

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE
XVI Ciclo – 2001 - 2005
COORDINATORE: PROF. GIANNI MARONE**

TESI DI DOTTORATO

**EFFETTI IMMUNOREGOLATORI DELL'ISTAMINA SULLE
CELLULE DEL SISTEMA IMMUNITARIO**

**TUTORE
Chiar.mo
Prof. Gianni Marone**

**CANDIDATA
Dott.ssa Angelica Petraroli**

INDICE

INTRODUZIONE

MATERIALI E METODI

- Reagenti e buffers	pag.	10
- Isolamento e purificazione dei macrofagi polmonari umani	pag.	12
- Isolamento e purificazione dei monociti, macrofagi e cellule dendritiche derivate dai monociti	pag.	13
- Analisi citofluorimetrica	pag.	15
- Incubazioni cellulari	pag.	16
- Dosaggio delle proteine e della β -glucuronidasi	pag.	17
- Dosaggio di IL-6	pag.	19
- Espressione di mRNA per IL-6	pag.	19
- RT-PCR per il recettore dell'istamina H_1	pag.	21
- Western Blot per il recettore dell'istamina H_1	pag.	23
- Dosaggio dell'IL-8	pag.	25
- Dosaggio del calcio intracellulare	pag.	25
- Analisi statistiche	pag.	27

RISULTATI

- Effetto dell'istamina sulla secrezione della β -glucuronidasi negli HLM	pag.	29
- Effetto dell'istamina sulla secrezione dell'IL-6 negli HLM	pag.	30
- Effetto degli agonisti ed antagonisti H_1 e H_2	pag.	32
- Effetto dell'istamina sul calcio citosolico negli HLM	pag.	34
- Effetto del calcio sulla secrezione dell'IL-6	pag.	36
- Effetto dell'istamina sull'espressione dell'IL-6 negli HLM	pag.	37
- Espressione dell'mRNA del recettore H_1 nei monociti,		

<i>nei HLM e nelle cellule dendritiche</i>	<i>pag.</i> 38
- <i>Differenziazione dei macrofagi dai monociti in vitro</i>	<i>pag.</i> 39
- <i>Espressione genica del recettore H₁ negli MDM</i>	<i>pag.</i> 40
- <i>Western Blot per il recettore H₁</i>	<i>pag.</i> 41
- <i>Effetto dell'istamina sulla secrezione della IL-8</i>	
<i>nei monociti e negli MDM</i>	<i>pag.</i> 43
- <i>Effetti degli antagonisti anti-H₁ ed anti-H₂</i>	<i>pag.</i> 44
- <i>Effetti dell'istamina sul calcio intracellulare [Ca²⁺]_i</i>	
<i>nei monociti e negli MDM</i>	<i>pag.</i> 44
 <i>DISCUSSIONE</i>	 <i>pag.</i> 47
 <i>BIBLIOGRAFIA</i>	 <i>pag.</i> 59
 <i>LEGENDE</i>	 <i>pag.</i> 82
 <i>TABELLE e FIGURE</i>	

INTRODUZIONE

L'istamina fu scoperta nel 1911, quando fu identificata come una potente sostanza vasoattiva, in grado di indurre la contrazione della muscolatura liscia bronchiale ed intestinale (1). Negli anni successivi l'istamina fu implicata come mediatore fondamentale delle reazioni allergiche acute e delle malattie allergiche quali asma, orticaria, rinite e anafilassi (2). L'istamina viene sintetizzata dalla decarbossilazione dell'aminoacido L-istidina tramite l'istidina-decarbossilasi (HDC). Nell'uomo le principali cellule infiammatorie in cui è stata definitivamente dimostrata la sintesi di istamina sono i basofili del sangue periferico ed i mastociti tissutali. In queste cellule, l'istamina sintetizzata viene conservata nei granuli citoplasmatici e secreta rapidamente in seguito alla attivazione cellulare indotta da vari stimoli immunologici e non immunologici (3, 4). Recentemente è stato dimostrato che diversi tipi cellulari di origine mieloide e linfoide (monociti, macrofagi, cellule dendritiche, neutrofili, piastrine, cellule T e cellule B) che presentano un'elevata attività della HDC, sono capaci di produrre istamina (5-7). L'attività della HDC è modulata da diverse citochine

come IL-1, IL-3, IL-12, IL-18, da fattori di crescita quali GM-CSF, fattore stimolante colonie di macrofagi (M-CSF), TNF- α , ed infine da C5, ionofori del calcio, (8, 9) e prodotti batterici come il lipopolisaccaride (LPS) (10). Queste recenti osservazioni suggeriscono che l'istamina potrebbe svolgere un ruolo cruciale anche nei processi di differenziazione e maturazione delle cellule del sistema monocito/macrofagico ed ematopoietico attraverso meccanismi non ancora ben caratterizzati (11).

Il ruolo centrale svolto dall'istamina nella fisiopatologia delle malattie infiammatorie ed allergiche è stato ampiamente chiarito. L'istamina è rilasciata *in vivo* durante le reazioni allergiche (12) e la sua somministrazione esogena riproduce segni e sintomi tipici delle malattie allergiche (13). L'istamina esercita una serie di effetti pro-infiammatori ed immunologici attraverso l'interazione con i recettori H₁, H₂, H₃ e H₄ (14-17). In particolare l'istamina attraverso il recettore H₁ presente sulle cellule muscolari lisce dei bronchi e dei vasi e sulle cellule endoteliali, induce una serie di effetti immediati (vasodilatazione, vasopermeabilizzazione e broncospasmo) che sono responsabili della sintomatologia acuta

delle malattie allergiche (18). L'istamina esercita anche una varietà di altre funzioni regolatorie modulando l'attività dei linfociti (19, 20), dei monociti (21), dei neutrofili (22), degli eosinofili (23), dei macrofagi (24, 25) e delle cellule dendritiche (26, 27). Queste cellule giocano un ruolo fondamentale nella fase iniziale e nel mantenimento della risposta allergica. Un'ampia serie di studi ha dimostrato che l'istamina regola la sintesi e la secrezione di diverse citochine proinfiammatorie e immunomodulanti. Tali effetti si esplicano sia attraverso un'azione diretta dell'istamina sulla produzione di alcune citochine sia attraverso la modulazione della sintesi delle citochine indotta da altri stimoli infiammatori. Gli effetti di tipo diretto includono la regolazione della produzione di IL-2, IL-4 e IFN- γ da parte dei linfociti T (28, 29), l'inibizione della produzione di TNF- α e di IL-12 (30) e l'induzione di IL-10 e IL-18 nei monociti del sangue periferico (25, 31). Di tipo indiretto sono invece l'inibizione della produzione di IFN- γ , TNF- α e di IL-12 indotta dal lipopolisaccaride (21, 32, 33) ed il potenziamento della produzione di IL-6 indotta dalla IL-1 α nei monociti (34). Gli effetti

regolatori dell'istamina non si limitano alla sintesi delle citochine ma si estendono anche a funzioni importanti su altre cellule effettrici secondarie. Ad esempio, l'istamina possiede un effetto chemiotattico sugli eosinofili umani (23) e potenzia l'effetto segretagogo della triptasi nei neutrofili e negli eosinofili umani (35). Inoltre, l'istamina induce esocitosi e secrezione di IL-6 (36) dai macrofagi polmonari (25, 37). Infine, l'istamina attiva le cellule dendritiche immature inducendo la produzione di citochine proinfiammatorie (IL-1 e IL-6) e di chemochine, in particolare IL-8, MIP-1 α , MCP-1 e RANTES. Tali chemochine sono coinvolte nel reclutamento nei siti di infiammazione di altre cellule tra cui cellule T, monociti, neutrofili, basofili e mastociti. Questi ultimi, a loro volta rilasciano istamina suggerendo un feedback positivo che potrebbe contribuire a sostenere la reazione infiammatoria (38). L'istamina è in grado inoltre di attivare le cellule dendritiche immature le quali hanno una ridotta capacità di indurre la differenziazione dei linfociti Th1 ed una maggiore attività promuovente lo sviluppo di linfociti Th2 (39).

Gli effetti biologici dell'istamina sono mediati dai recettori H₁, H₂ e H₄ ma non da H₃ (38). Nell'insieme queste osservazioni possono essere particolarmente rilevanti nelle malattie allergiche, dove un maggiore rilascio di istamina da parte dei mastociti può innescare circuiti che amplificano le risposte immunitarie Th2 e IgE-mediate. Da ciò si evince che l'istamina è coinvolta anche nella fase cronica delle malattie allergiche contribuendo al mantenimento del processo infiammatorio sia attraverso la sintesi di citochine proinfiammatorie sia attraverso il reclutamento di cellule infiammatorie mediato da chemochine.

Crescenti evidenze suggeriscono che l'istamina non soltanto è massivamente rilasciata durante le reazioni allergiche acute ma può essere anche secreta in maniera continua nelle vie respiratorie dei pazienti con asma bronchiale. Infatti, livelli significativi di istamina sono stati trovati nel lavaggio broncoalveolare (BAL) dei pazienti con asma bronchiale durante i periodi asintomatici (40-42) e questi livelli sono stati correlati con la severità dell'asma e l'iperreattività bronchiale (43). Inoltre, i basofili e i mastociti del BAL di pazienti asmatici hanno la capacità di rilasciare quantità maggiori di

istamina *in vitro* rispetto a quelli di individui sani (41). Infine, è stato osservato un numero maggiore di mastociti degranulati e basofili nelle vie respiratorie di asmatici su biopsie polmonari eseguite a distanza dall'attacco acuto (44, 45). Queste osservazioni sono compatibili con l'ipotesi che l'istamina sia cronicamente rilasciata nelle vie respiratorie di pazienti asmatici e possa avere un ruolo nel mantenimento dell'infiammazione delle vie aeree e nel rimodellamento tissutale caratteristico dell'asma bronchiale (46).

I macrofagi rappresentano le cellule infiammatorie predominanti (~80 %) nel parenchima polmonare e nel BAL di soggetti normali e di pazienti asmatici (47). Tali cellule svolgono un ruolo cruciale nella difesa contro le infezioni e nella modulazione locale delle risposte immuni ed infiammatorie (48). I macrofagi polmonari producono un ampio spettro di mediatori tra cui enzimi, mediatori lipidici, radicali liberi dell'ossigeno, citochine e chemochine (49). Queste cellule possono essere attivate da una varietà di stimoli che agiscono su specifici recettori di membrana inclusi i recettori dell'istamina (H_1 , H_2 e H_3 ; (18, 25, 36)). L'attivazione dei recettori dell'istamina modula le diverse funzioni

dei macrofagi come l'espressione delle molecole di adesione (50) e l'esocitosi (24). I macrofagi si trovano spesso in stretta vicinanza con i mastociti nelle vie respiratorie dei pazienti asmatici (44, 45). L'associazione anatomica tra questi due tipi di cellule suggerisce che i macrofagi polmonari possano essere esposti all'istamina rilasciata localmente da mastociti attivati immunologicamente e possano contribuire al mantenimento e all'evoluzione a lungo termine della flogosi allergica.

Un'attenta analisi degli effetti dell'istamina rivela l'eterogeneità delle risposte delle cellule infiammatorie ed immunocompetenti umane a questo mediatore. La maggior parte delle risposte sembra essere legata all'interazione con i recettori H_1 e H_2 . L'interazione dell'istamina con questi due recettori elicitare risposte che sono spesso divergenti con l'attivazione del recettore H_1 che possiede una attività prevalentemente stimolatoria e quella dell' H_2 che induce soprattutto risposte di tipo inibitorio (22, 51). L'espressione dei recettori H_1 e H_2 può quindi essere un potenziale meccanismo per spiegare l'eterogeneità degli effetti dell'istamina sulle cellule infiammatorie ed immuni (52). L'espressione del

recettore H_1 riveste un ruolo cruciale sia nella fase acuta che nella fase cronica dell'infiammazione allergica. Studi su cellule transfettate con il recettore H_1 hanno mostrato che la funzione di questo recettore può essere regolata da differenti meccanismi tra cui 1) upregolazione o downregolazione dell'espressione genica, 2) modifiche post-trascrizionali del recettore che conducono a cambiamenti di affinità per i ligandi, e 3) desensibilizzazione omologa e/o eterologa. Sebbene queste osservazioni suggeriscano che il recettore H_1 sia una struttura dinamica, poco si sa se tali cambiamenti nell'espressione o nella funzionalità del recettore H_1 possano verificarsi anche nelle cellule infiammatorie umane.

