Discente	si
36	Organizzato dall'A.S.L. 8 – CA	Cagliari 05/05/11	Progetto Formativo Aziendale: "Infezioni correlate all'assistenza: epidemiologia, patogenesi ed evidenze per una prevenzione efficace"	Discente	si
37	Organizzato dall'A.S.L. 8 – CA	Cagliari Dal 20/12/10 Al 14/06/11	Progetto Formativo Aziendale: Corso "Prevenire la sindrome di Burn Out tra gli operatori sanitari che operano in contesti critici"	Discente	si
38	Organizzato dall'A.S.L. 8 – CA	Cagliari Dal 08- Marzo 12 Al 23 Marzo 12	Progetto Formativo Aziendale: "La comunicazione in Ospedale: fondamento della crescita tra operatori e nel rapporto con il paziente."	Discente	si
39	Regione Autonoma Sardegna (R.A.S.)	Cagliari 19/06/12	Convegno Nazionale: Il nuovo sistema sanitario per la Sardegna- Azioni strategiche per il prossimo triennio	Discente	no
40	organizzato da In Progress (Associazione Scientifica e Culturale per la Formazione nel Pubblico Impiego)	Cagliari 19/10/12	Corso di formazione: " Anatomia di un processo per responsabilità sanitaria: dall'onere della prova alla sentenza, dall'avviso di garanzia all'accertamento autoptico"	Discente	si
41	organizzato da TALENT eventi formativi	Cagliari 27/11/12	Corso di Formazione: " salute, sostenibilità, innovazione: l'incontro è nella qualità"	Discente	no
42	organizzato da Associazione Uniti per la Vita	Cagliari 11/04/13	Giornata di studio: "Elaborazione del lutto oncologico"	Discente	no

Il sottoscritto dichiara di essere a conoscenza dell'art. 75 del d.p.r. 445/00, relativo alla decadenza dai benefici eventualmente conseguenti al provvedimento emanato qualora l'Asl n. 8, a seguito di controllo, verifici la non veridicità del contenuto della presente dichiarazione. Il sottoscritto, ai

**ALLEGATO F**

sensi del D.Lgs. 196/03 accorda il consenso affinché i propri dati possano essere trattati ed essere oggetto di comunicazione a terzi al fine di provvedere agli adempimenti di obblighi di legge.

Cagliari, 23/04/2013

Il Dichiarante \*

AMEG

\* la sottoscrizione deve essere apposta in presenza del dipendente addetto o del responsabile del procedimento. In luogo di tali modalità di sottoscrizione il dichiarante può allegare alla dichiarazione fotocopia di un documento di riconoscimento in corso di validità.

**ALLEGATO G**

**DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA  
RELATIVA ALL'ATTIVITÀ DI DOCENZA.**

**( DPR n° 445/2000)**

Ai sensi degli artt. 46 e 47, D.P.R. n. 445 del 28.12.2000 e succ. mod. ed int.

La sottoscritta Anna Maria Natalia Corrigan nata a Meana Sardo, (Prov. NU), il 22/12/1960 residente in Meana Sardo, consapevole delle sanzioni penali cui può andare incontro, nel caso di dichiarazioni mendaci, di formazione o uso di atti falsi, richiamate dall'art. 76 del D.P.R. n° 445/2000

**D I C H I A R A**

☒ Di aver avuto gli incarichi di insegnamento: "Scienze Management Sanitario 1" e "Scienze Management Sanitario 2", dall'Università degli Studi di Cagliari – Facoltà di Medicina – Corso di Laurea in Tecniche di Radiologia Medica per Immagini e Radioterapia, per l'anno Accademico 2012/2013, per complessive 16 ore ;

☒ Di aver svolto attività didattica presso l'Azienda Ospedaliera "Bianchi-Melacrino-Morelli", nell'anno 2005, nel Corso di Formazione per Dirigenti Sanitari, "Risk Management nelle Aziende Ospedaliere" :  
avente per argomento: "Controllo delle infezioni nosocomiali: un aspetto multidisciplinare" per n° 1 ora ;

☒ Di aver svolto attività didattica presso l'Azienda Ospedaliera "G. Brotzu", nel Corso di formazione, accreditato ECM, per Coordinatori Infermieristici, avente per argomento: "Il rischio biologico negli operatori sanitari", per n° 4 ore -anno 2003;.

☒ Di aver svolto, nell'anno 2002, attività didattica presso l'Azienda Ospedaliera "G. Brotzu", nel Corso di aggiornamento obbligatorio, accreditato ECM, per:

- Coordinatori infermieristici

avente per argomento: "Valutazione della qualità", (per n° 4 ore); *Va Dich. Acc. ECM*

- Infermieri Professionali Area Chirurgica ( 6 ore); ☒

- Infermieri Professionali Area Internistica ( 4 ore); ☒

- Infermieri Professionali Area Pediatrica (n° 1 ora); ☒


- Tecnici di Laboratorio ( n° 4 ore) ☒

- Tecnici di Radiologia (n° 2 ore) ☒



avente per argomento" La pianificazione del lavoro";

- operatori OTA ASS

avente per argomento:"Il comfort in ospedale", (per n° 5 ore). 

✕ Di aver svolto attività didattica presso l'Azienda Ospedaliera "G. Brotzu", nel Corso di aggiornamento professionale obbligatorio, con crediti ECM, per operatori infermieristici e tecnici, avente per argomento:"Elaborazione scheda valutazione del personale", per n° 4 ore. – anno 2002;

✕ Di aver svolto attività didattica presso l'Università degli Studi di Cagliari – Facoltà di Medicina – per gli studenti del Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia nell'Anno Accademico 1998-1999, un Seminario Teorico-Pratico avente per argomento: -"Coperture vaccinali".

Il sottoscritto dichiara di essere a conoscenza dell'art. 75 del d.p.r. 445/00, relativo alla decadenza dai benefici eventualmente conseguenti al provvedimento emanato qualora l'Asl n. 8, a seguito di controllo, verifichi la non veridicità del contenuto della presente dichiarazione. Il sottoscritto, ai sensi del D.Lgs 196/03 accorda il consenso affinché i propri dati possano essere trattati ed essere oggetto di comunicazione a terzi al fine di provvedere agli adempimenti di obblighi di legge.

Cagliari, 23/04/2013

Il Dichiarante \* 

\* la sottoscrizione deve essere apposta in presenza del dipendente addetto o del responsabile del procedimento. In luogo di tali modalità di sottoscrizione il dichiarante **può allegare alla dichiarazione fotocopia di un documento di riconoscimento in corso di validità.**



KAROLINSKA INSTITUTET  
Department of Toxicology

Professor Peter Moldéus

1

Anna Maria Corrigan has worked as a research associate at the Department of Toxicology, Karolinska Institute, from February 1989 until end of March 1991. She has primarily worked with an isolated perfused lung model. She has studied the mechanisms of hydroperoxide induced broncho- and vaso-constriction as well as the mechanisms of sulfur dioxide induced lung injury. Anna Maria Corrigan has contributed significantly to the progress of these projects.

Stockholm, March 27, 1991

Peter Moldéus

Mailingaddress  
Box 60400  
S-104 01 STOCKHOLM  
SWEDEN

Visitingaddress  
Tomtebodavägen 30  
Karolinska Institutet, Solna

Telephone  
+46 8 728 75 80  
+46 8 728 64 00

Fax  
+46 8 33 44 67



# Istituto Superiore di Sanità

Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

Si attesta che ANNA MARIA CORRIGA ha frequentato il

## Corso di base in EPIDEMIOLOGIA

organizzato da questo Istituto e tenutosi in data 9 - 13 settembre 1996

IL DIRETTORE DELLA SEGRETERIA  
PER LE ATTIVITA' CULTURALI f. f.

*te. c. cal.*



I DIRETTORI DEL CORSO  
P. PASQUINI, M. SZKLO

*P. Pasquini* / *M. Szklo*



2

# Istituto Superiore di Sanità

Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

Si attesta che ANNA MARIA CORRIGA ha frequentato il

## Corso avanzato in EPIDEMIOLOGIA

organizzato da questo Istituto e tenutosi in data 23 - 27 settembre 1996

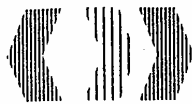
IL DIRETTORE DELLA SEGRETERIA  
PER LE ATTIVITA' CULTURALI f. f.

*U. C. Cal*



I DIRETTORI DEL CORSO  
P. PASQUINI, M. SZKLO

*P. Pasquini* *M. Szklo*



3

Istituto Superiore di Sanità

Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

Si attesta che ANNA MARIA N. CORRIGA ha frequentato il

VII CORSO DI  
EPIDEMIOLOGIA AMBIENTALE

organizzato da questo Istituto, in collaborazione con Ente Per Le Nuove  
Tecnologie, L'Energia E L'Ambiente (ENEA), e tenutosi in data 2 - 6 dicembre  
1996

IL DIRETTORE DELLA SEGRETERIA  
PER LE ATTIVITA' CULTURALI



I DIRETTORI DEL CORSO  
P. COMBA, M. DI PAOLA

*P. Comba* *M. Di Paola*



***Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità***

Premesso che la *Commissione Nazionale per la Formazione Continua* ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo denominato

***EVOLUZIONE E VALORIZZAZIONE PERSONALE E DI TEAM***

organizzato da Fondazione Medtronic Italia e tenutosi a Cagliari, dal 10 al 11 ottobre 2002 e dal 14 al 15 novembre 2002, assegnando all'evento stesso

**N. 29 (ventinove) Crediti Formativi E.C.M.**

(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

il sottoscritto

***Ing. Marco Gattini Bernabò***

Rappresentante legale dell'organizzatore

Verificato l'apprendimento del partecipante

**ATTESTA**

che la

***Dr.ssa Annamaria Corriga***

in qualità di Medico- Direzione Sanitaria  
ha conseguito:

**N. 29 (ventinove) Crediti formativi per l'anno 2002\***

Milano, li 14 luglio 2003

***Ing. Marco Gattini Bernabò***  
**Fondazione Medtronic Italia**

RAPPRESENTANTE LEGALE  
DELL'ORGANIZZATORE

\*per l'anno 2002 i crediti da acquisire sono 10: minimo 5 crediti formativi ,massimo 20 crediti formativi.