La differente responsività dei monociti umani e dei macrofagi o delle cellule dendritiche all'istamina supporta l'ipotesi che la differenziazione cellulare potrebbe essere un fattore coinvolto nella regolazione dell'espressione del recettore H_1 . I monociti, i macrofagi e le cellule dendritiche sono componenti del sistema fagocitico mononucleato, un sistema cellulare ampiamente distribuito che rappresenta il principale effettore dell'immunità innata (53). I monociti sono cellule predominanti del sistema

mononucleato nel sangue e maturano in macrofagi o nelle cellule dendriche quando entrano in vari organi e tessuti (54).

Lo scopo dello studio è stato inizialmente quello di esaminare gli effetti di concentrazioni fisiologiche di istamina sui macrofagi polmonari *in vitro* valutando il rilascio di β -glucuronidasi, un enzima lisosomiale usato come marker di esocitosi, la produzione di IL-6, una delle principali citochine proinfiammatorie prodotta dai macrofagi e le variazioni delle concentrazioni intracellulari del calcio.

Successivamente abbiamo verificato quale recettore fosse coinvolto nell'attivazione dei macrofagi indotta dall'istamina, utilizzando agonisti ed antagonisti selettivi dei recettori H₁ e H₂.

In una seconda parte del nostro studio abbiamo confrontato l'espressione e l'attività funzionale del recettore H₁ nelle cellule mononucleate umane in particolare nei monociti del sangue periferico, nei macrofagi polmonari e nei macrofagi derivati da monociti differenziati *in vitro* (MDM).

MATERIALI E METODI

Reagenti e buffer

L'istamina cloridato, ranitidina cloridrato, Ficoll-Hypaque, Percoll, L-glutamina, soluzione di antibiotici ed antimicotici (10,000 UI/ml penicillina , 10 mg/ml streptomicina e 25 µg/ml amfotericina B), fosfolipasi secretoria di gruppo IA (sPLA₂) (da *Naja mossambica mossambica*), LPS (da *Escherichia coli* sierotipo 026:B6), albumina umana libera da acidi grassi, Triton X-100, fenolftaleina glucuronide e poli-L-lisina sono state acquistate da Sigma (St. Louis, MO). Platelet-activating factor (PAF) è stato acquistato da Biomol (Plymouth, PA). A23187 è stato acquistato da Calbiochem (La Jolla, CA). RPMI e FCS sono stati acquistati da ICN (Costa Mesa, CA). (6-[2-(4-Imidazolil)etilamino]-N-(4-trifluorometilfenil) eptano carbossamide (HTMT dimaleato) e dimaprit cloridato sono state acquistate da Tocris Cookson Ltd. (Bristol, UK). GM-CSF and IL-4 sono stati acquistati da PeproTech (Londra, UK). La fexofenadina è stata offerta dalla Dr. Patrizia Pugnetti (Aventis, Milano, Italia). La levocetirizina è stata donata da UCB Pharma, Italia. I primers per la β -actina, per IL-6, per il

recettore H_1 sono stati disegnati usando il software Beacon Designer 3.0 (Bio-Rad, Hercules, CA) e sintetizzati dall'Invitrogen (Milano, Italia). Il DNA ladder di 100 è stato acquistato da Invitrogen (Milano, Italia). Gli anticorpi monoclonali FITC-coniugato IgG₁, FITC-coniugato anti-CD1a, anti-CD45 ed anti-CD71, PE-coniugato anti-CD11c ed anti-HLA-DR, e APC-coniugato anti-CD14 sono stati comprati da Becton Dickinson (San Jose, CA). Gli anticorpi PE-coniugato IgG₂, anti-CD83 e anti-CD86 sono stati comprati da Caltag (Burlingame, CA). L'anticorpo di coniglio anti- H_1 recettore (H-300) ed il lisato cellulare delle JAR sono stati comprati da Santa Cruz (Santa Cruz, CA). L'anticorpo di scimmia anti- coniglio coniugato a HRP era di Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). L'estere Fura -2 acetossimetile (Fura 2-AM) è stato acquistato da Molecular Probe (Eugene, OR). I vetrini, trattati con poli-L-lisina su cui le cellule si sono differenziate, sono stati acquistati da Fisher (Springfield, NJ).

Il PIPES buffer è composto di 25 mM piperazina-N,N'-bis-2-etanosulfonico acido (Pipes, Sigma), 110 mM NaCl e 5 mM KCl,

pH 7.4. Il Glycine buffer è composto di 400 mM glicina e 400 mM NaCl, pH 10.3.

Il Lysis buffer (LB) per il Western blot è composto di 20 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 mM benzamidina, 10 µg/ml leupeptina, 10 mM NaF, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 e 5% glicerolo.

La soluzione salina di Krebs-Ringer per gli esperimenti con il Ca²⁺ è composta da 160 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 10 mM glucosio, e 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4. Tutti gli altri reagenti sono stati comprati da Carlo Erba (Milano, Italia).

Isolamento e purificazione dei macrofagi polmonari umani

I macrofagi polmonari umani (HLM) sono stati isolati a partire dal parenchima polmonare di pazienti sottoposti a chirurgia toracica (55). Il tessuto macroscopicamente sano era tagliato accuratamente in frammenti e sottoposto a ripetuti lavaggi con PIPES su strato di Nytex (con pori di 120 µm di diametro). La sospensione cellulare (75% a 85%) ottenuta è stata sottoposta a gradiente discontinuo di

Percoll (55) e le cellule sono state quindi risospese (10^6 /ml) in RPMI contenente 5% di siero bovino fetale (FCS), 2 mM di L-glutamina e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica. Le cellule sono state infine incubate a 37°C in piastre di polietilene in incubatore al 5% di CO₂. Dopo 12 ore, è stato rimosso il mezzo ed i macrofagi aderenti sono stati lavati con RPMI. La percentuale di macrofagi al termine di questa procedura risultava raggiungere un grado di purezza compresa tra 95% e il 98% come dimostrato dall'analisi citofluorimetrica di CD71/CD14/HLA-DR (56).

Isolamento e purificazione dei monociti, macrofagi e cellule dendritiche derivate dai monociti

I monociti sono stati isolati da buffy coat di donatori sani ottenuti dal Centro Immunotrasfusionale dell'Università di Napoli Federico II. Le cellule mononucleate del sangue periferico (PMBC) sono state isolate mediante centrifugazione su gradiente di Ficoll (densità 1077). I monociti (Mo) sono stati ulteriormente purificati mediante selezione immunomagnetica negativa (Miltenyi Biotec GmbH, Bergish-Gladbach, Germania) come già precedentemente

descritto (57). I PBMC sono stati prima incubati (15 min, 37°C) con un cocktail di anticorpi monoclonali coniugati con biotina anti-CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 e glicoforina A e successivamente con microbiglie MACS accoppiate con un anticorpo monoclonale anti-biotina. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate e fatte passare attraverso un campo magnetico. Questa procedura permetteva di ottenere una popolazione di monociti con un purezza di 90-95% come dimostrato dall'analisi citofluorimetrica del CD14. I macrofagi derivati da monociti (MDM) sono stati ottenuti incubando i monociti purificati per 7-10 giorni in RPMI con 2mM di L-glutamina, 1 % di soluzione antibiotica-antimicotica e 20 % di FCS. Al termine della coltura la vitalità delle cellule era > 98% come dimostrato con la colorazione con il trypan blue. Dopo 7 e 10 giorni di coltura le cellule sono state analizzate mediante citofluorimetro per valutare l'espressione dei principali marcatori di superficie dei macrofagi (CD14, CD68, CD11c e HLA-DR) (58). Le cellule dendritiche derivate da monociti (DC) sono state ottenute come già riportato (59) incubando monociti purificati da sangue periferico

per 4 giorni in RPMI supplementato con 50 ng/ml di GM-CSF e IL-4. Dopo 4 giorni l'analisi citofluorimetrica delle DC mostrava che queste cellule erano negative o debolmente positive per CD14, fortemente positive per CD1a e negative per l'espressione di CD83.

Analisi citofluorimetrica

L'espressione dei marcatori di superficie è stata analizzata con l'immunofluorescenza diretta ed il citofluorimetro (FACSCalibur, Becton Dickinson), secondo il protocollo qui di seguito riportato. L'analisi è stata eseguita sui monociti e sui macrofagi polmonari immediatamente dopo l'isolamento mentre sulle cellule dendritiche e sugli MDM dopo 4 e 10 giorni di coltura rispettivamente. Le cellule sono state risospese in PBS alla concentrazione di circa 5×10^6 /ml. 5 μ l di sospensione cellulare sono stati incubati (4°C, 20 minuti) con gli anticorpi specifici. Per ridurre l'autofluorescenza spontanea dei macrofagi, le cellule sono state lavate due volte con PBS, risospese in 0.2 ml con una soluzione di Crystal Violet (Certistain[®], Merck, Darmstad, Germania) ed incubate per 5 minuti a 22°C (60). E' stato usato il Cell-Quest software (Becton

Dickinson) per l'acquisizione e analisi. I valori sono espressi come percentuale di cellule positive e negative. Il punto di cut-off tra cellule positive e negative viene stabilito con il controllo isotipico. Le cellule sono considerate positive quando la loro fluorescenza è maggiore di quella osservata nelle cellule marcate con il controllo negativo. L'intensità della fluorescenza viene analizzata calcolando la media dell'intensità di fluorescenza espressa in unità lineari.

Incubazioni cellulari

I macrofagi aderenti sono stati incubati (37°C, da 30 min a 18 ore) in RPMI contenente varie concentrazioni di istamina preparata al momento (10^{-10} - 10^{-6} M), HTMT (H_1 agonista) o dimaprit (H_2 agonista) (10^{-7} - 10^{-6} M). In alcuni esperimenti le cellule sono state preincubate (37°C, 15 min) con varie concentrazioni di fexofenadina (10^{-7} - 10^{-4} M) o ranidina (10^{-4} M) prima dell'aggiunta di istamina (10^{-7} M). Alla fine dell'esperimento, il soprannatante è stato rimosso, centrifugato 2 volte (1000 giri, 4°C, 5 min) e conservato a - 80°C per la successiva determinazione di β -glucuronidasi e di IL-6. La percentuale di cellule vitali è stata

valutata al termine di ogni esperimento mediante la tecnica di esclusione del trypan blue. Le cellule rimanenti nella piastra sono state lisate con Triton X-100 0.1% per la determinazione del contenuto cellulare delle proteine e di β -glucuronidasi.

I monociti e gli MDM aderenti sono stati incubati (37°C, 6-18 ore) con crescenti concentrazioni (10^{-8} - 10^{-6} M) di istamina appena preparata o con LPS (1 μ g/ml), usata come controllo positivo. In esperimenti selezionati, le cellule sono state preincubate (37°C, 30 min) con levocetirizina (10^{-7} - 10^{-5} M) o ranitidina (10^{-5} M) e successivamente stimulate (37°C, 6 h) con l'istamina (10^{-6} M). Alla fine dell'incubazione, i sopranatanti sono stati raccolti, centrifugati due volte (1,000 g, 4°C, 5 min) e conservati a -80°C per la successiva determinazione dell'IL-8. Le cellule rimanenti nelle piastre sono state lisate con 0.1% Triton X-100 per la determinazione del contenuto totale delle proteine (61).

Dosaggio delle proteine e della β -glucuronidasi

La secrezione di β -glucuronidasi nel sopranatante degli esperimenti o nei lisati cellulari è stata valutata con una metodica

colorimetrica (61). In breve, 90 μ l di soprannatanti e/o di lisati cellulari sono stati incubati (37°C, 18 ore) con acetato buffer 0.1 M, pH 4.5, contenente 1 μ mol di fenolftaleina glucuronide. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 900 μ l di buffer contenente glicina e la densità ottica (O. D.) a 540 nm è stata valutata con uno spettrofotometro automatizzato. La β -glucuronidasi secreta è stata espressa come percentuale del contenuto totale di questo enzima nelle cellule, determinato nei campioni lisati con Tryton X-100 0.1%. Ogni esperimento veniva eseguito in duplicato.

Il contenuto cellulare delle proteine (61) e della β -glucuronidasi (62) è stata determinata come precedentemente in cellule lisate con 0.1% Triton X-100. Una curva standard dell'attività della β -glucuronidasi è stata preparando usando β -glucuronidasi tipo H1 originata da *Helix pomata* (Sigma). Una unità della β -glucuronidasi rilascia 1 μ g/ml di fenofaleina dalla fenofaleina glucuronidata a 37°C per 18 ore. L'attività della β -glucuronidasi è stata misurata nei lisati cellulari preparati dai monociti appena isolati, dagli MDM dopo 7 e 10 giorni di cultura e

dai macrofagi polmonari appena isolati e quelli incubati con vari stimoli.