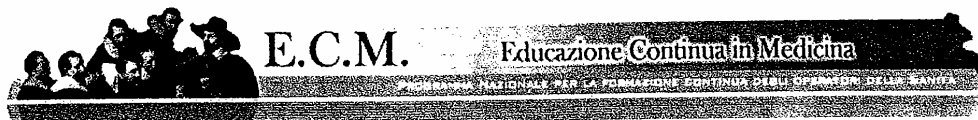
Ministero della salute



S.I.S.A.

Società Italiana Studio Arteriosclerosi

5



**La Commissione Nazionale per la Formazione Continua  
ha assegnato**

**VI riunione scientifica annuale S.I.S.A.-Regione Sardegna**

tenutosi a Monserrato il 23 novembre 2002

n. 7 Crediti Formativi E.C.M.

**La Commissione Nazionale per la Formazione Continua  
pertanto conferisce al**

**Dott. Anna Maria Corrigan**

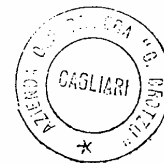
**N° 7 (sette) Crediti Formativi per l'anno 2002**

**Responsabili dell'evento  
Presidente e Segretario S.I.S.A. Sardegna  
Prof. S. Bessi e Dott. B. Batetta**

*B. Batetta*



AZIENDA OSPEDALIERA G. BROTZU  
CAGLIARI



6

Prot. n° 3285

Cagliari, 22 NOV. 2002

Si certifica

che la Dr.ssa Anna Maria N. Corrigan,  
ha effettuato in qualità di docente, per il Corso di Aggiornamento  
Obbligatorio in corso di accreditamento ECM, i seguenti argomenti:

➤ "Valutazione della qualità":

- nel Corso per Coordinatori Infermieristici per un totale di n° 4 ore;

➤ "Pianificazione del Lavoro":

- nel Corso per Infermieri Professionali area Chirurgica per n° 6 ore;
- nel Corso per Infermieri Professionali area Internistica per n° 4 ore;
- nel Corso per area Pediatrica per n° 1 ora;
- nel Corso per Tecnici di Laboratorio per n° 4 ore;
- nel Corso per Tecnici di Radiologia per n° 2 ore;

➤ "Comfort in ospedale":

- nel corso per OTA ASS, per un totale di n° 5 ore;
- per un totale complessivo di n° 26 ore.

IL DIRIGENTE SANITARIO DI PRESIDIO  
Dr.ssa Marinella Spissu



7



Prot N ° 5778

Cagliari 31.03.03

**AZIENDA OSPEDALIERA G. BROTZU**

**Visti gli atti d'ufficio si certifica**

**che il Sig./Dr. Corriga Anna Maria nata il 22.12.1960 insegnato nel:**

**CORSO DI AGGIORNAMENTO PROFESSIONALE OBBLIGATORIO PER  
OPERATORI INFERMIERISTICI -TECNICI CON CREDITI E.C.M.**

**nell'anno 2002**

**il seguente argomento: Elaborazione scheda valutazione del personale - n° ore 4**

**Il Direttore Amministrativo  
Dr. Maurizio Calamida**





AZIENDA OSPEDALIERA G. BROTZU  
CAGLIARI



***Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità***

Premesso che la *Commissione Nazionale per la Formazione Continua* ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo:

**CORSO DI FORMAZIONE MANAGERIALE PER DIRIGENTI SANITARI**

organizzato da Azienda Ospedaliera "G. BROTZU",  
tenutosi a Cagliari il:

13 e 14 MARZO 2003

20 e 21 MARZO 2003

assegnando all'evento stesso:

N.18 (DICIOTTO) Crediti Formativi E.C.M.  
(Determinazione della Commissione Nazionale E.C.M.)

la sottoscritta

**Dr.ssa MARINELLA SPISSU –Dirigente Sanitario del Presidio**  
(Il Responsabile Organizzatore)

Verificato l'apprendimento del partecipante

**ATTESTA**  
che il

**Dott. ssa CORRIGA ANNA MARIA - Dirigente Medico**

ha conseguito:

**N.18 - DICIOTTO - Crediti formativi per l'anno 2003\***

Cagliari, 21 marzo 2003

**IL RESPONSABILE del Progetto Formativo**  
(su delega del rappresentante legale dell'Azienda)  
**DR. SSA MARINELLA SPISSU**

per l'anno 2003 i crediti da acquisire sono 20: minimo 10 crediti formativi, massimo 40 crediti formativi.



AZIENDA OSPEDALIERA G. BROTZU  
CAGLIARI



***Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità***

La *Commissione Nazionale per la Formazione Continua* ha accreditato quale attività di formazione continua progetto formativo aziendale: n. riferimento 140-14446

**CORSO "TRATTAMENTO APPROPRIATO DELL'ARRESTO  
CARDIACO"**

Organizzato da: Azienda Ospedaliera "G. BROTZU"  
Tenutosi a Cagliari dal 26 maggio 2003

**Assegnando :**

**N. 4(quattro) Crediti Formativi E.C.M.**

**Il Responsabile Organizzatore**

**Dr.ssa MARINELLA SPISSU –Dirigente Sanitario del Presidio**

Verificato l'apprendimento del partecipante

**ATTESTA**  
che IL/LA

**DOTT. CORRIGA ANNAMARIA**

**Ha conseguito:**

**N. 4- quattro - Crediti formativi per l'anno 2003**

**IL RESPONSABILE DEL PROGETTO FORMATIVO**  
(su delega del rappresentante legale dell'Azienda)  
**DR. SSA MARINELLA SPISSU**

**Cagliari, 26 maggio 2003**



AZIENDA OSPEDALIERA G. BROTZU  
CAGLIARI

10

Prot. n° 2711

Cagliari, 26/01/04

Si certifica

che la Dr.ssa Anna Maria N. Corrigan,  
ha effettuato in qualità di docente, per il Corso di Aggiornamento sulle  
Infezioni Ospedaliere, accreditato ECM, rivolto ai Coordinatori Infermieristici, il  
seguente argomento:

➤ Il rischio biologico negli operatori sanitari:  
per un totale di n° 4 ore.

Il Corso organizzato dall'Azienda Ospedaliera "G. Brotzu", si è svolto in  
Novembre e Dicembre 2003.

IL DIRIGENTE SANITARIO DI PRESIDIO  
Dr.ssa Marnella Spissu

11



Giornate nazionali donazione e trapianto d'organi  
Maggio 2004

AZIENDA U.S.L. n° 8 - CAGLIARI

Informazione e sensibilizzazione sulla donazione d'organo

Cagliari 26 maggio 2004  
Aula A. Patologica P.O. S. Giovanni di Dio

Si attesta che il Sig.

ANNA MARIA N. CORRICA

nato a MEANA SARDO

il 22/12/1960

ha partecipato in data odierna all'incontro

" Informazione e sensibilizzazione sulla donazione d'organo "

Il Coordinatore Aziendale per i Trapianti

Dottessa Anna Maria Ruda

**Dona gli organi : il trapianto è vita**  
Con il patrocinio dell' Assessorato Igiene e Sanità Regione Sardegna



ASL 8 Cagliari  
Servizio Sanitario Regione Sardegna  
Azienda U.S.L. n° 8 - CAGLIARI

12



**Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità**

Premesso che la **Commissione Nazionale per la Formazione Continua** ha accreditato quale attività di formazione continua il progetto formativo aziendale denominato  
**“LA MORTE ENCEFALICA E LA DONAZIONE DI ORGANI”**  
(progetto formativo aziendale n. 3364-23870)

organizzato da Azienda u.s.l. n° 8 - Cagliari,  
e tenutosi a Cagliari in data 28/05/2004  
*assegnando all'evento stesso*

N. 3 (tre) Crediti Formativi E.C.M.  
(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

il sottoscritto  
Dott. Efisio Luigi Aste  
Rappresentante Legale dell'Azienda

Verificato l'apprendimento del partecipante

**ATTESTA**  
che  
**CORRIGA ANNA MARIA NATALIA**  
in qualità di  
**DIRIGENTE MEDICO**  
nato/a a MEANA SARDO in data 22/12/1960 ha conseguito:

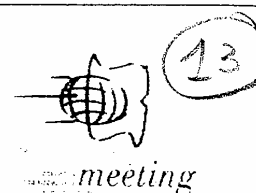
**N. 3 (tre) Crediti formativi per l'anno 2004\***

Cagliari, li 27.07.2004



IL RAPPRESENTANTE  
LEGALE DELL'AZIENDA  
(Dott. Efisio Luigi Aste)

\*per l'anno 2004 i crediti da acquisire sono 30: minimo 15 crediti formativi ,massimo 60 crediti formativi.



***Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità***

Premesso che la *Commissione Nazionale per la Formazione Continua* ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo n. 6857 - 134456, denominato **"Management delle infezioni fungine nel paziente critico"**, organizzato dalla **Sardiniameeting** di Cagliari, e tenutosi presso la sala conferenze dell'Ospedale Binaghi, Cagliari, il 4 giugno 2004, assegnando all'evento stesso

**N. 3 (tre) Crediti Formativi E.C.M.**  
(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

il sottoscritto **Dr. Giorgio La Nasa**  
responsabile scientifico dell'evento

Verificato l'apprendimento del partecipante

**CERTIFICA**

che il/la

Dott./ Dott.ssa CORRICA ANNAMARIA..... in qualità di Medico Chirurgo

nato/a a MEANA SARDA.....il 22-12-60., ha conseguito:

**N. 3 (tre) crediti formativi per l'anno 2004**

Cagliari, 4 giugno, 2004

**IL RESPONSABILE DELL'EVENTO**



EMATOLOGIA  
CENTRO TRAPIANTI DI MIDOLLO OSSEO  
Ospedale "R. Binaghi"  
Azienda Asl N° 8 - Cagliari



CORSO DI AGGIORNAMENTO

MANAGEMENT

DELLE INFEZIONI FUNGINE

NEL PAZIENTE CRITICO

CAGLIARI | SALA CONFERENZE OSPEDALE BINAGHI

4 GIUGNO 2004

**Anna Maria N. Corrigan**

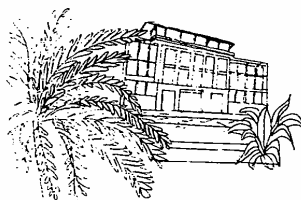
ha partecipato al corso

IL COORDINATORE

Dott. Giorgio La Nasa



14



**Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità**

Premesso che la **Commissione Nazionale per la Formazione Continua** ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo n. 818-140820, denominato

**"LA FIBROSI POLMONARE IDIOPATICA"**

organizzato da AIPO Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri,  
e tenutosi a Cagliari, Aula Universitaria, Ospedale Binaghi in data 30 giugno 2004,  
assegnando all'evento stesso

**N. 4 (quattro) Crediti Formativi E.C.M.**

(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

**La Segreteria Scientifica**

Rappresentante legale dell'organizzatore (ovvero Responsabile dell'evento, su delega del rappresentante legale dell'Organizzatore)

Verificato l'apprendimento del partecipante

**CERTIFICA**

che il/la

Dott/Dott.ssa/Sig.ra/Sig

A. Maria N. CORRIGA

in qualità di

MEDICO

(indicare la professione)

nato/a a MEANA SARDA il 22/12/1960, ha conseguito:

**N. 4 (quattro) Crediti formativi per l'anno 2004**

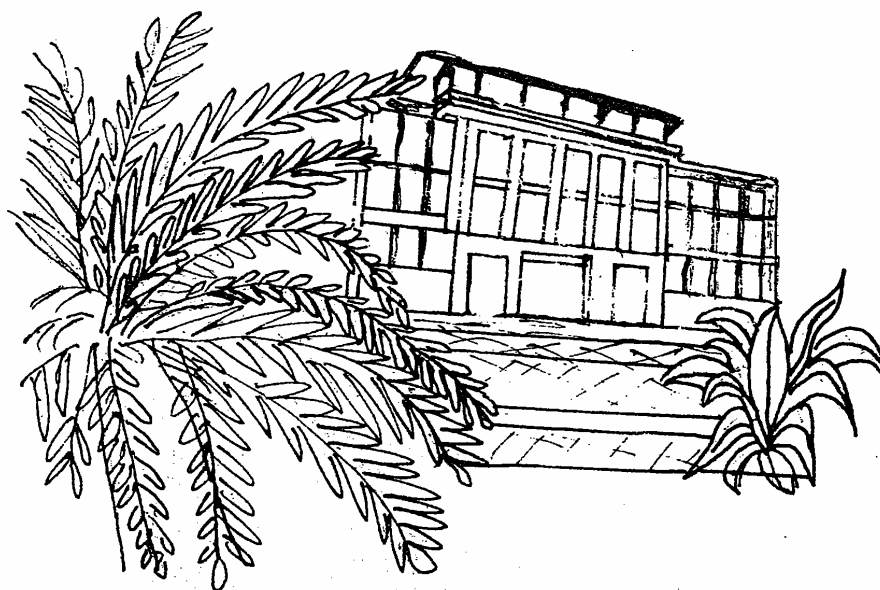
Cagliari, li 24 settembre 2004

LA SEGRETERIA SCIENTIFICA



A.I.P.O.  
Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri  
Sezione Sardegna

## CORSO DI AGGIORNAMENTO ECM LA FIBROSI POLMONARE IDIOPATICA (I.P.F.)



### ATTESTATO DI PARTECIPAZIONE

Rilasciato al Dott./Prof. Anna Maria N. Corriga

in qualità di Partecipante

Cagliari, 30.06.2004  
Aula Universitaria,  
Ospedale "R. Binaghi" - ASL 8 - Cagliari

*La Segreteria Scientifica*  
*Dott. Marcello A. Ledda*

15

*Il Provider:*

**I.E.M.S.S. geie**

*N. posizione sperimentazione: S 952*

*Accreditamento n. 604 - valido fino al 31 ottobre 2004*

*Protocollo di intesa stipulato il 6 giugno 2004*

**Attesta che**

***Anna Maria Corrigan***

*Iscritto a: Ordine dei Medici Provincia di Cagliari*

*Numero di iscrizione: 7071*

*Codice Fiscale: CRRNMR60T62F073I*

**ha partecipato all'attività di tipo FAD**

**Introduzione alla qualità in sanità  
S 952**

*Obiettivi didattico-formativi generali dell'attività di tipo fad:*

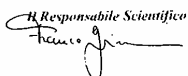
- 1. fare acquisire le conoscenze teoriche sul tema della qualità e della qualità nella sanità;*
- 2. fare acquisire le prime conoscenze sul tema dell'analisi dei processi con riferimenti a quelli sanitari;*
- 3. fare migliorare le capacità relazionali e comunicative sul tema della condivisione delle problematiche della qualità e la loro esplicitazione;*

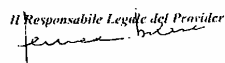
*Scadenza dell'attività di tipo FAD 31/10/2004*

*Data in cui ha superato la relativa valutazione di apprendimento: 24/08/2004*

**Vengono pertanto assegnati n. quattro crediti ECM**

*In data: 31/10/2004*

*Il Responsabile Scientifico*  


*Il Responsabile Legale del Provider*  


16

SOCIETA' ITALIANA PER LO STUDIO DELLA ARTERIOSCLEROSI (S.I.S.A.)

Presidente: Alberto Notarbartolo

SEZIONE REGIONALE DELLA SARDEGNA

Presidente: Sandro Muntoni

*Sabato 2 Ottobre 2004*

*Aula Magna Cittadella Universitaria*

*/ Monserrato - Cagliari*

**RISCHIO CARDIOVASCOLARE**

***ATTESTATO DI PARTECIPAZIONE***

Si attesta che CORRIGA ANNA MARIA N.  
ha partecipato al Convegno "Rischio Cardiovascolare"

Cagliari, 2 ottobre 2004

Il Presidente

Dottor Sandro Muntoni



Segreteria Scientifica:

Centro per le Malattie Dismetaboliche e l'Arteriosclerosi, Associazione MEDICO., Viale Merello  
23/29, 09123 Cagliari. Tel. 070 273406. Fax. 070 284849. E- mail: [smuntoni@unica.it](mailto:smuntoni@unica.it)



***Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità***

Premesso che la *Commissione Nazionale per la Formazione Continua* ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo n. 021026, edizione n. 5 denominato:

**C8 GESTIONE DEL RIFIUTO SANITARIO**

organizzato da "CASA DI CARITA' ARTI E MESTIERI"

e tenutosi a CAGLIARI dal 29 settembre al 17 dicembre 2004, *assegnando all'evento stesso*

N° 50 (Cinquanta) Crediti Formativi E.C.M.  
(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

il sottoscritto

Ing. Attilio Bondone

Rappresentante legale dell'Organizzatore (ovvero Responsabile dell'evento, su delega del rappresentante legale dell'Organizzatore)

Verificato l'apprendimento del partecipante

**CERTIFICA**

che la

Dott.ssa **CORRIGA ANNA MARIA** in qualità di Dirigente Medico  
nata a Meana Sardo (NU) il 22/12/1960, ha conseguito:

**N° 50 (cinquanta) Crediti formativi\* per l'anno 2004**

Cagliari, 17 Dicembre 2004

Il Rappresentante Legale  
Ing. Attilio Bondone





Ministero del Lavoro e della  
Previdenza Sociale  
Ufficio Centrale OFLP



UNIONE EUROPEA  
Fondo Sociale Europeo



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA  
Assessorato del Lavoro, Formazione Professionale, cooperazione e Sicurezza Sociale  
servizio Programmazione, Gestione, Monitoraggio e Controllo Formazione



**CASA di  
CARITÀ  
ARTI e  
MESTIERI**

Ente di formazione professionale

## ATTESTATO DI FREQUENZA

Dalle risultanze dei registri didattici in nostro possesso, si attesta che nell'ambito del progetto di formazione "GESTIONE DEL RIFIUTO SANITARIO - C8 CAGLIARI" svoltosi dal 29/09/2004 al 17/12/2004, costituito da 5 moduli, l'allievo **Anna Maria Corriga**, nata a Meana Sardo (NU) il 22/12/1960 residente a Cagliari, Via Malfidano, 1 ha frequentato:

*dal 29/9/2004 al 17/12/2004*

- 1 Modulo Introduzione per la durata di 4 ore.
- 2 Modulo La normativa di riferimento per la durata di 24 ore.
- 3 Modulo La gestione del rifiuto sanitario per la durata di 40 ore.
- 4 Modulo Informatica per la durata di 16 ore.
- 5 Modulo Lingua inglese per la durata di 16 ore.

Si rilascia la presente su richiesta dell'interessato per i soli usi consentiti dalle legge.

Cagliari, 17 Dicembre 2004

IL DIRETTORE  
Dott.ssa Maria Paola Nigdu  
*[Signature]*





**ASL 8 Cagliari**

Servizio Sanitario Regione Sardegna  
Azienda U.S.L. N° 8 - CAGLIARI



18

***Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità***

Premesso che la **Commissione Nazionale per la Formazione Continua** ha accreditato quale attività di formazione continua il progetto formativo aziendale denominato  
**"Radioprotezione – Corso di formazione per il personale operante con radiazioni ionizzanti D. Lgs 230/95"**  
(progetto formativo aziendale 3364-30279)

organizzato da Azienda u.s.l. n° 8 - Cagliari,  
e tenutosi a Cagliari in data 03/12/2004  
*assegnando al progetto stesso*

N. 5 (cinque) Crediti Formativi E.C.M.  
(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

il sottoscritto  
Dott. Efisio Luigi Aste  
Rappresentante Legale dell'Azienda

Verificato l'apprendimento del partecipante

**ATTESTA**

che

**CORRIGA ANNA MARIA NATALIA**

in qualità di

Dirigente Medico

nato/a a Meana Sardo il 22/12/1960 ha conseguito:

**N. 5 (cinque) Crediti Formativi per l'anno 2004\***

Cagliari, li 11.02.2005



IL RAPPRESENTANTE  
LEGALE DELL'AZIENDA  
(Dott. Efisio Luigi Aste)

\*per l'anno 2004 i crediti da acquisire sono 30: minimo 15 crediti formativi, massimo 60 crediti formativi.