Dosaggio di IL-6

La secrezione di IL-6 nel sopranatante di colture dei macrofagi era determinata con una tecnica ELISA (EURO CLONE, Torquay, UK). Il range di linearità di questi dosaggi era compreso tra 5 e 150 pg/ml. Dal momento che il numero delle cellule aderenti nei pozzetti poteva variare nell'ambito dello stesso esperimento e tra i diversi esperimenti, i risultati erano normalizzati per il contenuto totale di proteine determinato nei campioni cellulari lisati con Tryton 0.1% utilizzando il metodo di Lowry (62).

Espressione di mRNA per IL-6

I macrofagi (5×10^6 / 2 ml) sono stati incubati (37°C, 12 ore) in RPMI 1640 contenente 5% FCS. In seguito le cellule sono state lavate e incubate (37°C, 1-9 ore) con buffer o con istamina (10^{-6} M). Alla fine dell'incubazione l'RNA cellulare è stato estratto con la tecnica del Trizol (Invitrogen, Milano, Italia). Per la risospensione

finale è stata utilizzata acqua con dietilpirocarbonato senza SDS; l'RNA è stato conservato a -80°C . La trascrizione inversa è stata realizzata con 5 mM MgCl_2 , primer oligod(t)₁₆, e trascrittasi inversa MuLV.

La PCR è stata eseguita usando Taq polimerasi (1-2.5 U/reazione) alla temperatura di annealing di 60°C con primers specifici per IL-6 (5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3' e 3'-GAAGAGCCC-TCAGGCTGGACTG-5' (30 cicli). La normalizzazione dell'RNA è stata ottenuta con prodotti di amplificato RT-PCR per β -actina, gene costitutivamente espresso su tutte le cellule. Tutti i prodotti della PCR sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio, visualizzati con bromuro di etidio, un colorante fluorescente che si intercala tra le basi puriniche e pirimidiniche, e fotografati. L'analisi di intensità delle relative bande è stata eseguita mediante il sistema di analisi di immagine ChemidocXRS (Biorad, Hercules, CA).

RT-PCR per il recettore dell' istamina H₁

L'RNA totale estratto da monociti, HLM, DC ed MDM è stato estratto utilizzando il sistema di isolamento per RNA totale SV96 (Promega, Milano, Italia), e trattato con DNasi I Rnasi-free. La trascrizione inversa è stata effettuata con 5 mM MgCl₂, oligod(t)16 primer e la trascrittasi inversa MuLV secondo le istruzioni dell'azienda produttrice (Applied Biosystems, Norwalk, CT) nel thermocycler (GeneAmp PCR System 2400; Applied Biosystems). Il cDNA è stato poi normalizzato con la β -actina. L'espressione del recettore H₁ per l'istamina è stato valutato mediante PCR semiquantitativa e real-time. Negli esperimenti per la RT-PCR semi-quantitativa, campioni equivalenti di cDNA ottenuti da monociti, HLM e DC sono stati amplificati usando i primer specifici per il recettore H₁ preparati come già descritto (63) (forward primer 5'-CATTCTGGGGCCTGGTTTCTCT-3' e reverse primer 5'-CTTGGGGGTTTGGGATGGTGACT-3'). Il protocollo di amplificazione consisteva di 35 cicli come segue: denaturazione, 1 min a 94°C; annealing, 1 min a 62°C ed 1 min estensione dei primer a 72°C. Infine è stato effettuato un allungamento finale a

72°C per 10 min. I prodotti PCR, insieme ad un ladder DNA utilizzato come standard, sono stati separati su un gel di agarosio al 2%, colorato con etidio bromuro e sviluppato mediante il sistema di analisi di immagine ChemidocXRS (Biorad, Hercules, CA). Le lunghezze attese delle bande erano 600 bp per la β -actina e 400 bp per il recettore H_1 . La misura semiquantitativa dell'espressione dell'mRNA del recettore H_1 è stata ottenuta mediante analisi densitometrica effettuata con il software Quantity One (Biorad). La normalizzazione è stata ottenuta calcolando il rapporto H_1/β -actina.

La PCR Real-time quantitativa è stata effettuata nell' iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA) usando il kit PE SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). I primer specifici per la β -actina e per il recettore H_1 utilizzati per la PCR real-time sono stati disegnati dalla Beacon Designer 3.0 software (Bio-Rad) (β -actina forward: 5'- TGC GTG ACA TTA AGG AGA AG -3', e reverse: 5'- GCT CGT AGC TCT TCT CCA -3'; H_1 forward: 5'- CCACTGAACCCCCTCATCT -3', e reverse: 5'- GGCCTTCGTCCTCTATTTCC -3'). Dopo un'iniziale step di

denaturazione a 95°C per 10 minuti, l'amplificazione è stata ottenuta con 40 cicli di denaturazione (95°C) per 30 secondi e annealing (60°C) per 1 minuto. L'efficienza della PCR è stata esaminata mediante diluizioni seriate del campione di cDNA e sono stati ottenuti i dati della melting curve per controllare la specificità della PCR. Ogni campione di cDNA è stato triplicato ed il corrispondente campione no-RT mRNA è stato incluso come controllo negativo. Il livello di mRNA di ogni campione per il recettore H₁ in ogni campione è stato normalizzato con quello dell'mRNA della β-actina. I dati sono stati analizzati con il software di analisi iCycler iQ (Biorad) e l'incremento dell'mRNA del recettore H₁ è stato espresso come fold increase rispetto ai monociti.

Western blot per il recettore dell'istamina H₁

HLM (2 x 10⁶ per campione) e monociti (5 x 10⁶ per campione) sono stati lisati in LB immediatamente dopo la purificazione. I monociti purificati posti in coltura per 7 (MDM7) o 10 (MDM10) giorni sono stati staccati dalla piastra incubando le

cellule (2h, 37°C) con 10 mM di EDTA e successivamente lavati e lisati in buffer di lisi. I lisati cellulari ottenuti sono stati lasciati in ghiaccio per 20 minuti e poi microcentrifugati per 20 min a 4°C. I sopranatanti contenenti gli estratti proteici sono stati diluiti in loading buffer LDS (LSB, Novex, Invitrogen, Milano, Italia) contenente 2.5% di 2β-mercaptoetanololo (Biorad) fino a un volume finale di 100 μl. I campioni sono stati bolliti per 5 minuti e conservati a -80°C. Una aliquota di estratto proteico prima dell'aggiunta di LDS è stata utilizzata per la misurazione delle proteine. Estratti proteici di uguale contenuto proteico (da 5 a 20 μg per campione) sono stati separati su 4-12% di gel Bis-Tris (NuPAGE®, Novex) e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Biorad) insieme ad un ladder proteico biotinilato. Le membrane sono state bloccate (4°C, 2h) in TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) contenente il 4% di BSA, successivamente sono state lavate con TBST e poi incubate (4°C, overnight) con anticorpi di coniglio anti-H₁ umano. Al termine dell'incubazione, le membrane sono state lavate e quindi incubate

(22°C, 1 h) con anticorpi IgG anti-coniglio di capra insieme ad anticorpo anti-biotina coniugato a perossidasi. Le proteine immunoreattive sono state visualizzate con l'ECL (Amersham Biosciences) con un sistema di acquisizione di immagine ChemidocXRS (Biorad).

Dosaggio dell'IL-8

La secrezione dell'IL-8 nei sopranatanti è stata misurata in duplicato mediante ELISA (Euro Clone, Devon, UK). Il range di linearità di questi dosaggi era compreso tra 62 e 2,000 pg/ml. Dal momento che il numero delle cellule aderenti nei pozzetti poteva variare nell'ambito dello stesso esperimento e tra i diversi esperimenti, i risultati sono stati normalizzati per il contenuto totale di proteine determinato nei campioni cellulari lisati con Tryton 0.1% utilizzando il metodo di Lowry (62).

Dosaggio del calcio intracellulare $[Ca^{2+}]_i$

La concentrazione di calcio intracellulare è stata misurata con tecnica microfluorimetrica (64). In breve, le cellule sono state

incubate su vetrini copri-oggetto con 3 μ M di FURA-2AM in RPMI 1640 pH 7,4 per un'ora a temperatura ambiente. Alla fine dell'incubazione il vetrino è stato posto sotto un microscopio a fluorescenza invertita Nikon Diaphot (Nikon, Melville, NY, USA). Le cellule sono state mantenute in soluzione salina durante l'esperimento. Tutti i farmaci testati sono stati aggiunti alle cellule con una rapida iniezione. Una lampada 100 watt Xenon (Osrom, Berlino, Germania), con un filtro rotante avente due differenti filtri di interferenza (340 e 380 nm) e connesso ad un computer, illuminava il campo del microscopio con luce UV, alternando la lunghezza d'onda ad un intervallo di 500 ms. L'intervallo tra ciascun paio di illuminazioni è stato di 3s e l'intervallo tra movimenti del filtro è stato 1s. Di conseguenza la concentrazione di calcio intracellulare è stata misurata ogni 3s. La luce emessa veniva fatta passare attraverso uno specchio dicroico di 400 nm, filtrata a 510 nm e raccolta da un apparecchio connesso ad un amplificatore (Photonic Science, Robertsbridge, UK). Le immagini sono state digitalizzate e analizzate con processore d'immagine di Magiscan (Applied Imaging, Dukesway, UK) mediante il software

AUTOLAB (RBR Altari, Firenze, Italia) che calcolava la concentrazione intracellulare di calcio corrispondente a ciascun paio di immagini utilizzando il rapporto tra l'intensità di luce emessa quando le cellule sono state illuminate a 340 e 380 nm. Le oscillazioni di Ca^{2+} intracellulare sono state definite come variazione di calcio per valori oltre la media \pm ES registrata come baseline. La frequenza delle oscillazioni è stata definita dal numero di picchi registrati in un minuto e l'ampiezza è stata determinata dalla differenza tra il valore massimo del picco di calcio intracellulare e il valore minimo prima del raggiungimento del picco stesso. I valori radiometrici sono stati automaticamente convertiti dal software in calcio intracellulari usando una curva di calibrazione ottenuta in precedenti esperimenti (65).

Analisi Statistiche

I risultati sono stati espressi come media \pm ES per numero di esperimenti ed il valore di p è stato determinato con il test t di Student per campioni indipendenti usando la correzione di Bonferrani (66). Il limite di significatività statistica è stato stabilito

con una $p < 0.05$. I dati soggetti ad un'analisi lineare di regressione sono stati calcolati con la seguente equazione $y = a + bx$ in cui a rappresenta l'intercetta dell'asse y e b la pendenza della linea. Per ciascun trattamento farmacologico negli esperimenti sul calcio intracellulare sono state valutate almeno 5 cellule in minimo tre sessioni sperimentali.

RISULTATI

Effetto dell'istamina sulla secrezione della β -glucuronidasi nei HLM

In una prima serie di esperimenti condotti sui macrofagi polmonari umani è stato valutato l'effetto dell'istamina sulla secrezione di β -glucuronidasi, un marker di esocitosi (67). La **figura 1** mostra i risultati di 6 esperimenti nei quali l'istamina ha indotto la secrezione della β -glucuronidasi in maniera concentrazione-dipendente. Dopo due ore di incubazione si osserva un effetto significativo dell'istamina ad una concentrazione di 10^{-9} M con il massimo rilascio della β -glucuronidasi alla concentrazione di 10^{-7} M con un EC_{50} di $8.2 \pm 3.5 \times 10^{-9}$ M. Inoltre, abbiamo osservato che la più alta concentrazione dell'istamina 10^{-7} M induceva un rilascio 2.4 volte maggiore di quello ottenuto da cellule non stimulate (7.2 ± 0.5 verso 3.0 ± 0.3 % del contenuto totale cellulare $p < 0.01$). Concentrazioni di istamina più alte di 10^{-7} M non aumentano ulteriormente il rilascio della β -glucuronidasi. La vitalità dei macrofagi è stata abitualmente misurata alla fine

dell'esperimento mediante l'esclusione del trypan blue ed è sempre stata superiore al 95%.

La **figura 2** mostra la cinetica del rilascio della β -glucuronidasi indotta dall'istamina (10^{-7} M) sui macrofagi. Tale effetto era relativamente rapido, con inizio 30 minuti dopo l'aggiunta dello stimolo. I dati indicano che concentrazioni submicromolari di istamina inducono una rapida secrezione di β -glucuronidasi dai macrofagi.