**ASL 8 Cagliari**

Servizio Sanitario Regione Sardegna  
Azienda U.S.L. N°8 - CAGLIARI



19

***Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità***

Premesso che la **Commissione Nazionale per la Formazione Continua** ha accreditato quale attività di formazione continua il progetto formativo aziendale denominato  
**“LE REGOLE DELLA COMUNICAZIONE INTERPERSONALE”**  
(progetto formativo aziendale 3364-27418)

organizzato da Azienda u.s.l. n° 8 - Cagliari,  
e tenutosi a Cagliari nei giorni 02.09.13/12/2004  
*assegnando al progetto stesso*

N. 22 (ventidue) Crediti Formativi E.C.M.  
(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

il sottoscritto  
Dott. Efisio Luigi Aste  
Rappresentante Legale dell'Azienda

Verificato l'apprendimento del partecipante

**ATTESTA**

che

**CORRIGA ANNA MARIA NATALIA**

in qualità di

Dirigente Medico

nato/a a Meana Sardo il 22/12/1960 ha conseguito:

**N. 22 (ventidue) Crediti Formativi per l'anno 2004\***

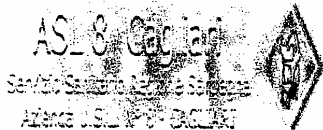
Cagliari, li 16.02.2005



IL RAPPRESENTANTE  
LEGALE DELL'AZIENDA  
(Dott. Efisio Luigi Aste)

\*per l'anno 2004 i crediti da acquisire sono 30: minimo 15 crediti formativi, massimo 60 crediti formativi.





20



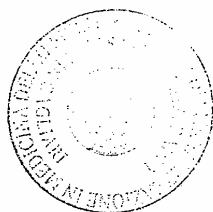
UNIVERSITA'  
DEGLI STUDI DI  
CAGLIARI

Cagliari, 28 Aprile 2005  
Aula Universitaria Ospedale "Binaghi"  
Via Is Guadazzonis, Cagliari  
Ore 15.30 – 19.00

### Attestato partecipazione

Si certifica che ~~la~~ **Sig. /Dott. <sup>SSA</sup> CORRIGA ANNA MARIA** ha  
partecipato in data odierna al convegno dal titolo " Asma e attività motoria:  
perché tanta paura? ".

Prof. Alberto Concu



**CERTIFICATO DI FREQUENZA**

Cagliari, 19/04/2005

21

Con la presente si certifica che la sig.ra Corrigan Anna Maria Natalia

dipendente presso la ASL 8

ha frequentato il corso di:

Linguaggi e strumenti di comunicazione pubblica e istituzionale e  
diritto all'informazione

in data 19/04/2005 dalle 08.00 alle 14.00 ;

nell'aula situata a Cagliari.

**Il tutor Alessandra Cois**

Alessandra Cois

**CERTIFICATO DI FREQUENZA**

Cagliari, 26/04/2005

Con la presente si certifica che la sig.ra Corriga Anna Maria Natalia

dipendente presso la ASL 8

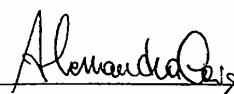
ha frequentato il corso di:

Linguaggi e strumenti di comunicazione pubblica e istituzionale e  
diritto all'informazione

in data 26/04/2005 dalle 08.00 alle 14.00

nell'aula situata a Cagliari.

**Il tutor Alessandra Cois**

  
\_\_\_\_\_

**CERTIFICATO DI FREQUENZA**

Cagliari, 03/05/2005

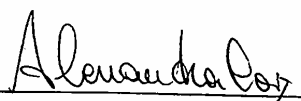
Con la presente si certifica che la sig.ra Corrigan Anna Maria Natalia  
dipendente presso la ASL 8

ha frequentato il corso di:

Linguaggi e strumenti di comunicazione pubblica e istituzionale e  
diritto all'informazione

in data 03/05/2005 dalle 08.00 alle 14.00  
nell'aula situata a Cagliari.

**Il tutor Alessandra Cois**

  
\_\_\_\_\_



## **CERTIFICATO DI FREQUENZA**

10 maggio 2005

Con la presente si certifica che la sig.ra Anna Maria Natalia Corrigan  
dipendente presso la ASL 8,  
ha frequentato il corso "Linguaggi e strumenti della comunicazione  
pubblica e istituzionale", in data 10 maggio 2005,  
dalle ore 8.00 alle ore 14.00 nell'aula situata a Decimomannu

### **Il tutor**

Alessandra Cois

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Alessandra Cois", with a stylized flourish at the end.

**CERTIFICATO DI FREQUENZA**

Cagliari, 17/05/2005

Con la presente si certifica che la sig.ra Anna Maria Natalia Corriga  
dipendente presso la ASL 8

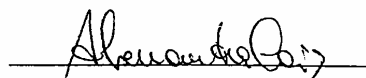
ha frequentato il corso di:

Linguaggi e strumenti di comunicazione pubblica e istituzionale

in data 17/05/2005 dalle 08.00 alle 14.00

nell'aula situata a Cagliari.

**Il tutor Alessandra Cois**





22

**Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità**

Premesso che la *Commissione Nazionale per la Formazione Continua* ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo n. 2979-207965, edizione n. 0 denominato:

**“SALUTE ED AMBIENTE”**

organizzato dalla SISA e tenutosi a Cagliari il giorno 9 ottobre 2005, assegnando all'evento stesso:

**N 5 (cinque) Crediti Formativi E.C.M.**  
(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

il sottoscritto  
**Prof. Arturo Pujia**  
Rappresentante legale dell'Organizzatore

Verificato l'apprendimento del partecipante

**CERTIFICA**

che il/la

Dott/Dott.ssa CORRIGA ANNA ITALIA

in qualità di Medico Chirurgo

nato/a a NEANA SARNO il 22-12-60, ha conseguito:

**N 5 (cinque) Crediti formativi\* per l'anno 2005**

Cagliari, 9 Ottobre 2005

Rappresentante legale dell'Organizzatore  
Prof. Arturo Pujia

REGIONE CALABRIA  
AZIENDA OSPEDALIERA "BIANCHI-MELACRINO-MORELLI"  
REGGIO CALABRIA



***Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità***

Premesso che la *Commissione Nazionale per la Formazione Continua* ha accreditato quale attività di formazione continua il Progetto formativo aziendale n.4714-37172 denominato :

***"IL RISK MANAGEMENT NELLE AZIENDE OSPEDALIERE"***

organizzato da Azienda Ospedaliera "Bianchi-Melacrino-Morelli" di Reggio Calabria e tenutosi presso gli Ospedali Riuniti giorno **10 novembre 2005**, assegnando al Progetto stesso

**N. 5 ( cinque ) Crediti Formativi E.C.M.**  
(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

il sottoscritto

***DOTT. FRANCESCO IACOPINO***  
Responsabile del Progetto

**ATTESTA**

che la ***D.SSA ANNA MARIA NATALIA CORRIGA***

nata a Meana Sardo (NU) il 22.12.60, avendo partecipato all'evento formativo in qualità di **Docente**, giorno **10.11.05 dalle ore 12,00 alle ore 13,00** - relazione su "Controllo delle infezioni nosocomiali: un aspetto multidisciplinare" ha acquisito:

**N. 2( due ) Crediti formativi per l'anno 2005**

Reggio Calabria, li 10.11.2005

Responsabile del Progetto

***DOTT. FRANCESCO IACOPINO***



Regione Calabria  
Azienda Ospedaliera  
(Bianchi-Melacrino-Morelli)  
Reggio Calabria

**CORSO ECM**

**"Il risk management nelle Aziende Ospedaliere"**

Programma			
Orario			
8,00	8,30	Registrazione partecipanti	
8,30	9,00	Introduzione e saluto del Direttore Generale	
		Relatore	Argomento
9,00	10,00	Dott. Giuseppe Bollignano	Le infezioni associate alla struttura sanitaria ed il loro impatto sanitario ed economico
10,00	11,00	Dott. Francesco Iacopino	Il ruolo della Direzione Sanitaria nella gestione del rischio in ospedale
11,00	12,00	Dott. Aurelio Altomonte	Sorveglianza sanitaria dei lavoratori sottoposti ai rischi ospedalieri
12,00	13,00	Dott.ssa Annamaria Corrigan	Controllo delle infezioni nosocomiali: un aspetto multidisciplinare
13,00	13,30	Discussione	
		Pausa	
14,30	15,30	Dott. Giuseppe Foti	L'uso degli antibiotici in ospedale: luci ed ombre
15,30	16,30	Dott. Pasquale Cimino Amaddeo	D.L. 626/94: livelli di responsabilità
16,30	17,30	Dott. Massimo Misefari	Valutazione e gestione del rischio chimico e fisico
17,30	18,30	Dott. Demetrio Marino	Il Comitato per il Controllo delle Infezioni Ospedaliere: compiti e responsabilità
18,30	19,00	Discussione	
19,00	19,30	Consegna questionari	Chiusura del corso



REGIONE CALABRIA  
AZIENDA OSPEDALIERA  
(BIANCHI-MELACRINO-MORELLI)  
REGGIO DI CALABRIA

## ATTESTATO DI PARTECIPAZIONE

Si attesta che la **D.ssa ANNA MARIA NATALIA CORRIGA**

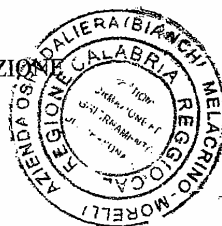
Nata a Meana Sardo (NU) il 22.12.60

ha partecipato, in qualità di **Relatore**, al Corso ECM dal titolo:

***"Il Risk management nelle Aziende Ospedaliere"***

organizzato da Azienda Ospedaliera "Bianchi-Melacrino-Morelli" di Reggio Calabria e tenutosi presso gli Ospedali Riuniti giorno 10 novembre 2005.