Effetto dell'istamina sulla secrezione dell' IL-6 nei HLM

I macrofagi sono un'importante fonte di citochine che regolano risposte infiammatorie ed immuni nel polmone. In questi esperimenti abbiamo valutato l'effetto dell'istamina sull'IL-6, la maggiore citochina prodotta dai macrofagi umani (68). I macrofagi sono stati incubati con concentrazioni crescenti di istamina (10^{-9} a 10^{-6} M) per 6 ore a 37°C . L'istamina incrementa la secrezione di IL-6 nei macrofagi in maniera concentrazione-dipendente (**Figura 3**) inducendo un rilascio 2 volte superiore a quello delle cellule di

controllo alla concentrazione di 10^{-6} M (1.6 ± 0.3 verso $0.8 \pm$ ng di IL-6/mg di proteine).

L'istamina è meno efficace nell'indurre la secrezione di IL-6 rispetto a quella della β -glucuronidasi. Infatti, l' EC_{50} sulla secrezione di IL-6 ($9.3 \pm 2.9 \times 10^{-8}$ M) era circa dieci volte superiore a quella della β -glucuronidasi ($8.2 \pm 3.5 \times 10^{-9}$ M).

La **figura 4** mostra la cinetica del rilascio di IL-6 di tre preparazioni di macrofagi polmonari umani stimolati con 10^{-6} M di istamina. L'incremento massimale della secrezione della IL-6 è stata ottenuto tra 2 e 6 ore di incubazione.

Per stabilire la potenza dell'istamina nell'indurre la secrezione di IL-6 dai macrofagi polmonari umani abbiamo confrontato il rilascio indotto dall'istamina con quello indotto da tre noti agonisti dei macrofagi, quali la fosfolipasi A_2 secretoria (sPLA₂), Platelet-activating factor (PAF) e LPS (**Figura 5**). I risultati indicano che l'istamina è uno stimolo meno potente degli altri inducendo una secrezione che è approssimativamente la metà di quella indotta dagli altri attivatori.

Effetto degli agonisti ed antagonisti H₁ e H₂ sulla secrezione della IL-6 e della β-glucuronidasi nei HLM

Per determinare il tipo di recettore attivato dall'istamina nei macrofagi, le cellule sono state incubate (37°C, 2 ore per β-glucuronidasi e 6 ore per IL-6) con HTMT, un agonista selettivo H₁ (69) o con dimaprit, un agonista selettivo H₂ (51).

La **tabella 1** mostra che HTMT ma non dimaprit induce la secrezione sia di β-glucuronidasi che di IL-6 dai macrofagi. HTMT ha un effetto paragonabile a quello dell'istamina poichè incrementa di circa 2 volte il rilascio basale sia della β-glucuronidasi che dell'IL-6.

Questi dati indicano che l'attivazione del recettore H₁ è coinvolta nell'esocitosi e nel rilascio di IL-6 indotte dall'istamina. Per confermare questi dati, i macrofagi sono stati preincubati con fexofenadina, un antagonista del recettore H₁ di seconda generazione (70) o con ranitidina, un antagonista selettivo H₂ (51). La **figura 6A** mostra che concentrazioni crescenti di fexofenadina (10⁻⁷-10⁻⁴ M) inducono uno spostamento a destra della curva dose-

risposta dell'istamina sulla secrezione di β -glucuronidasi. L'effettiva inibizione della fexofenadina si riduce progressivamente all'aumentare delle concentrazioni dell'agonista (istamina). Questa osservazione suggerisce che la fexofenadina agisce come antagonista competitivo a livello recettoriale. Al contrario la ranitidina (10^{-7} M) non ha alcun effetto sul rilascio della β -glucuronidasi indotta dall'istamina.

I risultati degli esperimenti mostrati nella **figura 6A** sono stati usati per l'analisi Schild Plot. In caso di antagonismo competitivo, l'analisi Schild plot prevede una linea retta con una intercetta sull'ascissa corrispondente al logaritmo di K_d .

La **figura 6B** mostra la retta di regressione ottenuta con i dati di 4 esperimenti separati. La media \pm ES della K_d di fexofenadina è 89.2 ± 22.6 nM, un valore che è vicino a quello di K_i riportato per la fexofenadina nel legame con il recettore H_1 nel tessuto cerebrale di ratto (160 nM; (71)).

Un'altra serie di esperimenti è stata eseguita per verificare se la fexofenadina inibiva anche la secrezione di IL-6 indotta dall'istamina. La **figura 7** mostra che la preincubazione dei

macrofagi con fexofenadina per 15 minuti inibisce in maniera concentrazione-dipendente la secrezione dell'IL-6 indotta dall'istamina alla concentrazione di 10^{-7} M. L'inibizione della fexofenadina è significativa alla concentrazione di 10^{-6} M e massima ad una concentrazione di 10^{-4} M. Nell'insieme questi dati indicano che sia la secrezione della β -glucuronidasi che di IL-6 sono mediati dall'attivazione del recettore H_1 sui macrofagi.

Effetto dell'istamina sul calcio citosolico $[Ca^{2+}]_i$ nei HLM

L'attivazione del recettore H_1 è associata all'attivazione della fosfolipasi C e alla produzione di inositolo 1,4,5-trifosfato. Questi ultimi inducono un aumento delle concentrazioni di calcio $[Ca^{2+}]_i$ (72). I risultati riportati nei paragrafi precedenti indicavano che i macrofagi umani esprimevano un recettore H_1 funzionalmente attivo. Per tale motivo in un altro gruppo di esperimenti abbiamo verificato se l'istamina induceva in queste cellule un aumento di $[Ca^{2+}]_i$ utilizzando la tecnica microfluorimetrica a livello di singola cellula. Quando i macrofagi sono stati esposti alla concentrazione di 10^{-7} M dell'istamina, si osservava in circa il 45 % delle cellule

esaminate un incremento del $[Ca^{2+}]_i$. Inoltre, i macrofagi responsivi presentavano tre differenti patterns dell'incremento del $[Ca^{2+}]_i$ (**Figura 8A**). Il 65% delle cellule presentavano un rapido e prolungato incremento dei livelli basali di $[Ca^{2+}]_i$ (**Figura 8A, pannello superiore**). In un secondo gruppo di cellule (23%) la risposta all'istamina è caratterizzata da un lento e progressivo incremento del $[Ca^{2+}]_i$ (**Figura 8A, pannello intermedio**) e nel rimanente 11% si osservava un pattern oscillatorio (**Figura 8A, pannello inferiore**). In queste cellule le oscillazioni del calcio intracellulare indotte dall'istamina erano caratterizzate da una frequenza di 1-3/min ed un ampiezza che andava da 40 a 60 nM. L'incremento del $[Ca^{2+}]_i$ indotta dall'istamina nei macrofagi responsivi era concentrazione-dipendente e presentava un massimo incremento pari all'80% rispetto ai livelli basali alla concentrazione di 10^{-6} M (**Figura 8B**).

La preincubazione (37°C, 1 min) dei macrofagi con fexofenadina (10^{-5} M) inibiva tutti i tipi di incremento del $[Ca^{2+}]_i$ indotti dalla successiva aggiunta di 10^{-7} M istamina (**Figura 9A**). La curva concentrazione-dipendente dell'effetto inibente della

fexofenadina sui livelli di $[Ca^{2+}]_i$ indotti dall'istamina è mostrata nella **figura 9B**.

Influenza del Ca^{2+} sulla secrezione dell'IL-6 indotta dall'istamina nei HLM

I dati riportati indicano che l'istamina induce la secrezione dell'IL-6 ed incrementa il calcio intracellulare nei macrofagi polmonari umani. Per comprendere se l'incremento del calcio intracellulare fosse necessario per la secrezione dell'IL-6 dai macrofagi, le cellule sono state stimulate con istamina in assenza od in presenza di un agente chelante del calcio, EDTA (10 mM). L'incubazione dei macrofagi con EDTA inibisce completamente la secrezione di IL-6 in risposta all'istamina ma non il rilascio spontaneo (**Tabella II**). In altri esperimenti abbiamo esplorato se lo ionoforo del calcio A23187 induceva il rilascio di IL-6 nei macrofagi. In tre esperimenti, A23187 (10^{-6} M) incrementava significativamente il rilascio dell'IL-6 dai macrofagi polmonari umani (2.51 ± 0.26 ng/mg di proteine) rispetto ai controlli (0.92 ± 0.19), ($p < 0.05$). Questi dati confermano l'ipotesi che l'incremento

del calcio intracellulare è necessario per la secrezione dell'IL-6 indotta dall'istamina.

Effetto dell'istamina sull'espressione dell' IL-6 nei HLM

Numerose evidenze sperimentali indicano che differenti segnali del Ca^{2+} attivano in maniera selettiva alcuni fattori di trascrizione nucleare (73, 74).

Per verificare l'ipotesi che l'istamina possa attivare la trascrizione genica dell'IL-6, abbiamo valutato l'espressione del mRNA per la IL-6 nei macrofagi incubati con buffer (controllo) o con istamina (10^{-6} M). La **figura 10A** mostra i prodotti specifici di amplificazione mediante RT-PCR per IL-6 di un esperimento rappresentativo di tre. La corretta normalizzazione dell' RNA per ciascun campione è stata eseguita confrontando prodotti di amplicato RT-PCR con la β -actina, gene costitutivamente espresso (prima fila). L'istamina incrementa l'espressione di mRNA per IL-6 dopo 3 e 6 ore di incubazione. La **figura 10B** mostra l'analisi densitometrica delle bande dell'IL-6 espressa come rapporto dell'intensità di segnale in cellule stimulate con l'istamina

confrontato con quelle non stimolate. L'effetto di incremento indotto dall'istamina non è più evidente dopo 9 ore di incubazione. Questi dati indicano che l'istamina incrementa la secrezione di IL-6 nei macrofagi aumentando l'espressione del suo specifico mRNA.

Espressione dell'mRNA del recettore H₁ nei monociti, nei HLM e nelle cellule dendritiche

Esperimenti successivi sono stati eseguiti per confrontare l'espressione genica del recettore H₁ nei monociti del sangue periferico, nei macrofagi polmonari e nelle cellule dendritiche. La **figura 11** mostra i prodotti di amplificazione per il recettore H₁ e per il gene costitutivo della β -actina ottenuti in un esperimento rappresentativo di quattro. Piccole quantità di mRNA per H₁ sono stati rilevati nei monociti del sangue periferico. Quantità maggiori di mRNA per il recettore H₁ sono stati consistentemente rilevati nei HLM e nelle cellule dendritiche. L'analisi densitometrica di quattro esperimenti rivela che il rapporto del segnale di amplificazione H₁/ β -actina è stato 0.34 ± 0.09 nei monociti, 0.62 ± 0.18 nei HLM,

e 0.81 ± 0.11 nei cellule dendritiche. Questi risultati indicano che i macrofagi polmonari e le cellule dendritiche immature contengono quantità maggiori di mRNA per il recettore H₁ rispetto ai monociti del sangue periferico e suggeriscono che la differenziazione dei macrofagi o delle cellule dendritiche induce l'upregolazione del recettore H₁.

Differenziazione dei macrofagi dai monociti in vitro

Per valutare l'ipotesi che la differenziazione dei macrofagi fosse associata all'incremento dell'espressione del recettore dell'istamina H₁ abbiamo usato un modello *in vitro* di macrofagi derivati dai monociti. Inizialmente abbiamo verificato che i monociti in coltura in presenza di 20% FCS avessero acquisito le caratteristiche morfologiche, fenotipiche e biochimiche di macrofagi maturi. La **figura 12** mostra l'analisi citofluorimetrica delle caratteristiche di forward e side scatter dei monociti appena isolate e dei macrofagi derivati dagli stessi monociti (MDM) dopo 10 giorni di cultura. La popolazione di MDM presenta un omogeneo incremento dei segnali di forward e side scatter, indicando un aumento delle dimensioni

cellulari e del contenuto granulare. Inoltre, gli MDM presentano un'incremento dell'espressione di CD11c, CD86 e HLA-DR, marker di superficie specifici dei macrofagi maturi. Infine, come illustrato nella **figura 13**, il contenuto cellulare dell'enzima lisosomiale β -glucuronidasi, che era minimo nei monociti (0.41 ± 0.03 Unità/mg di proteine) iniziava ad aumentare dopo 7 giorni di coltura (1.84 ± 0.05 Unità/mg di proteine) e raggiungere il massimo dopo 10 giorni di coltura (3.32 ± 0.16 Unità/mg di proteine). Questi risultati indicano che i monociti incubati per 7 e 10 giorni con 20 % FCS acquisiscono le caratteristiche morfologiche, fenotipiche e biochimiche dei macrofagi maturi.