IL DIRETTORE SETTORE FORMAZIONE  
DOTT. BRUNO BRANCA



Reggio Calabria 10.11.2005

Sede Legale: Via Provinciale Spirito Santo Palazzo Gangeri, 24  
e-mail: [guarnaccia.giuseppe@tiscalinet.it](mailto:guarnaccia.giuseppe@tiscalinet.it)

Tf.fax: 0965397407



AZIENDA OSPEDALIERA G. BROTZU  
CAGLIARI



29

***Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità***

La Commissione Nazionale per la formazione continua ha accreditato quale attività di formazione continua progetto formativo aziendale:  
n. riferimento n. 140- 36691

***TRATTAMENTO APPROPRIATO DELL'ARRESTO CARDIACO***

Organizzato da Azienda Ospedaliera "G. BROTZU"  
tenutosi a Cagliari il:  
28 novembre 2005

n. 3 (tre) Crediti Formativi E.C.M.

la sottoscritta  
**Dr.ssa MARINELLA SPISSU** –Dirigente Sanitario del Presidio  
(Il Responsabile Organizzatore)

Verificato l'apprendimento del partecipante

**ATTESTA**  
che il

***Dr. ANNA MARIA CORRIGA***

**Ha conseguito:**

n. 3 (tre) – Crediti formativi per l'anno 2005

**IL RESPONSABILE del Progetto Formativo**  
(su delega del rappresentante legale dell'Azienda)  
**DR. SSA MARINELLA SPISSU**

Cagliari, 28 novembre 2005



ASL3TTO  
AZIENDA SANITARIA LOCALE DI CAGLIARI



25

***Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità***

Premesso che la **Commissione Nazionale per la Formazione Continua** ha accreditato quale attività di formazione continua il Progetto Formativo Aziendale n. 3364 – 43106, edizione n. 0, denominato

**“COMUNICAZIONE E RELAZIONE D’AIUTO”**

organizzato dall’Azienda U.S.L. n° 8 - Cagliari,  
e tenutosi a Cagliari, in data 13/16/20/30 Novembre 2006  
*assegnando al Progetto stesso*

N.20 (venti) Crediti Formativi E.C.M.  
(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

il sottoscritto  
Dr. Gino Gumirato  
Rappresentante Legale dell’Azienda

Verificato l’apprendimento del partecipante

**CERTIFICA**

che La Dott.ssa  
**CORRIGA ANNA MARIA NATALIA**  
in qualità di  
Dirigente Medico

nato/a a Meana Sardo il 22/12/1960 ha conseguito:

**N. 20 (venti) Crediti Formativi per l’anno 2006**

Cagliari, li 15.05.2007



IL RAPPRESENTANTE  
LEGALE DELL’AZIENDA  
(Dr. Gino Gumirato)



26

## ATTESTATO DI PARTECIPAZIONE

Dott. CORRIGA ANNA MARIA N.

### Convegno Informativo Medir

Rete dei Medici di Medicina Generale/Pediatri di Libera Scelta  
e Fascicolo Sanitario Elettronico

*Sala Convegni Holiday Inn*

in data 1.02.2007

Regione Autonoma della Sardegna  
Assessorato dell'Igiene e Sanità e dell'Assistenza Sociale



Azienda Sanitaria Locale n. 8



**Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità**

Premesso che la **Commissione Nazionale per la Formazione Continua** ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo n. 11982-273093 denominato "**Il Risk Management in oncologia: prospettive di sviluppo e applicazioni**" organizzato da SIDERA S.R.L. e tenutosi a Cagliari l' 8 e 9 Giugno 2007, assegnando all'evento stesso

**N. 7 (SETTE) Crediti Formativi E.C.M.**  
(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

il sottoscritto  
Nicola Lapenna  
Rappresentante legale dell'organizzatore  
**Verificato l'apprendimento del partecipante**

**CERTIFICA**  
che

Dot. SSA ANNA MARIA N. CORRIGA  
in qualità di medico

nato/a a MEANA SARDO il 22/12/1960, ha conseguito:

**N. 7 (SETTE) Crediti formativi per l'anno 2007**

Cagliari, lì 8 e 9 Giugno 2007

II RAPPRESENTANTE LEGALE DELL'ORGANIZZATORE

*Sidero*

IL RISK MANAGEMENT IN ONCOLOGIA:  
PROSPETTIVE DI SVILUPPO E APPLICAZIONI

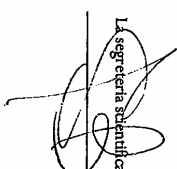
Il presente attestato viene conferito a

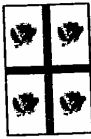
Dot. SSA ANNA MARIA N. CORRIGA

Per la partecipazione al convegno  
"Il Risk Management in oncologia: prospettive di sviluppo e applicazioni"

CAGLIARI, 8-9 GIUGNO 2007

AstraZeneca 

  
La segreteria scientifica



Regione Autonoma della Sardegna



## Attestato di Partecipazione

Si attesta che il/la Dott./Dott.ssa CORRIGA ANNA MARIAN,

Ha partecipato all'incontro di presentazione del **Progetto SISaR** – avvio del CUP nell'area  
della **provincia di Cagliari**, il giorno 22 LUGLIO 2008  
dalle ore 15.30 alle ore 17.30.

La Segretaria Organizzativa

28





**PROGETTO IPPOCRATE**  
Corso n.070091 – Lotto 1  
"Integrazione delle politiche nella gestione  
organizzativa delle reti di presa in carico  
dei cittadini/utenti del Servizio Sanitario"  
Determinazione n.31879/2251/FP del 19  
luglio 2007



MINISTERO DEL LAVORO,  
DELLA SALUTE E DELLE POLITICHE SOCIALI  
Direzione Generale per la Politiche  
per l'Orientamento e la Formazione



REGIONE AUTONOMA DELLA  
SARDEGNA

29

## PROGETTO IPPOCRATE

**Corso n.070091 – Lotto 1**

"Integrazione delle politiche nella gestione organizzativa delle reti di presa in carico dei cittadini/utenti del Servizio Sanitario"  
Determinazione n.31879/2251/FP del 19 luglio 2007

# ATTESTATO DI FREQUENZA

Si attesta che

**ANNA MARIA CORRIGA**

nato/a a Meana Sardo (Nuoro) il 22/12/1960 ha frequentato con esito positivo il percorso formativo  
intitolato "DIRIGENTE DEL SERVIZIO SANITARIO REGIONALE E DELL'AMMINISTRAZIONE

PUBBLICA Cagliari  
PROGETTO IPPOCRATE – Lotto 1

per un totale di 130 ore su un totale di 134 ore

Il Direttore Generale Techne S.C.p.A.  
(ente mandatario ATS Ippocrate Lotto 1)  
LIA BENVENUTI

Registrazione TECHNE S.C.p.A. in data 18 FEB. 2009 al n. 53

Il Responsabile di Repertorio

Ente Mandatario ATS



Enti Mandanti ATS



AGENZIA PER LA FORMAZIONE

## ATTESTATO DI PARTECIPAZIONE

Progetto Formativo Aziendale

### *“Il Risk Management, il Patient Safety e la gestione del rischio clinico”*

Visti gli atti d'ufficio,

si certifica che

**Corriga Anna Maria**

Nato/a a Meana Sardo il 22/12/1960

ha partecipato al Progetto Formativo Aziendale

organizzato da questa amministrazione e tenutosi il 18 marzo 2009

c/o sala convegni Hotel Holiday Inn viale Ticca Cagliari

Selargius, 18 marzo 2009



il Direttore Generale

Dott. Benedetto Baranu



**E.C.M.**



## **6° Convegno Nazionale sulle Sale Operatorie**

31

*Premesso che la **Commissione Nazionale per la Formazione Continua**  
ha accreditato quale attività di formazione continua*

*l'evento formativo n. 9020113 denominato:*

**“Il Teatro Operatorio. Scene, Copioni ed Attori del futuro”**

Organizzato da **A.N.M.D.O.**,

tenutosi a Roma dal 19 al 20 Marzo 2009

*assegnando all'evento stesso*

**N. 5 Crediti Formativi E.C.M.**

(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

Il sottoscritto Gianfranco Finzi

*Responsabile dell'Evento*

**CERTIFICA**

*Che*

**ANNA MARIA CORRIGA**

in qualità di **MEDICO**

nato/a a **MEANA SARDO** il 22/12/1960

ha conseguito

**N. 5 (cinque) Crediti Formativi per l'anno 2009**

**Il Presidente Nazionale ANMDO**

**Gianfranco Finzi**



## ATTESTATO DI PARTECIPAZIONE

Progetto Formativo Aziendale

*“Il Risk Management, il Patient Safety  
e la gestione del rischio clinico: aspetti  
legali ed assicurativi”*

Visti gli atti d'ufficio,

si certifica che

**Corriga Anna Maria**

Nato/a a MEANA SARDO il 22/12/1960

ha partecipato al Progetto Formativo Aziendale

organizzato da questa amministrazione e tenutosi il 8 aprile 2009

c/o sala convegni Hotel Holiday Inn viale Tacca Cagliari

Selargius, 8 aprile 2009



il Direttore Generale

Dott. Benedetto Barranu

33

Si attesta che  
*This is to certify that*

**Anna Maria Corrigan**

ha partecipato al corso  
*attended the course*

**Le direzioni sanitarie di presidio. Competenze tecniche, organizzative e gestionali**

della durata di  
*of the duration of*

**10 giorni (dal 9 settembre 2008 al 3 febbraio 2009)**

organizzato dalla  
*organised by*

**Scuola di Direzione Aziendale dell'Università Bocconi**  
*SDA Bocconi School of Management*

per  
*for*

**Asl 8 Cagliari**

**SDA Bocconi**



**Bocconi**  
*School of Management*



**Il Coordinatore del Corso**  
*Course Coordinator*

**Dott. Carlo De Pietro**

**Il Direttore di Divisione**  
*Division Director*

**Prof. Enrico Guarini**

*Si rilascia in carta libera, per gli usi consentiti dalla legge*

**Milano, 13 maggio 2009**



**Il corso prevede la partecipazione ad uno study tour internazionale che è stato regolarmente svolto.**



REGIONE  
AUTONOMA  
DELLA SARDEGNA



ASL Cagliari

34



## Programma per la formazione continua degli operatori della Sanità

Premesso che il Sistema per la Formazione Continua della Regione Sardegna  
ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo denominato

### ORGANIZZARE E GESTIRE LA SICUREZZA NEI PRESIDI OSPEDALIERI: FUNZIONI E COMPITI DELLA DIREZIONE SANITARIA DEL PRESIDIO (CODICE N. 551 EDIZIONE 1)

organizzato da AZIENDA SANITARIA LOCALE N°8 DI CAGLIARI e tenutosi  
a CAGLIARI (CA) dal 19-11-2010 al 20-11-2010 (ediz. 1), per la durata complessiva di 16 ore  
(Formazione Residenziale)

#### VERIFICATO L'APPRENDIMENTO

#### SI ATTESTA CHE

Dott.ssa ANNA MARIA NATALIA CORRIGA (medico)  
nata a MEANA SARDO il 22-12-1960 in qualità di partecipante

ha regolarmente seguito l'iniziativa e ha conseguito

**N. 18 (diciotto) Crediti Formativi E.C.M.**

per l'anno 2010

SELARGIUS, lì 22-02-2011

IL RAPPRESENTANTE LEGALE  
O SUO DELEGATO  
(ALESSIO CORRIGAS)

Ai sensi del punto n. 7 dell'Accordo tra il Ministero della Salute e le Regioni del 13 marzo 2003 "I crediti maturati dai singoli professionisti nell'ambito delle iniziative di formazione continua accreditate dalle Regioni sono riconosciuti su tutto il territorio nazionale"



REGIONE  
AUTONOMA  
DELLA SARDEGNA



ASL Cagliari

35



### Programma per la formazione continua degli operatori della Sanità

Premesso che il Sistema per la Formazione Continua della Regione Sardegna  
ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo denominato

### CORSO DI FORMAZIONE IN RADIOPROTEZIONE DEI LAVORATORI E DELLA POPOLAZIONE - D. LGS. 230/95 E S.M.I. (CODICE N. 693 EDIZIONE 1)

organizzato da AZIENDA SANITARIA LOCALE N°8 DI CAGLIARI e tenutosi  
a CAGLIARI (CA) dal 20-01-2011 al 20-01-2011 (ediz. 1), per la durata complessiva di 8 ore e 30 minuti  
(Formazione Residenziale)

#### VERIFICATO L'APPRENDIMENTO

#### SI ATTESTA CHE

Dott.ssa ANNA MARIA NATALIA CORRIGA (medico)  
nata a MEANA SARDO il 22-12-1960 in qualità di partecipante

ha regolarmente seguito l'iniziativa e ha conseguito

**N. 9 (nove) Crediti Formativi E.C.M.**

per l'anno 2011

SELARGIUS, li 02-07-2012

IL RAPPRESENTANTE LEGALE  
O SUO DELEGATO  
(ALESSIO CORRIAS)

Ai sensi del punto n. 7 dell'Accordo tra il Ministero della Salute e le Regioni del 13 marzo 2003 "I crediti maturati dai singoli professionisti nell'ambito delle iniziative di formazione continua accreditate dalle Regioni sono riconosciuti su tutto il territorio nazionale"



REGIONE  
AUTONOMA  
DELLA SARDEGNA



ASL Cagliari

36



## Programma per la formazione continua degli operatori della Sanità

Premesso che il Sistema per la Formazione Continua della Regione Sardegna ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo denominato

### INFEZIONI CORRELATE ALL'ASSISTENZA: EPIDEMIOLOGIA, PATOGENESI ED EVIDENZE PER UNA PREVENZIONE EFFICACE (CODICE N. 900 EDIZIONE 1)

organizzato da AZIENDA SANITARIA LOCALE N°8 DI CAGLIARI e tenutosi a CAGLIARI (CA) dal 05-05-2011 al 05-05-2011 (ediz. 1), per la durata complessiva di 5 ore (Formazione Residenziale)

#### VERIFICATO L'APPRENDIMENTO SI ATTESTA CHE

Dott.ssa ANNA MARIA NATALIA CORRIGA (medico)  
nata a MEANA SARDO il 22-12-1960 in qualità di partecipante

ha regolarmente seguito l'iniziativa e ha conseguito

**N. 5 (cinque) Crediti Formativi E.C.M.**

per l'anno 2011

SELARGIUS, li 19-03-2012

IL RAPPRESENTANTE LEGALE  
O SUO DELEGATO  
(ALESSIO CORRIGAS)

Ai sensi del punto n. 7 dell'Accordo tra il Ministero della Salute e le Regioni del 13 marzo 2003 "I crediti maturati dai singoli professionisti nell'ambito delle iniziative di formazione continua accreditate dalle Regioni sono riconosciuti su tutto il territorio nazionale"





REGIONE  
AUTONOMA  
DELLA SARDEGNA



ASLCagliari

37



### Programma per la formazione continua degli operatori della Sanità

Premesso che il Sistema per la Formazione Continua della Regione Sardegna ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo denominato

### PREVENIRE LA SINDROME DI BURN OUT TRA GLI OPERATORI SANITARI CHE OPERANO IN CONTESTI CRITICI (CODICE N. 662 EDIZIONE 1)

organizzato da AZIENDA SANITARIA LOCALE N°8 DI CAGLIARI e tenutosi  
dal 20-12-2010 al 14-06-2011 (ediz. 1)  
(Formazione Sul Campo)

#### VERIFICATO L'APPRENDIMENTO SI ATTESTA CHE

Dott.ssa ANNA MARIA NATALIA CORRIGA (medico)  
nata a MEANA SARDO il 22-12-1960 in qualità di partecipante

ha regolarmente seguito l'iniziativa e ha conseguito

**N. 36 (trentasei) Crediti Formativi E.C.M.**

per l'anno 2010

SELARGIUS, il 20-04-2012

IL RAPPRESENTANTE LEGALE  
O SUO DELEGATO  
(ALESSIO CORRIAS)

Ai sensi del punto n. 7 dell'Accordo tra il Ministero della Salute e le Regioni del 13 marzo 2003 "I crediti maturati dai singoli professionisti nell'ambito delle iniziative di formazione continua accreditate dalle Regioni sono riconosciuti su tutto il territorio nazionale"



REGIONE  
AUTONOMA  
DELLA SARDEGNA



ASL Cagliari

38



### **Programma per la formazione continua degli operatori della Sanità**

Premesso che il Sistema per la Formazione Continua della Regione Sardegna ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo denominato

### **LA COMUNICAZIONE IN OSPEDALE: FONDAMENTO DELLA CRESCITA TRA GLI OPERATORI E NEL RAPPORTO CON IL PAZIENTE. (CODICE N. 1292 EDIZIONE 2)**

organizzato da AZIENDA SANITARIA LOCALE N°8 DI CAGLIARI e tenutosi a CAGLIARI (CA) dal 08-03-2012 al 23-03-2012 (ediz. 2), per la durata complessiva di 34 ore (Formazione Residenziale)

#### **VERIFICATO L'APPRENDIMENTO**

#### **SI ATTESTA CHE**

Dott.ssa ANNA MARIA NATALIA CORRIGA (medico)  
nata a MEANA SARDO il 22-12-1960 in qualità di partecipante

ha regolarmente seguito l'iniziativa e ha conseguito

**N. 34 (trentaquattro) Crediti Formativi E.C.M.**

per l'anno 2012

SELARGIUS, li 26-06-2012

IL RAPPRESENTANTE LEGALE  
O SUO DELEGATO  
(ALESSIO CORRIAS)

Ai sensi del punto n. 7 dell'Accordo tra il Ministero della Salute e le Regioni del 13 marzo 2003 "I crediti maturati dai singoli professionisti nell'ambito delle iniziative di formazione continua accreditate dalle Regioni sono riconosciuti su tutto il territorio nazionale"



Convegno Nazionale

**Il nuovo sistema sanitario per la Sardegna**  
**Azioni strategiche per il prossimo triennio**

**ATTESTATO DI PARTECIPAZIONE**

Si certifica la partecipazione di:

Anne Marie M. Lorrigo

Il Direttore Generale Dott. Gianluca Calabrò

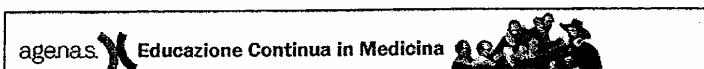
(39)

Cagliari, 19 Giugno 2012 - Fiera Internazionale della Sardegna





40



**Programma Nazionale per la Formazione Continua degli Operatori della Sanità**

Premesso che la *Commissione Nazionale per la Formazione Continua*  
ha accreditato quale attività di formazione continua l'evento formativo  
n. 14768-12002203, assegnati 6 crediti ECM per Medici Chirurghi denominato

**ANATOMIA DI UN PROCESSO PER RESPONSABILITA' SANITARIA:  
DALL'ONERE DELLA PROVA ALLA SENTENZA,  
DALL'AVVISO DI GARANZIA ALL'ACCERTAMENTO AUTOPTICO**

organizzato da

**IN PROGRESS**

Associazione Scientifica e Culturale per la Formazione nel Pubblico Impiego

il sottoscritto Lebiu Graziano, responsabile dell'evento formativo,

**ATTESTA**

che il Dr./D.ssa

CORRIGA ANNA MARIA N.

nato/a a MEANA SARDO il 22/12/1960

ha partecipato a tutte le sessioni dell'evento in data 19 ottobre 2012,  
superato il test di valutazione e conseguiti 6 crediti formativi ECM.

Cagliari, 19 ottobre 2012

IL RESPONSABILE DELL'EVENTO  
Graziano Lebiu

**In Progress**

Provider ECM n. 14768

# ATTESTATO di PARTECIPAZIONE

si attesta che:

ANNA MARIA CORRIGA

salute, sostenibilità,

innovazione:

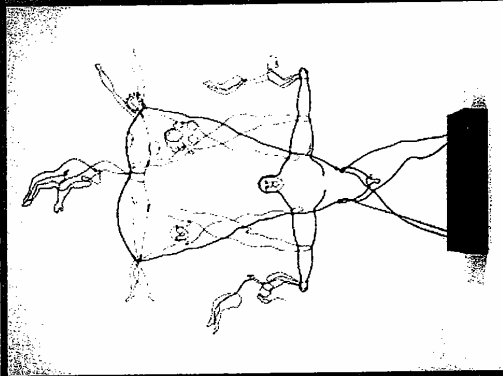
l'incontro è nella

Coordinatori del Corso *Dr.ssa Maria Teresa Addis*  
*Dr. Emanuele Angelucci*  
*Dr. Paolo Sanna*

SALA CONGRESSI CONVENTO S. GIUSEPPE CAGLIARI

ha partecipato al corso

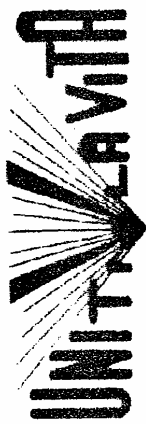
martedì 27 novembre 2012



IN QUALITÀ DI

DISCENTE





PER  
ASSOCIAZIONE DI VOLONTARIATO  
C/O "ONCOLOGICO" E HOSPICE  
CAGLIARI



ASL Cagliari

## Attestato di partecipazione

Si attesta che la dottoressa A. Maria Corriga ha partecipato alla giornata di studio sulla "ELABORAZIONE DEL LUTTO ONCOLOGICO", tenutasi a Cagliari presso l'Ospedale A. Businco.