Espressione genica del recettore H_1 nei MDM

In un primo gruppo di esperimenti abbiamo esaminato l'espressione dell'mRNA per il recettore H_1 dopo 7 giorni (MDM7) e 10 giorni di differenziazione mediante PCR quantitativa. La **figura 14** mostra i risultati ottenuti in 4 differenti preparazioni cellulari. L'espressione del recettore H_1 incrementava di 5 volte negli MDM7 (4.92 ± 1.33) e 15 volte negli MDM10 (15.00 ± 5) rispetto ai

monociti autologhi. La PCR quantitativa confermava anche che l'espressione del gene per H_1 negli HLM era significativamente più grande (3.00 ± 1.33 volte) rispetto ai monociti. Questi dati confermavano che l'espressione del gene H_1 è significativamente upregolata quando i monociti si differenziano in macrofagi sia *in vitro* che nel polmone *in vivo*.

Western blot per il recettore H_1

Per verificare che l' mRNA per il recettore H_1 fosse tradotto nella proteina abbiamo analizzato lisati di monociti e macrofagi (HLM e MDM) mediante Western blot usando un anticorpo specifico policlonale contro il recettore umano H_1 . Come controllo positivo abbiamo utilizzato le JAR, cellule di linea tumorale (corioncarcinoma) trasfettate con il gene del recettore H_1 umano. La **figura 15** mostra i risultati ottenuti in due preparazioni di monociti e MDM ed una preparazione di HLM. L'anticorpo riconosce una banda principale approssimativamente a 60 Kd, corrispondente alla classica forma del recettore H_1 . Nessun segnale del recettore H_1 è stato rilevato nelle preparazioni di monociti anche quando 25 μ g di

estratto proteico sono stati caricati sui gel, suggerendo che la quantità del recettore H₁ in queste cellule era inferiore al limite di rivelazione del blot. Al contrario, la banda di 60 Kd era chiaramente evidente in MDM7 ed in misura maggiore, negli MDM10. Questa banda comigrava con la banda rivelata nei lisati di JAR, usati come standard. Una banda di appropriata grandezza per il recettore H₁ era, inoltre, chiaramente presente negli HLM. Bande aggiuntive sono state ottenute con l'anticorpo anti-H₁ usato nel Western blot approssimativamente a 48, 72 e 95 Kd. Queste bande erano evidenti nei lisato di MDM₇, MDM₁₀, HLM e nelle JAR, ma non nei monociti. Se queste bande rappresentino varianti o forme glicosilate del recettore H₁ è ancora da definire (75, 76). In ogni caso i nostri risultati indicano che l'upregolazione dell'espressione del gene per il recettore H₁ è associata ad un incremento della sintesi della proteina del recettore H₁ nei macrofagi differenziati.

Effetto dell'istamina sulla secrezione della IL-8 nei monociti e negli MDM

Studi precedenti hanno dimostrato che l'istamina induce la secrezione dell'IL-8 in varie cellule tra le quali cellule endoteliali e cheratinociti (77, 78). Per verificare se l'upregolazione del recettore H₁ determinasse un incremento di risposta all'istamina, abbiamo confrontato la secrezione di IL-8 indotta dall'istamina nei monociti del sangue periferico e negli MDM10. La **figura 16** mostra che l'istamina induceva una secrezione di IL-8 concentrazione-dipendente in entrambe le popolazioni cellulari. Tuttavia, la risposta degli MDM era significativamente maggiore rispetto a quella dei monociti. Infatti, la produzione massimale dell'IL-8 indotta dall'istamina era 5 volte maggiore rispetto alle cellule non stimulate negli MDM ma lo era solo 2 volte nei monociti. La maggiore secrezione di IL-8 prodotta dagli MDM non era dovuta ad un aumentata capacità di queste cellule di produrre la chemochina, dal momento che la secrezione dell'IL-8 era praticamente uguale nei monociti e negli MDM attivati da LPS.

Effetti degli antagonisti anti-H₁ ed anti-H₂ sulla secrezione di IL-8 indotta dall'istamina negli MDM

Per comprendere se l'aumentata produzione di IL-8 negli MDM stimolati con l'istamina fosse dovuta all'overespressione del recettore H₁, abbiamo preincubato gli MDM con la levocetirizina (79) o con la ranitidina prima dell'aggiunta dell'istamina. La **figura 17** mostra che la levocetirizina, un antagonista del recettore H₁, inibiva la secrezione di IL-8 indotta dall'istamina in maniera concentrazione-dipendente negli MDM con IC₅₀ di 847 ± 304 nM. L'antagonista anti-H₂, ranitidina, non influenzava la secrezione indotta dall'istamina negli MDM. Questi risultati dimostrano che la secrezione di IL-8 indotta dall'istamina negli MDM è mediata dall'upregolazione del recettore H₁ funzionalmente attivo.

Effetti dell'istamina sul calcio intracellulare [Ca²⁺]_i nei monociti e negli MDM

Per valutare l'attività funzionale del recettore H₁ nei monociti e negli MDM sono stati condotti esperimenti di microfluorimetria a singola cellula con FURA-2 AM utilizzando la tecnica della video-

immagine. L'istamina (10^{-6} M) non era in grado di indurre alcun segnale del calcio (121.5 ± 10 prima dell'istamina verso 121.46 ± 12 dopo l'istamina) in monociti caricati con Fura-2 (**Figura 18, pannello A**), mentre il PAF (10^{-7} M) come controllo positivo, era in grado di indurre un significativo incremento del calcio intracellulare (121 ± 4.7 prima del PAF verso 165 ± 7.9 dopo PAF, $p < 0.01$) (**Figura 18, pannello B**). E' importante, tuttavia, sottolineare che in piccolo gruppo di cellule (4.5%) l'istamina (10^{-6} M) era in grado di indurre un incremento del calcio intracellulare (121 ± 4.7 prima dell'istamina verso 165 ± 7.9 dopo l'istamina). Questo fenomeno è probabilmente dovuto alla spontanea differenziazione o alla presenza di una piccola percentuale di cellule contaminanti nella preparazione di monociti. Quando i monociti si differenziano in macrofagi, le cellule diventano responsive all'azione dell'istamina, dal momento che questo mediatore era in grado di indurre un incremento significativo del calcio intracellulare (126 ± 2.8 prima dell'istamina verso 173.8 ± 4.7 dopo l'istamina, $p < 0.01$) in cellule caricate con Fura-2. Negli MDM, il PAF (10^{-7} M) riproduceva lo stesso effetto sul calcio intracellulare osservato nei monociti indifferenziati (133.4

± 4.2 prima verso 196 ± 6.1 dopo PAF, $p < 0.01$) (**Figura 19, pannello A**). Per verificare la specificità dell'azione dell'istamina sui recettori H_1 , gli MDM sono stati preincubati con levocetirizina (10^{-5} M). In queste condizioni sperimentali, l'istamina (10^{-6} M) non era in grado di indurre alcun segnale di calcio (135 ± 4 prima verso 135.5 ± 3.5 dopo istamina) (**Figura 19, pannello B**). Le stesse cellule risultavano, al contrario, ancora responsive al PAF (120 ± 2 prima verso 149 ± 2 dopo PAF, $p < 0.01$) (**Figura 19, pannello B**). I dati cumulativi di 3 esperimenti sono riportati nella **Figura 19, pannello C**.

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo esaminato gli effetti di concentrazioni fisiologiche di istamina sui macrofagi polmonari umani *in vitro*. I nostri dati indicano che l'incubazione dei macrofagi con concentrazioni submicromolari di istamina attiva l'esocitosi, la produzione di IL-6 ed incrementa il calcio intracellulare con tre differenti patterns di risposta. Questi effetti dell'istamina sono tutti mediati dall'attivazione del recettore H₁.

Evidenze cliniche e sperimentali suggeriscono che bassi livelli di istamina sono cronicamente rilasciati nelle vie respiratorie di pazienti asmatici anche in assenza di sintomi (40-42). Il livello di istamina dosata nel BAL di asmatici è approssimativamente 1-2 ng/ml (40, 42). Considerando la diluizione del BAL e lo stretto contatto tra mastociti e macrofagi nelle vie aeree, le concentrazioni di istamina che raggiungono i macrofagi polmonari sono comprese tra 10⁻⁷ a 10⁻⁶ M. I nostri risultati dimostrano che queste concentrazioni di istamina sono efficaci nell'incrementare l'esocitosi e la secrezione di IL-6 dai macrofagi.

I nostri risultati forniscono la prima evidenza che concentrazioni fisiologiche di istamina inducono l'espressione ed il rilascio di IL-6 dai macrofagi umani isolati dal parenchima polmonare. L'istamina potenzia la produzione di IL-6 attivando l'espressione del suo specifico mRNA. Comunque, i nostri dati non escludono la possibilità che l'istamina aumenti la stabilità dell'mRNA per IL-6.

La IL-6 è una citochina multifunzionale coinvolta nelle risposte infiammatorie ed immuni (68). Precedenti studi hanno dimostrato che i livelli di IL-6 sono aumentati nel plasma e nel BAL di pazienti con asma (80-82) e che questa citochina è maggiormente espressa nella mucosa bronchiale di questi pazienti rispetto agli individui normali (83). Sebbene il suo ruolo non sia stato completamente chiarito, la IL-6 può partecipare all'infiammazione allergica in vari modi. La IL-6 è un fattore di crescita cellulare ed un fattore di proliferazione e di attivazione delle cellule B (68). Per esempio, la IL-6 è coinvolta nella proliferazione e differenziazione dei mastociti (84, 85), può favorire risposte T_H2 e la produzione di IgE (86) e stimola le cellule

epiteliali delle vie aeree a rilasciare IL-8 (87). Queste osservazioni supportano l'ipotesi che l' IL-6 può avere un importante ruolo nel modulare l'infiammazione allergica nell'asma.

I nostri risultati concordano con precedenti dati che mostrano che l'istamina induce la produzione di IL-6 nelle cellule epiteliali bronchiali (88), nelle cellule endoteliali (89) e nelle cellule B (90). Quindi, l'istamina appare attivare un comune pattern incrementando l'espressione di IL-6 in tutte le maggiori cellule esprimenti questa citochina nel polmone umano.

La conclusione che l'istamina induce l'esocitosi e la secrezione di IL-6 attraverso l'attivazione dei recettori H_1 sui macrofagi è supportata da due evidenze: i) questi eventi sono indotti da HTMT, un agonista selettivo H_1 ma non dall'agonista H_2 , dimaprit e ii) sono inibiti dall'antagonista H_1 , fexofenadina ma non dall'antagonista H_2 , ranitidina. Nel nostro studio inoltre abbiamo osservato che i macrofagi, a differenza dei monociti e delle cellule dendritiche immature, esprimono il recettore H_1 . (18, 25, 36).

Studi successivi hanno messo in evidenza la complessità degli effetti dell'istamina sul network di citochine nelle cellule umane a

seconda del tipo di recettore attivato. Per esempio, l'attivazione della secrezione di IL-6 generalmente avviene attraverso i recettori H₁ (88-90) mentre l'inibizione della secrezione di IL-1, TNF- α e IL-12 da parte di monociti umani stimolati dalla LPS è mediata da recettori H₂ (30, 33, 91). Inoltre, l'attivazione dei recettori H₂ e H₃ stimola il rilascio di IL-10 dai monociti umani e macrofagi (21, 25).

Queste indagini suggeriscono che il rilascio locale di istamina nei tessuti, sede di infiammazione, possa giocare un ruolo nella modulazione del network citochinico più complesso di quanto finora ritenuto. Ancora più interessante è l'ipotesi che l'istamina possa modulare in maniera differente la sintesi di citochine a seconda del tipo di recettore espresso prevalentemente. Attualmente sono in corso studi per definire se i macrofagi isolati da pazienti con asma bronchiale esprimano un pattern di recettori dell'istamina differenti da quello dei soggetti non asmatici.

La stimolazione dei macrofagi con istamina induce un aumento del calcio intracellulare. Questo effetto è inibito dall'antagonista competitivo H₁, fexofenadina. Questi risultati sono in linea con la osservazione generale che l'attivazione del recettore

H₁ è associata al flusso di Ca²⁺ (51) ed indicano che tale segnale di trasduzione è attivo anche nei macrofagi umani.

Diversi studi sostengono l'ipotesi che esistano sottopopolazioni di macrofagi con differenti proprietà morfologiche, biochimiche e funzionali nel polmone umano (92). Se queste differenze siano legate ad un differente stato di maturazione o di attivazione dei macrofagi non è al momento definito. L'ipotesi dell'eterogeneità dei macrofagi polmonari è sostenuta dalla nostra osservazione che le stesse concentrazioni di istamina possono indurre tre distinti profili di risposta del calcio in queste cellule: un incremento lento, un incremento rapido ed un andamento oscillatorio. Questi differenti profili della risposta del Ca²⁺ possono riflettere da una parte, l'attivazione di diverse popolazioni di macrofagi e, dall'altra, differenze qualitative nell'espressione dei recettori dell'istamina sui macrofagi. In ogni caso, i macrofagi polmonari presentano una significativa eterogeneità in risposta all'istamina. Questa osservazione acquista ulteriore importanza alla luce della recente dimostrazione che differenti profili del segnale del Ca²⁺ possano selettivamente attivare fattori di trascrizione nucleare

come NF-kB, c-Jun N-terminal chinasi e NF-AT (73, 74). Pertanto, l'induzione delle differenti risposte del Ca^{2+} può essere un meccanismo con cui l'istamina modula l'espressione di varie citochine nei macrofagi polmonari.

L'antagonista H_1 di seconda generazione fexofenadina inibisce l'esocitosi, la secrezione di IL-6 ed il segnale del Ca^{2+} indotti dall'istamina. L'osservazione che la fexofenadina è un antagonista competitivo a livello del recettore H_1 dell'istamina sui macrofagi polmonari umani con una K_d confrontabile con quella ottenuta in altri tessuti è interessante per una serie di ragioni. Primo, il recettore H_1 sui macrofagi presenta caratteristiche farmacologiche simili al recettore H_1 espresso su altri tessuti. Secondo, l'osservazione che la K_d della fexofenadina sia vicina alla K_i indica che l'effetto inibitorio di questo farmaco sia un evento farmacologico a livello recettoriale e non rappresenti una interazione aspecifica della fexofenadina con la membrana cellulare. Infine, la fexofenadina antagonizza non solo l'effetto dell'istamina sull'esocitosi ma anche sulla sintesi di IL-6. Tale osservazione ha un ruolo fondamentale dal punto di vista clinico. Infatti, essa suggerisce che la somministrazione di questo

farmaco nei pazienti con malattie allergiche può interferire non soltanto con i sintomi acuti ma anche con alcuni dei meccanismi coinvolti nell'infiammazione cronica e nel danno tissutale associato all'attivazione dei macrofagi.

Nel loro insieme i nostri dati dimostrano che l'istamina attiva i macrofagi polmonari umani attraverso il recettore H_1 . In queste cellule, l'istamina aumenta il rilascio di mediatori preformati (β -glucuronidasi) e l'espressione ed il rilascio di IL-6. Questi effetti dell'istamina sono associati ad un incremento delle concentrazioni del calcio citosolico. Questi nuovi effetti dell'istamina su una cellula che svolge un ruolo centrale nelle malattie infiammatorie del polmone forniscono un meccanismo aggiuntivo con cui questo mediatore contribuisce a mantenere l'infiammazione cronica nell'asma bronchiale. La capacità della fexofenadina, un antagonista H_1 selettivo, di inibire l'attivazione dei macrofagi umani indotta dall'istamina apre nuove prospettive nell'uso a lungo termine di questi farmaci nel trattamento delle malattie allergiche ed infiammatorie del polmone.

Gli effetti biologici dell'istamina mediati dall'attivazione del recettore H₁ sembrano essere importanti non solo nella patogenesi dei disordini allergici ma anche nella modulazione delle risposte cardiovascolari (76, 93) e del sistema nervoso centrale (94). Quindi, la regolazione del livello di espressione del recettore H₁ potrebbe essere un importante mezzo per modulare la responsività all'istamina *in vivo*. La modulazione dell'espressione del recettore H₁ nelle cellule umane è stata poco studiata sebbene ci siano alcune evidenze che suggeriscono che l'attività di questo recettore possa essere finemente regolata.

Monociti, macrofagi e cellule dendritiche sono tutti componenti del sistema monocito macrofagico (MPS) (53), un sistema cellulare ampiamente diffuso che è il maggiore effettore dell'immunità innata. Si pensa che queste cellule derivino da cellule midollari CD34⁺ che nel sangue si differenziano in monociti (95).

In questo studio dimostriamo che l'espressione del recettore H₁ è aumentata nei macrofagi polmonari e nelle cellule dendritiche rispetto ai monociti del sangue periferico. Questa osservazione è in linea con i precedenti risultati che mostrano che l'istamina induce la

produzione di IL-6 nei macrofagi polmonari ma non nei monociti attraverso il recettore H_1 (34). I monociti sono le cellule MPS predominanti nel sangue e si differenziano in macrofagi tissutali e cellule dendritiche quando migrano in tessuti periferici. L'ipotesi alla base del nostro studio era che la differenziazione dei macrofagi dai monociti poteva indurre l'upregolazione del recettore H_1 . La differenziazione dei macrofagi *in vitro* è stata confermata con criteri biochimici (secrezione di β -glucuronidasi) e fenotipici (aumento del forward- e del side-scatter e upregolazione di CD11c, CD86 and HLA-DR mediante analisi citofluorimetrica). L'incremento dell'espressione del recettore H_1 richiede almeno 7 giorni di differenziazione ed è massima dopo 10 giorni. L'upregolazione del recettore H_1 può essere dimostrata sia a livello di mRNA (mediante PCR quantitativa) che a livello proteico (mediante western blot), indicando che l'overespressione del recettore nei macrofagi richiede la trascrizione de novo del gene.

Precedenti studi che hanno valutato l'espressione del recettore H_1 in cellule o tessuti infiammatori hanno esaminato soprattutto l'mRNA. Il recettore H_1 è maggiormente espresso sui linfociti Th1

che sui linfociti Th2 ed è upregolato dall'IL-3 (96). E' stato riportato inoltre che lo shock settico indotto da LPS aumenta l'espressione *in vivo* dei recettori H₁ e H₂ nei tessuti cardiaci (97). Successivi studi hanno dimostrato un incremento di mRNA del recettore H₁ nella mucosa nasale di pazienti con rinite allergica rispetto a soggetti normali ma nessuna informazione è stata data sulle cellule in grado di upregolare il recettore H₁ (98, 99). L'incubazione delle cellule epiteliali della mucosa nasale con particolato diesel incrementava l'espressione del recettore H₁ ed aumentava la produzione di IL-8 e GM-CSF indotta dall'istamina (100, 101). La IL-4 induceva l'espressione di mRNA del recettore H₁ nelle cellule endoteliali (102) per quanto altri studi nei cheratinociti umani non hanno riprodotto questa osservazione (103). Uno switch dall'espressione di H₂ a H₁ a livello di mRNA è stato dimostrato in cellule U937 differenziate in macrofagi in seguito ad esposizione a esteri del forbolo. Lo switch del recettore dell'istamina risultava in una upregolazione della produzione di TNF- α indotta dall'istamina (104). I nostri dati dimostrano per la prima volta che anche nelle cellule umane il recettore H₁ aumenta

in seguito a differenziazione cellulare. L'overespressione del recettore H_1 nei macrofagi si associa ad una incrementata capacità di produrre IL-8 in risposta all'istamina, indicando che il recettore H_1 espresso de novo è funzionalmente attivo. I nostri risultati non indicano se l'affinità del recettore espresso su macrofagi differenziati è diverso da quello espresso dai monociti. La possibilità che il recettore espresso dai macrofagi possa avere una affinità più bassa rispetto a quello espresso dai monociti o sia accoppiato in maniera meno efficiente ai trasduttori dovrebbe essere presa in considerazione poichè l'espressione dell'mRNA ed il segnale del western blot sono da 10 a 15 volte superiori nei macrofagi se comparati ai monociti mentre l'incremento della produzione di IL-8 è aumentato solo di 2.5 volte.

L'istamina viene rilasciata soprattutto dai mastociti nei tessuti periferici come il polmone (105), il tratto gastrointestinale e la cute (4). L'osservazione che mentre i monociti si differenziano in macrofagi upregolano il recettore H_1 è in linea con l'ipotesi che queste cellule diventino iperresponsive all'infiammazione allergica polmonare indotta dall'istamina. La capacità dei monociti di

rispondere all'attivazione del recettore H_1 mediante il rilascio di citochine proinfiammatorie e chemochine rinforza il ruolo potenziale di queste cellule nell'asma bronchiale (50). L'osservazione che l'espressione del recettore H_1 possa essere modulata sostiene l'ipotesi che l'overespressione del recettore H_1 possa essere coinvolta nella patogenesi di alcuni disordini allergici come la rinite, l'asma o l'orticaria cronica (18). I nostri risultati suggeriscono che monociti/macrofagi potrebbero essere un modello utile per studiare la regolazione del recettore H_1 nei pazienti allergici. Sono in corso studi per verificare se il recettore H_1 sia upregolato nei monociti del sangue o nei macrofagi ottenuti dal lavaggio broncoalveolare di pazienti con orticaria cronica o con asma bronchiale.

BIBLIOGRAFIA

1. Dale, H. H., and P. Laidlaw. 1910. The physiological action of β -imidazolyl-ethylamine. *J. Physiol.* 41:318-344.
2. Serafin, W. E., and K. F. Austen. 1987. Mediators of immediate hypersensitivity reactions. *N Engl J Med* 317:30-34.
3. Marone, G., V. Casolaro, V. Patella, G. Florio, and M. Triggiani. 1997. Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 114:207-217.
4. Marone, G., L. M. Lichtenstein, and S. J. Galli. 2000. *Mast Cells and Basophils*. Academic Press, San Diego.
5. Kubo, Y., and K. Nakano. 1999. Regulation of histamine synthesis in mouse CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Inflamm Res* 48:149-153.
6. Laszlo, V., G. Rothe, H. H., J. B. Szeberenyi, O. E., S. G., and F. A. 2001. Increased histidine decarboxylase expression during in vitro monocyte maturation; a possible role of endogenously synthesised histamine in

monocyte/macrophage differentiation. *Inflamm Res* 50:428-434.

7. Szeberenyi, J. B., E. Pallinger, M. Zsinko, Z. Pos, G. Rothe, E. Orso, S. Szeberenyi, G. Schmitz, A. Falus, and V. Laszlo. 2001. Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. *Immunol Lett* 76:175-182.
8. Schneider, E., H. Pollard, F. Lepault, D. Guy-Grand, M. Minkowski, and M. Dy. 1987. Histamine-producing cell-stimulating activity. Interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induce de novo synthesis of histidine decarboxylase in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 139:3710-3717.
9. Belke, K., J. Baron, W. Schmutzle, and G. Zwadlo-Klarwasser. 1999. Histidine decarboxylase expression in human monocytes, macrophages and macrophage subsets. *Int Arch Allergy Immunol* 118:353-354.
10. Deng, X., Z. Yu, H. Funayama, N. Shoji, T. Sasano, Y. Iwakura, S. Sugawara, and Y. Endo. 2005. Mutual

augmentation of the induction of the histamine-forming enzyme, histidine decarboxylase, between alendronate and immuno-stimulants (IL-1, TNF, and LPS), and its prevention by clodronate. *Toxicol Appl Pharmacol*.

11. Jutel, M., B. K., and A. C.A. 2005. Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *Int Arch Allergy Immunol* 137:82-92.
12. Bochner, B. S., and L. L.M. 1991. Anaphylaxis. *N Engl J Med* 324:1785-1790.
13. White, M. V., J. E. Slater, and M. A. Kaliner. 1987. Histamine and asthma. *Am Rev Respir Dis* 135:1165-1176.
14. Ash, A. S., and H. O. Schild. 1997. Receptors mediating some actions of histamine. 1966. *Br J Pharmacol* 120:302-314, discussion 300-301.
15. Arrang, J. M., M. Garbarg, and J. C. Schwartz. 1983. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* 302:832-837.
16. Coge, F., S. P. Guenin, H. Rique, J. A. Boutin, and J. P. Galizzi. 2001. Structure and expression of the human

histamine H4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 284:301-309.