Cagliari, 11/04/2013

La Responsabile

Dott.ssa Carla Firinu

AZIENDA SANITARIA LOCALE N. 8 CAGLIARI  
DIRIGENTE PSICOLOGO P. LIVELLO - SERVIZIO PSICOSSOCIALE  
DOTT.SSA CARLA FIRINU

*Carla Firinu*

42

**COPIA**  
**CERTIFICATI ATTIVITA' DIDATTICA**

**Dott.ssa Anna Maria Natalia Corrigan**



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI  
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

IL PRESIDENTE

Cagliari, li 18/04/2013

Alla Dr.ssa Corriga Anna Maria

Si comunica che il Consiglio di Facoltà di Medicina e Chirurgia nella seduta del 11/12/2012 le ha assegnato, per l'A.A. 2012/2013, gli incarichi di insegnamento "Scienze Management Sanitario -1" (8 ore), SECS-P/06 e "Scienze Management Sanitario -2" SSD SECS-P/10 (8 ore), del Corso di Laurea in Tecniche di Radiologia Medica per Immagini e Radioterapia.

Si rende noto che lezioni degli insegnamenti su menzionati potranno iniziare compatibilmente con l'acquisizione del necessario nulla osta rilasciato dall'ente di provenienza.

Il Responsabile della Presidenza

Dott. anca





2

REGIONE CALABRIA  
AZIENDA OSPEDALIERA "BIANCHI-MELACRINO-MORELLI"  
REGGIO CALABRIA



***Programma nazionale per la formazione continua degli operatori della Sanità***  
Premesso che la *Commissione Nazionale per la Formazione Continua* ha accreditato quale attività di formazione continua il Progetto formativo aziendale n.4714-37172 denominato :

***"IL RISK MANAGEMENT NELLE AZIENDE OSPEDALIERE"***

organizzato da Azienda Ospedaliera "Bianchi-Melacrino-Morelli" di Reggio Calabria e tenutosi presso gli Ospedali Riuniti giorno 10 novembre 2005, assegnando al Progetto stesso

**N. 5 ( cinque ) Crediti Formativi E.C.M.**  
(Determinazione della Commissione del 22 Novembre 2001)

il sottoscritto

***DOTT. FRANCESCO IACOPINO***  
Responsabile del Progetto

**ATTESTA**

che la ***D.SSA ANNA MARIA NATALIA CORRIGA***

nata a Meana Sardo (NU) il 22.12.60, avendo partecipato all'evento formativo in qualità di **Docente**, giorno 10.11.05 dalle ore 12,00 alle ore 13,00 - relazione su "Controllo delle infezioni nosocomiali: un aspetto multidisciplinare" ha acquisito:

**N. 2( due ) Crediti formativi per l'anno 2005**

Reggio Calabria, li 10.11.2005

Responsabile del Progetto

***DOTT. FRANCESCO IACOPINO***



AZIENDA OSPEDALIERA G. BROTZU  
CAGLIARI

3

Prot. n° 2711

Cagliari, 26/01/04

Si certifica

che la Dr.ssa Anna Maria N. Corrigan,  
ha effettuato in qualità di docente, per il Corso di Aggiornamento sulle  
Infezioni Ospedaliere, accreditato ECM, rivolto ai Coordinatori Infermieristici, il  
seguente argomento:

➤ Il rischio biologico negli operatori sanitari:  
per un totale di n° 4 ore.

Il Corso organizzato dall'Azienda Ospedaliera "G. Brotzu", si è svolto in  
Novembre e Dicembre 2003.

IL DIRIGENTE SANITARIO DI PRESIDIO  
Dr.ssa Mammella Spissu



AZIENDA OSPEDALIERA G. BROTZU  
CAGLIARI

4



Prot. n° 3285

Cagliari, 22 NOV. 2002

Si certifica

che la Dr.ssa Anna Maria N. Corriga, ...  
ha effettuato in qualità di docente, per il Corso di Aggiornamento  
Obbligatorio in corso di accreditamento ECM, i seguenti argomenti:

➤ "Valutazione della qualità":

- nel Corso per Coordinatori Infermieristici per un totale di n° 4 ore;

➤ "Pianificazione del Lavoro":

- nel Corso per Infermieri Professionali area Chirurgica per n° 6 ore;
- nel Corso per Infermieri Professionali area Internistica per n° 4 ore;
- nel Corso per area Pediatrica per n° 1 ora;
- nel Corso per Tecnici di Laboratorio per n° 4 ore;
- nel Corso per Tecnici di Radiologia per n° 2 ore;

➤ "Comfort in ospedale":

- nel corso per OTA ASS, per un totale di n° 5 ore;
- per un totale complessivo di n° 26 ore.

IL DIRIGENTE SANITARIO DI PRESIDIO  
Dr.ssa Marinella Spissu

5



Prot N° 5778

Cagliari 31.03.03

AZIENDA OSPEDALIERA G. BROTZU

Visti gli atti d'ufficio si certifica

che il Sig./Dr. Corrigan Anna Maria nata il 22.12.1960 insegnato nel:

**CORSO DI AGGIORNAMENTO PROFESSIONALE OBBLIGATORIO PER  
OPERATORI INFERMIERISTICI -TECNICI CON CREDITI E.C.M.**

nell'anno 2002

**il seguente argomento: Elaborazione scheda valutazione del personale - n° ore 4**

Il Direttore Amministrativo  
Dr. Maurizio Calamida





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI  
SCUOLA SPECIALIZZAZIONE IGIENE E MEDICINA PREVENTIVA  
DIPARTIMENTO DI IGIENE E SANITÀ PUBBLICA  
"G. BROTZU"

Via G. T. Porcell, 4 - 09124 CAGLIARI  
Tel. 070/670028 - Fax 070/668661

Cagliari, .....

6

Si certifica che la Dr.ssa Anna Maria N. Corriga ha tenuto il Seminario  
Teorico-Pratico su " *Coperture Vaccinali*", per gli Studenti del Corso di Laurea in Medicina  
e Chirurgia nell'anno accademico 1998-99

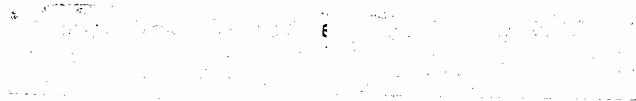
Cagliari, 16 Novembre 1998



Il Direttore della Scuola  
Prof. *Bachisio Scarpa*

**DICHIARAZIONE**  
**RELATIVA ALLA TIPOLOGIA QUALI QUANTITATIVA DELLE PRESTAZIONI SVOLTE**

La sottoscritta Anna Maria Natalia Corriga nata a Meana Sardo, (Prov. NU), il 22/12/1960, residente in



**D I C H I A R A**

1. che la tipologia qualitativa delle prestazioni svolte dal dichiarante, nel periodo dal 10/02/00 al 09/02/04 presso la struttura operativa Direzione Sanitaria (Ufficio controllo attività sanitarie) dell'Azienda Ospedaliera Brotzu di Cagliari sono state le seguenti:
  - settore controllo dei flussi di attività sanitarie comprensivo dell'attività ambulatoriale, ricovero ordinario e ricovero DH;
  - controllo e validazione SDO;
  - settore controllo igienico e ispettivo dell'attività assistenziale;
  - collaborazione attiva nella gestione ed organizzazione del CUP, di cui è stata referente medico della Direzione Sanitaria;
  - rilevazione delle liste d'attesa;
  - problematiche inerenti l'Ufficio Ticket;
  - ha fatto parte, in qualità di referente della Direzione Sanitaria, dell' "Unità per la gestione dei processi clinico-sanitari" dell'Azienda;
  - ha tenuto lezioni nei corsi di aggiornamento professionale obbligatorio per il personale dell'Azienda Coordinatori Infermieristici, Infermieri Professionali, Tecnici di Laboratorio e Radiologia, etc.).
2. che la tipologia qualitativa delle prestazioni svolte dal dichiarante, nel periodo dal 10/02/04 al 31/08/05 presso la struttura operativa Direzione Sanitaria P.O. Binaghi – ASL 8 sono state le seguenti:

## **ALLEGATO L**

- rilevazione e monitoraggio delle liste d'attesa per le prestazioni ambulatoriali e di ricovero; inoltre elaborazione di un modello (fac-simile distribuito ai reparti e servizi) per facilitare la rilevazione dei dati richiesti secondo il D.Lgs.124/98 art3, comma 10 e 12 e succ. m. e i., D.G.R. n° 51/19 – 1998 e succ.;
  - controllo corretta compilazione Cartella Clinica, verifica e controllo completezza SDO;
  - verifica, controllo e rilevazione dati attività ambulatoriale con elaborazione di un programma in formato "excel", distribuito ai reparti e servizi erogatori per facilitare l'imputazione dei dati;
  - partecipazione attiva alla redazione dei budget annuali dei reparti e servizi del P.O.;
  - collaborazione all'organizzazione funzionale del personale dirigente e del comparto;
  - verifiche ispettivo-igienico-sanitarie dell'attività assistenziale delle UU.OO. del Presidio, compreso il settore alberghiero e della ristorazione);
  - si è occupata di documentazione medico-legale ( rilascio certificazioni, medicina necroscopica, etc.);
  - servizio in reperibilità diurna/notturna e festiva;
  - oltre le attività routinarie tipiche e proprie di una Direzione Medica di Presidio Ospedaliero.
3. che la tipologia qualitativa delle prestazioni svolte dal dichiarante, nel periodo dal 01/09/05 al 28/02/06 presso la struttura operativa Direzione Sanitaria dell'Azienda Ospedaliera Brotzu sono state le seguenti:
- supporto al "Dipartimento dei Servizi" ed al "Dipartimento Chirurgia" ( per quanto riguarda l'organizzazione e la gestione del personale, la valutazione dei percorsi assistenziali, le attività sanitarie erogate, il controllo della spesa rispetto ai budget assegnati, etc.);
  - inoltre, essendo un Azienda dotata di Servizio di Pronto Soccorso ed attività di Trapianto d'Organi, sono state sviluppate competenze in questi settori;
  - servizio in reperibilità diurna/notturna e festiva per l'emergenza e per l'attività di Trapianto d'Organi
  - oltre le attività routinarie tipiche e proprie di una Direzione Medica di Presidio Ospedaliero.
4. che la tipologia qualitativa delle prestazioni svolte dal dichiarante, nel periodo dal 01/09/06 a tutt'oggi presso la struttura operativa Direzione Sanitaria del P.O. Businco ASL 8, sono e sono state le seguenti:
- nell'ambito delle competenze relative all'edilizia ospedaliera, sovrintende dal punto di vista sanitario alla ristrutturazione della Sala Operatoria "C", delle Camere Mortuarie e dei servizi igienici riservati al pubblico (anno 2006);