17. Oda, T., N. Morikawa, Y. Saito, Y. Masuho, and S. Matsumoto. 2000. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 275:36781-36786.
18. White, M. V. 1990. The role of histamine in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 86:599-605.
19. Cameron, W., K. Doyle, and R. E. Rocklin. 1986. Histamine type I (H1) receptor radioligand binding studies on normal T cell subsets, B cells, and monocytes. *J Immunol* 136:2116-2120.
20. Ogden, B. E., and H. R. Hill. 1980. Histamine regulates lymphocyte mitogenic responses through activation of specific H1 and H2 histamine receptors. *Immunology* 41:107-114.
21. Elenkov, I. J., E. Webster, D. A. Papanicolaou, T. A. Fleisher, G. P. Chrousos, and R. L. Wilder. 1998. Histamine

- potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H₂ receptors. *J Immunol* 161:2586-2593.
22. Beer, D. J., S. M. Matloff, and R. E. Rocklin. 1984. The influence of histamine on immune and inflammatory responses. *Adv Immunol* 35:209-268.
 23. Clark, R. A., J. I. Gallin, and A. P. Kaplan. 1975. The selective eosinophil chemotactic activity of histamine. *J Exp Med* 142:1462-1476.
 24. Triggiani, M., M. Gentile, A. Secondo, F. Granata, A. Oriente, M. Taglialatela, L. Annunziato, and G. Marone. 2001. Histamine induces exocytosis and IL-6 production from human lung macrophages through interaction with H₁ receptors. *J Immunol* 166:4083-4091.
 25. Sirois, J., G. Menard, A. S. Moses, and E. Y. Bissonnette. 2000. Importance of histamine in the cytokine network in the lung through H₂ and H₃ receptors: stimulation of IL-10 production. *J Immunol* 164:2964-2970.
 26. Ohtani, T., S. Aiba, M. Mizuashi, Z. U. Mollah, S. Nakagawa, and H. Tagami. 2003. H₁ and H₂ histamine

receptors are absent on Langerhans cells and present on dermal dendritic cells. *J Invest Dermatol* 121:1073-1079.

27. Mazzoni, A., H. A. Young, J. H. Spitzer, A. Visintin, and D. M. Segal. 2001. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest* 108:1865-1873.
28. Lagier, B., B. Lebel, J. Bousquet, and J. Pene. 1997. Different modulation by histamine of IL-4 and interferon- γ (IFN- γ) release according to the phenotype of human T_{H0}, T_{H1} and T_{H2} clones. *Clin Exp Immunol* 108:545-551.
29. Dohlsten, M., H. O. Sjogren, and R. Carlsson. 1987. Histamine acts directly on human T cells to inhibit interleukin-2 and interferon- γ production. *Cell Immunol* 109:65-74.
30. van der Pouw Kraan, T. C., A. Sniijders, L. C. Boeijs, E. R. de Groot, A. E. Alewijnse, R. Leurs, and L. A. Aarden. 1998. Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H₂ receptors. *J Clin Invest* 102:1866-1873.

31. Kohka, H., M. Nishibori, H. Iwagaki, N. Nakaya, T. Yoshino, K. Kobashi, K. Saeki, N. Tanaka, and T. Akagi. 2000. Histamine is a potent inducer of IL-18 and IFN- γ in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 164:6640-6646.
32. Carlsson, R., M. Dohlsten, and H. O. Sjogren. 1985. Histamine modulates the production of interferon- γ and interleukin-2 by mitogen-activated human mononuclear blood cells. *Cell Immunol* 96:104-112.
33. Vannier, E., L. C. Miller, and C. A. Dinarello. 1991. Histamine suppresses gene expression and synthesis of tumor necrosis factor alpha via histamine H₂ receptors. *J Exp Med* 174:281-284.
34. Vannier, E., and C. A. Dinarello. 1994. Histamine enhances IL-1-induced IL-6 gene expression and protein synthesis via H₂ receptors in peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 269:9952-9956.
35. He, S., Q. Peng, and A. F. Walls. 1997. Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human

- mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J Immunol* 159:6216-6225.
36. Cluzel, M., M. C. Liu, D. W. Goldman, B. J. Undem, and L. M. Lichtenstein. 1990. Histamine acting on a histamine type 1 H₁ receptor increases β -glucuronidase release from human lung macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3:603-609.
37. Azuma, Y., M. Shinohara, P. L. Wang, A. Hidaka, and K. Ohura. 2001. Histamine inhibits chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion production, and the production of TNF α and IL-12 by macrophages via H₂-receptors. *Int Immunopharmacol* 1:1867-1875.
38. Caron, G., Y. Delneste, E. Roelandts, C. Duez, N. Herbault, G. Magistrelli, J. Y. Bonnefoy, J. Pestel, and P. Jeannin. 2001. Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *J Immunol* 166:6000-6006.
39. Caron, G., Y. Delneste, E. Roelandts, C. Duez, J. Y. Bonnefoy, J. Pestel, and P. Jeannin. 2001. Histamine

polarizes human dendritic cells into T_H2 cell-promoting effector dendritic cells. *J Immunol* 167:3682-3686.

40. Liu, M. C., E. R. Bleeker, L. M. Lichtenstein, A. Kagey-Sobotka, Y. Niv, T. L. McLemore, S. Permutt, D. Proud, and W. C. Hubbard. 1990. Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D₂, and other bronchoconstricting prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis* 142:126-132.
41. Casolaro, V., D. Galeone, A. Giacummo, A. Sanduzzi, G. Melillo, and G. Marone. 1989. Human basophil/mast cell releasability. V. Functional comparisons of cells obtained from peripheral blood, lung parenchyma, and bronchoalveolar lavage in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 139:1375-1382.
42. Wenzel, S. E., A. A. Fowler, 3rd, and L. B. Schwartz. 1988. Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma. *Am Rev Respir Dis* 137:1002-1008.

43. Jarjour, N. N., W. J. Calhoun, L.-B. Schwartz, and B. W.W. 1991. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatic are associated with increased airway obstruction. *Am Rev Respir Dis* 144:83-87.
44. Crimi, E., C. M., M. Milanese, R. G.A., and B. V. 1991. Increase of mast cell numbers in mucosa after the late-phase asthmatic response to allergen. *Am Rev Respir Dis* 144:1282-1286.
45. Pesci, A., A. Foresi, G. Bertorelli, A. Chetta, and D. Olivieri. 1993. Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 147:684-689.
46. Vignola, M. A., J. Kips, and J. Bouquet. 2000. Tissue remodelling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 105:1041-1053.
47. Merchant, R. K., D. A. Schwartz, R. A. Helmers, C. S. Dayton, and G. W. Hunninghake. 1992. Bronchoalveolar

- lavage cellularity. The distribution in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis* 146:448-453.
48. Johnston, R. B. J. 1988. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 318:747-752.
 49. Nathan, C. F. 1987. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79:J. Clin. Invest.
 50. Vignola, A. M., P. Chanez, P. Paul-Lacoste, N. Paul-Eugene, P. Godard, and J. Bousquet. 1994. Phenotypic and functional modulation of normal human alveolar macrophages by histamine. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:456-463.
 51. Ganellin, C. 1992. Pharmacology of H₁ and H₂ receptors. In *The Histamine Receptor*. J. C. Schwartz, and H. Haas, eds. Wiley-Liss, New York.
 52. Weltman, J. K. 2003. Histamine as a regulator of allergic and asthmatic inflammation. *Allergy Asthma Proc* 24:227-229.
 53. van Furth, R. 1982. Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology* 161:178-185.
 54. Sunderkotter, C., T. Nikolic, M. J. Dillon, N. Van Rooijen, M. Stehling, D. A. Drevets, and P. J. Leenen. 2004.

Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172:4410-4417.

55. Triggiani, M., A. Oriente, and G. Marone. 1994. Differential roles for triglyceride and phospholipid pools of arachidonic acid in human lung macrophages. *J Immunol* 152:1394-1403.
56. Eischen, A., B. Duclos, M. Schmitt-Goguel, N. Rouyer, J. P. Bergerat, M. Hummel, R. Oskam, and F. Oberling. 1994. Human resident peritoneal macrophages: phenotype and biology. *Br J Haematol* 88:712-722.
57. Triggiani, M., F. Granata, A. Oriente, M. Gentile, A. Petraroli, B. Balestrieri, and G. Marone. 2002. Secretory phospholipases A2 induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur J Immunol* 32:67-76.
58. Andreesen, R., W. Brugger, C. Scheibenbogen, M. Kreutz, H. G. Leser, A. Rehm, and G. W. Lohr. 1990. Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* 47:490-497.

59. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179:1109-1118.
60. Umino, T., C. M. Skold, S. J. Pirruccello, J. R. Spurzem, and S. I. Rennard. 1999. wo-colour flow-cytometric analysis of pulmonary alveolar macrophages from smokers. *Eur Respir J* 13:894-899.
61. Triggiani, M., F. Granata, A. Oriente, V. De Marino, M. Gentile, C. Calabrese, C. Palumbo, and G. Marone. 2000. Secretory phospholipases A2 induce beta-glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J Immunol* 164:4908-4915.
62. Lowry, O., A. Rosebrough, A. Farr, and R. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-268.
63. Idzko, M., A. la Sala, D. Ferrari, E. Panther, Y. Herouy, S. Dichmann, M. Mockenhaupt, F. Di Virgilio, G. Girolomoni,

- and J. Norgauer. 2002. Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 109:839-846.
64. Cataldi, M., A. Secondo, A. D'Alessio, F. Sarnacchiaro, A. M. Colao, S. Amoroso, G. F. Di Renzo, and L. Annunziato. 1999. Involvement of phosphodiesterase-cGMP-PKG pathway in intracellular Ca²⁺ oscillations in pituitary GH3 cells. *Biochim Biophys Acta* 1449:186-193.
65. Secondo, A., M. Taglialatela, M. Cataldi, G. Giorgio, M. Valore, G. Di Renzo, and L. Annunziato. 2000. Pharmacological blockade of ERG K(+) channels and Ca(2+) influx through store-operated channels exerts opposite effects on intracellular Ca(2+) oscillations in pituitary GH(3) cells. *Mol Pharmacol* 58:1115-1128.
66. Snedecor, G. W. 1980. *Statistical Methods*. Iowa State University Press, Ames.
67. Wall, A. F., Y. K. Rhee, D. J. Gould, C. Walters, C. Robinson, M. K. Church, and S. T. Holgate. 1991. Inflammatory mediators and cellular infiltration of lungs in a

- guinea pig model of the late asthmatic reaction. *Lung* 169:227-240.
68. Hirano, T. 1998. Interleukin 6 and its receptor: Ten years later. *Int Rev Immunol* 16:249-284.
69. Qiu, R., K. L. Melmon, and M. M. Khan. 1990. Effects of histamine-trifluoromethyl-toluidine derivative (HTMT) on intracellular calcium in human lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 253:1245-1252.
70. Simons, E. F., and J. K. Simons. 1997. Peripheral H1-blockade effect of fexofenadine. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79:530-532.
71. Markham, A., and A. Wagstaff. 1998. Fexofenadine. *Drugs* 55:269-274.
72. Berridge, M., M. D. Bootman, and P. Lipp. 1998. Calcium - A life and death signal. *Nature* 395:645-648.
73. Dolmetsch, R. E., R. S. Lewis, C. C. Goodnow, and J. I. Healy. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386:855-858.

74. Dolmetsch, R. E., K. Xu, and R. S. Lewis. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392:933-936.
75. Mitsuhashi, M., and D. G. Payan. 1989. Receptor glycosylation regulates the affinity of histamine H1 receptors during smooth muscle cell differentiation. *Mol Pharmacol* 35:311-318.
76. Matsuda, N., S. Jesmin, Y. Takahashi, E. Hatta, M. Kobayashi, K. Matsuyama, N. Kawakami, I. Sakuma, S. Gando, H. Fukui, Y. Hattori, and R. Levi. 2004. Histamine H1 and H2 receptor gene and protein levels are differentially expressed in the hearts of rodents and humans. *J Pharmacol Exp Ther* 309:786-795.
77. Jeannin, P., Y. Delneste, P. Gosset, S. Molet, P. Lassalle, Q. Hamid, A. Tsicopoulos, and A. B. Tonnel. 1994. Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells. *Blood* 84:2229-2233.
78. Kohda, F., T. Koga, H. Uchi, K. Urabe, and M. Furue. 2002. Histamine-induced IL-6 and IL-8 production are

differentially modulated by IFN-gamma and IL-4 in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 28:34-41.

79. Day, J. H., A. K. Ellis, and E. Rafeiro. 2004. Levocetirizine: a new selective H1 receptor antagonist for use in allergic disorders. *Drugs Today* 40:415-421.
80. Yokoyama, A., N. Kohno, S. Fujino, H. Hamada, Y. Inoue, S. Fujioka, S. Ishida, and K. Hiwada. 1995. Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1354-1358.
81. Virchow, J. C. J., C. Walker, D. Hafner, C. Kortsik, P. Werner, H. Matthys, and C. T. Kroegel. 1995. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 151:960-968.
82. Tillie-Leblond, I., J. Pugin, C. H. Marquette, C. Lamblin, F. Saulnier, A. Bricet, B. Wallaert, A. B. Tonnel, and P. Gosset. 1999. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 159:487-494.