## ALLEGATO L

- nel periodo di ristrutturazione della Sala Operatoria "C", organizza la calendarizzazione dell'utilizzo delle sale operatorie sulla base delle necessità prioritarie (rispetto alle liste d'attesa) dei Reparti chirurgici nelle restanti Sale operatorie "A" e "B";
- relativamente agli aspetti igienico-sanitari, sulla base della letteratura e con il coinvolgimento delle capo-sala ed operatori infermieristici, sono stati elaborati diversi Protocolli (Protocollo di sanificazione ambienti confinati, Protocollo interno "Lavaggio delle mani" ed un "Manuale interno di disinfezione") (anno 2006);
- già componente dello staff di Presidio per le verifiche igieniche e tecniche (nota Direzione Sanitaria P.O. Businco prot. n° 5871/DS del 12/10/06));
- nel settore medico-legale, elaborazione della modulistica relativa a: "Modello Certificato esclusione di reato", "Modello Richiesta riscontro diagnostico" (2006);
- nel settore "controllo attività sanitarie, elaborazione della modulistica relativa a: "Richiesta prestazioni/consulenze ad altro Presidio/Struttura", etc. (2006);
- nell'ambito della organizzazione e gestione del personale, ha effettuato la ricognizione del personale con il calcolo delle piante organiche dei reparti e servizi (personale mancante: Medici, Infermieri Professionali, Tecnici ed OSS) (2006);
- avvio in collaborazione col Servizio Farmacia della "Distribuzione diretta dei farmaci" per 30 giorni post-dimissione, in applicazione della Lg. 405/01 (2007);
- già componente del CIO del P.O. Businco (nota Direzione Sanitaria P.O. Businco prot. n° 1735/DS del 08/06/07);
- ha partecipato alle discussioni del budget dei Reparti e Servizi di questo Presidio con il Direttore Sanitario ed il Controllo di Gestione nell'anno 2007 (Convocazione Direzione Sanitaria Aziendale Prot. n° 1197DS del 05/04/07);
- in collaborazione con la Fisica Sanitaria si è occupata delle pratiche relative:
  - o Alla dismissione delle due sorgenti di Cobalto 60 (ottobre 2007);
  - o Al Nulla Osta di Categoria B per l'impiego di sorgenti radiogene presso la struttura del P.O. "Businco" (Marzo 2008).
  - o Comunicazione ISPEL installazione R.M. ad uso diagnostico ai sensi del D.M. 02/08/91 – (Marzo 2008)
- già referente per la Direzione Sanitaria del P.O. Businco per le tematiche relative a:
  - o sistema informativo/informatico-ospedaliero;
  - o edilizia sanitaria(nota Direzione Sanitaria P.O. Businco prot. n° 4333/DS del 16/07/08)
- in qualità di dirigente esperto in organizzazione sanitaria ospedaliera, ha fatto parte di un gruppo di lavoro creato per elaborare, predisporre le azioni e garantire la realizzazione di un modello di riorganizzazione interna del Presidio Ospedaliero Businco (nota Direzione Generale prot. n° 4368 del 21/01/08);



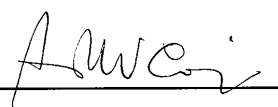
## ALLEGATO L

- con la collaborazione di un Medico Specializzando in Igiene, ha elaborato, sulla base della normativa vigente un "regolamento interno sui rifiuti ospedalieri", presentandolo e discutendolo in incontri con capo sala, capo-tecnici, personale infermieristico e O.S.S. (2008);
- relativamente ai compiti di organizzazione e gestione del personale è stata incaricata di redigere dei prospetti e calcoli per la ricognizione degli infermieri e di effettuare una rivalutazione delle necessità prioritarie, indicando la definizione di assegnazione delle risorse umane per il potenziamento dei servizi ( nota di convocazione Direzione Sanitaria Aziendale prot.n° 227 del 01/02/08);
- supporto organizzativo, per la parte di competenza, per l'avvio della metodica IORT (radioterapia intraoperatoria) per i tumori della mammella, (2008);
- relativamente agli aspetti di "Risk Management", elaborazione ed utilizzo, in via sperimentale, di una check-list per la sicurezza chirurgica in sala operatoria (2008);
- ha partecipato all'avvio del "Progetto Regionale SISAR", compilando i file "Questionario Ciclo operativo Ricovero", "Questionario Ciclo operativo Sale operatorie", "Questionario Struttura organizzativa e articolazione aziendale", "Questionario Mappatura applicativa" relativi a questo Presidio Ospedaliero (2008);
- ha rappresentato questa Direzione nelle discussioni e rilevazioni dei bisogni per il nuovo Capitolato delle pulizie, per avvio "asta pubblica affidamento servizio di pulizia";
- dal 2006 a tutt'oggi:
- nell'ambito delle competenze relative agli Studi da sottoporre alla valutazione del Comitato Etico: ha visionato numerosi Progetti di Studi clinici sperimentali e no, per l'espressione del parere di competenza;
- relativamente agli aspetti di "Health Technology Assessment": valutazione, per la parte di competenza, di apparecchiature e strumenti seguita da nuova acquisizione di: sterilizzatrice (STERRAD) per la centrale di Sterilizzazione del Blocco Operatorio, nuovo letto operatorio, lavastrumenti, TAC, RMN ed ecografo per il Servizio di Radiodiagnostica, ecografo per il Reparto di Ginecologia, etc.;
- nell'ambito del controllo delle attività sanitarie ( flussi informativi, prestazioni di ricovero, ambulatoriali) si occupa del coordinamento delle attività di raccolta, analisi e monitoraggio dei dati di attività del presidio con funzioni di supporto alle UUOO al fine di garantire omogeneità e correttezza nella produzione e consegna del dato nel rispetto delle norme di legge, dei regolamenti e delle direttive aziendali;
- contributo alla validazione dei dati di attività da parte delle UU.OO. aziendali competenti;
- redige una relazione annuale sui dati di attività sanitaria e sullo stato dell'arte dell'ospedale;

## ALLEGATO L

- svolge attività di supporto alle UU.OO. per il miglioramento dei modelli assistenziali utilizzati;
- supporto ai reparti e servizi per la redazione di proposte e progetti organizzativi, non ultimo supporto alla redazione di progetti sull'abbattimento delle liste d'attesa (Radioterapia, Cardiologia, Terapia del Dolore, Medicina Nucleare, Radiologia interventistica, etc.)(2011-2012-2013);
- si occupa della verifica quali-quantitativa e del controllo di congruenza dell'attività sanitaria relativa ai "progetti di abbattimento liste d'attesa", per l'invio agli Uffici competenti per i successivi atti di competenza;
- nell'ambito della medicina legale, per la parte di competenza, si occupa di predisporre atti e pratiche, soprattutto quelle relative a richieste di risarcimento danni, in collaborazione con gli uffici aziendali preposti;
- collabora nell'ambito dell'organizzazione e gestione funzionale del personale dirigente e del comparto anche con redazione di tabelle riepilogative sull'allocazione delle risorse umane;
- collabora con tutti i reparti e servizi, contribuendo ad implementare i processi di integrazione fra le diverse UU.OO. , per la garanzia della continuità assistenziale;
- attualmente collabora alla organizzazione e implementazione della procedura degli "armadi farmaceutici virtuali" (sistema SISaR);
- collabora all'elaborazione di proposte organizzative e protocolli per lo sviluppo dell'integrazione ospedale-territorio (per esempio: assistenza domiciliare per il paziente oncologico);
- collabora con diversi servizi sanitari e amministrativi dei Presidi Ospedalieri, territoriali e aziendali.


Cagliari, 23/04/2013

Il Dichiarante \* 

**ALLEGATO M**

**DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA  
RELATIVA A CONTRATTO DI COLLABORAZIONE COORDINATA E CONTINUATIVA  
( DPR n° 445/2000)**

Ai sensi degli artt. 46 e 47, D.P.R. n. 445 del 28.12.2000 e succ. mod. ed int.

La sottoscritta Anna Maria Natalia Corrigan nata a Meana Sardo, (Prov. NU), il 22/12/1960 residente in , consapevole delle sanzioni penali cui può andare incontro, nel caso di dichiarazioni mendaci, di formazione o uso di atti falsi, richiamate dall'art. 76 del D.P.R. n° 445/2000

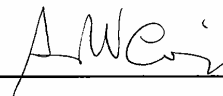
**D I C H I A R A**

☒ di aver prestato servizio presso l'Azienda Ospedaliera Brotzu, in forza di un Contratto di Collaborazione Coordinata e Continuativa, in qualità di Medico Specialista in Igiene e Medicina Preventiva con indirizzo Igiene e Organizzazione dei Servizi Ospedalieri, all'interno dell'Ufficio "Controllo delle attività sanitarie" presso la Direzione Sanitaria, con decorrenza dal 10/02/2000 al 09/02/2004, data in cui sono state rassegnate le dimissioni in quanto vincitore di concorso per Dirigente Medico di Direzione Medica di Presidio Ospedaliero presso l'ASL 8 di Cagliari;

Il sottoscritto dichiara di essere a conoscenza dell'art. 75 del d.p.r. 445/00, relativo alla decadenza dai benefici eventualmente conseguenti al provvedimento emanato qualora l'Asl n. 8, a seguito di controllo, verifichi la non veridicità del contenuto della presente dichiarazione. Il sottoscritto, ai sensi del D.Lgs 196/03 accorda il consenso affinché i propri dati possano essere trattati ed essere oggetto di comunicazione a terzi al fine di provvedere agli adempimenti di obblighi di legge.

Cagliari, 23/04/2013

Il Dichiarante \*



\* la sottoscrizione deve essere apposta in presenza del dipendente addetto o del responsabile del procedimento. In luogo di tali modalità di sottoscrizione il dichiarante **può allegare alla dichiarazione fotocopia di un documento di riconoscimento in corso di validità.**