83. Marini, M., E. Avoni, J. Hollemborg, and S. Mattioli. 1992. Cytokine mRNA profile and cell activation in bronchoalveolar lavage fluid from nonatopic patients with symptomatic asthma. *Cytokine mRNA profile and cell activation in bronchoalveolar lavage fluid from nonatopic patients with symptomatic asthma* 102:661-669.
84. Saito, H., M. Ebisawa, H. Tachimoto, M. Shichijo, K. Fukagawa, K. Matsumoto, Y. Iikura, T. Awaji, G. Tsujimoto, M. Yanagida, H. Uzumaki, G. Takahashi, K. Tsuji, and T. Nakahata. 1996. Selective growth of human mast cells induced by Steel factor, IL-6, and prostaglandin E2 from cord blood mononuclear cells. *J Immunol* 157:343-350.
85. Hu, Z. Q., K. Kobayashi, and T. Shimamura. 1997. Tumor necrosis factor- α and interleukin-6-triggered mast cell development from mouse spleen cells. *Blood* 89:526-533.
86. Sanchez-Guerrero, I. M., N. Herrero, M. Muro, R. P. Vegara, M. Campos, A. Garcia-Alonso, and M. R. Alvares. 1997. Co-stimulation of cultured peripheral blood mononuclear cells from intrinsic asthmatics with exogenous recombinant IL-6

- produce high levels of IL-4-dependent IgE. *Eur Respir J* 10:2091-2096.
87. Takizawa, H., T. Ohtoshi, N. Yamashita, T. Oka, and K. Ito. 1996. Interleukin-6 receptor expression on human bronchial epithelial cells: regulation by IL-1 and IL-6. *Am J Physiol* 270:346-352.
88. Takizawa, H., T. Ohtoshi, T. Kikutani, H. Okazaki, N. Akiyama, M. Sato, and S. Shji. 1995. Histamine activates bronchial epithelial cells to release inflammatory cytokines in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 108:260-267.
89. Delneste, Y., P. Lassalle, P. Jeannin, M. Joseph, A. B. Tonnel, and P. Gosset. 1994. Histamine induces IL-6 production by human endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 98:344-340.
90. Falus, A. 1992. Interleukin-6 biosynthesis is increased by histamine in human B-cell and glioblastoma cells lines. *Immunology* 78:193-196.
91. Dohlsten, M., T. Kalland, H.-O. Sjögren, and R. Carlsson. 1988. Histamine inhibits interleukin 1 production by

lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood monocytes. *Scand J Immunol* 27:527-532.

92. Kreutz, M., S. W. Krause, B. Hennemann, A. Rehm, and R. Andreesen. 1992. Macrophage heterogeneity and differentiation: defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro. *Res Immunol* 143:107-115.
93. Murata, Y., A. Tanimoto, K. Y. Wang, M. Tsutsui, Y. Sasaguri, D. Corte., and H. Matsushita. 2005. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor increases the expression of histamine and histamine receptors in monocytes/macrophages in relation to arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:430-435.
94. Brown, R. E., D. R. Stevens, and H. L. Haas. 2001. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol* 63:637-672.
95. Takahashi, K., M. Naito, and M. Takeya. 1996. Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathol Int* 46:473-485.

96. Jutel, M., T. Watanabe, S. Klunker, M. Akdis, O. A. Thomet, J. Malolepszy, T. Zak-Nejmark, R. Koga, T. Kobayashi, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2001. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413:420-425.
97. Matsuda, N., Y. Hattori, F. Sakuraya, M. Kobayashi, X. H. Zhang, O. Kemmotsu, and S. Gando. 2002. Hemodynamic significance of histamine synthesis and histamine H1- and H2-receptor gene expression during endotoxemia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366:513-521.
98. Iriyoshi, N., K. Takeuchi, A. Yuta, K. Ukai, and Y. Sakakura. 1996. Increased expression of histamine H1 receptor mRNA in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 26:379-385.
99. Kayasuga, R. 2002. Histamine H1 receptors are involved in mouse nasal allergic responses: a demonstration with H1 receptor-deficient mice. *Int Immunopharmacol* 2:745-750.
100. Mor, S., A. Nagler, V. Barak, Z. T. Handzel, C. Geller-Bernstein, and I. Fabian. 1995. Histamine enhances granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and

interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol* 58:445-450.

101. Terada, N., N. Hamano, K. I. Maesako, K. Hiruma, G. Hohki, K. Suzuki, K. Ishikawa, and A. Konno. 1999. Diesel exhaust particulates upregulate histamine receptor mRNA and increase histamine-induced IL-8 and GM-CSF production in nasal epithelial cells and endothelial cells. *Clin Exp Allergy* 29:52-59.
102. Wierzbicki, T., S. M. Iqbal, S. L. Cuvelier, G. Awong, L. A. Tibbles, and K. D. Patel. 2003. IL-4 primes human endothelial cells for secondary responses to histamine. *J Leukoc Biol* 74:420-427.
103. Giustizieri, M. L., C. Albanesi, J. Fluhr, P. Gisondi, J. Norgauer, and G. Girolomoni. 2004. H1 histamine receptor mediates inflammatory responses in human keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol* 114:1176-1182.
104. Wang, K. Y., N. Arima, S. Higuchi, S. Shimajiri, A. Tanimoto, Y. Murata, T. Hamada, and Y. Sasaguri. 2000. Switch of histamine receptor expression from H2 to H1

during differentiation of monocytes into macrophages. *FEBS Lett* 473:345-348.

105. Togias, A. 2003. H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions. *J Allergy Clin Immunol* 112:S60-68.

LEGENDE

Figura 1 Effetto di concentrazioni crescenti di istamina sulla secrezione della β -glucuronidasi

Le cellule sono state incubate (37°C, 2 h) con le concentrazioni indicate di istamina. Alla fine dell'incubazione, il soprannatante è stato raccolto e centrifugato (1,000 g, 4°C, 5 min). La secrezione della β -glucuronidasi è stata determinata con una tecnica colorimetrica (40). I valori sono stati espressi come percentuale del contenuto totale di cellule determinato su cellule lisate con 0.1% Triton X-100. I dati sono la media \pm ES di sei esperimenti.

* $p < 0.05$ vs. controllo

** $p < 0.01$ vs. controllo

Figura 2 Cinetica della secrezione di β -glucuronidasi indotta dall'istamina

Le cellule sono state incubate con RPMI 1640 (rilascio spontaneo; ○) o con istamina (10^{-7} M; ●). In ciascun punto del tempo della cinetica, i soprannatanti sono stati raccolti e centrifugati (1,000 g, 4°C, 5 min). Il dosaggio della β -glucuronidasi nei soprannatanti è stato determinato con tecnica colorimetrica (40). I valori sono espressi come percentuale del contenuto totale di cellule eseguito su cellule lisate con 0.1% Triton X-100. I dati sono la media \pm ES di 5 esperimenti.

Figura 3 Effetto di concentrazioni crescenti di istamina sulla secrezione dell'IL-6

Le cellule sono state incubate (37°C, 6 h) con le indicate concentrazioni di istamina. Alla fine dell'incubazione, il soprannatante è stato raccolto e centrifugato (1,000 g, 4°C, 5 min). La secrezione

dell'IL-6 è stata determinata con metodo ELISA. I valori sono stati espressi come ng di IL-6/mg di contenuto totale di proteine. I dati sono la media \pm ES di sei esperimenti.

* $p < 0.05$ vs. controllo

Figura 4 Cinetica della secrezione di IL-6 indotta dall'istamina

Le cellule sono state incubate con RPMI (rilascio spontaneo; ○), o con istamina (10^{-6} M; ●). In ciascun punto del tempo della cinetica, i sopranatanti sono stati raccolti e centrifugati (1,000 g, 4°C, 5 min). Il dosaggio dell'IL-6 nei sopranatanti è stato determinato secondo metodo ELISA. I valori sono espressi come ng di IL-6/mg del totale cellulare di proteine. I dati sono la media \pm ES di 5 esperimenti.

Figura 5 **Secrezione di IL-6 indotta dall'istamina, PLA₂ secretoria, PAF e LPS.**

Le cellule sono state incubate (37°C, 6 h) con RPMI (controllo), istamina (10⁻⁶ M), PLA₂ gruppo IA secretoria (10⁻⁶ M), PAF (10⁻⁶ M) o LPS (1 µg/ml). Alla fine dell'incubazione, il soprannatante è stato raccolto e centrifugato (1,000 g, 4°C, 5 min). La secrezione di IL-6 è stata determinata secondo metodo ELISA. I valori sono espressi come ng of IL-6/mg del totale cellulare di proteine. I dati sono la media ± ES di 5 esperimenti.

* p < 0.05 vs. controllo

Figura 6A **Effetto dell'antagonista recettoriale H₁, fexofenadina, e dell'antagonista recettoriale H₂, ranitidina, sulla secrezione della β-glucuronidasi indotta dall'istamina**

Le cellule sono state preincubate (37°C, 15 min) con RPMI (■) o con concentrazione crescente di

fexofenadina (10^{-7} M, ○; 10^{-6} M, ▲; 10^{-5} M, □; 10^{-4} M, ●) o ranitidina (10^{-4} M, △) e sono state poi incubate (2 h, 37°C) con istamina (10^{-7} M). Alla fine dell'incubazione, il soprannatante è stato raccolto e centrifugato (1000 g, 4°C, 5 min). La secrezione della β -glucuronidasi è stata determinata secondo tecnica colorimetrica (40). I valori sono espressi come la percentuale del contenuto totale di cellule determinato in aliquote di cellule lisate con 0.1% Triton X-100. I dati sono la media \pm ES di 5 esperimenti.

Figura 6B Schild plot per l'antagonismo della fexofenadina sulla secrezione della β -glucuronidasi indotta dall'istamina

I dati sono stati ottenuti da esperimenti mostrati in figura 6A. La linea di regressione è stata ottenuta con i dati di 4 esperimenti separati e le barre verticali indicano deviazione standard. La pendenza della linea

è 0.79. La K_d ottenuta dal valore del \log_{10} (fexofenadina) in cui $\log_{10}(\text{dose-ratio } 1) = 0$ è 89 nM.

Figura 7 Effetto della fexofenadina sulla secrezione di IL-6 indotta dall'istamina

Le cellule sono state preincubate (37°C, 15 min) con crescenti concentrazioni di fexofenadina (10^{-7} - 10^{-4} M) e sono state poi incubate (37°C, 6 h) con istamina (10^{-7} M). Alla fine dell'incubazione, il soprannatante è stato raccolto e centrifugato (1000 g, 4°C, 5 min). Il rilascio dell'IL-6 è stato determinato secondo metodo ELISA e i valori sono espressi come ng di IL-6/mg del totale di proteine cellulari. I dati sono la media \pm ES di 5 esperimenti.

* $p < 0.05$ vs. controllo

§ $p < 0.05$ vs. istamina sola

Figura 8 Effetto dell'istamina (10^{-8} - 10^{-6} M) sulle concentrazioni intracellulari del Ca^{2+}

A: Tracciati ottenuti da cellule rappresentativi dell'effetto dell'istamina (10^{-7} M) sul $[Ca^{2+}]_i$. Gli esperimenti sono stati eseguiti con un acquisizione effettuata ad intervalli di 2 secondi.

B: Effetto di differenti concentrazioni di istamina sull'incremento del $[Ca^{2+}]_i$ espresso come la % di incremento dei valori basali. Ciascun punto rappresenta la media \pm ES di 6-10 cellule studiate al minimo in tre differenti sessioni sperimentali. Le barre di errore non sono mostrate quando anche sono troppo piccole graficamente. * $p < 0.05$ vs. cellule non stimulate.

Figura 9 Effetto dell'antagonista recettoriale H_1 fexofenadina (10^{-7} - 10^{-5} M) sull'incremento del $[Ca^{2+}]_i$ indotto dall'istamina

A: Tracciati ottenuti da cellule rappresentativi dell'effetto dell'istamina (10^{-7} M) sul $[Ca^{2+}]_i$. in

assenza (controllo) o in presenza di 10^{-5} M fexofenadina. Gli esperimenti sono stati eseguiti come descritto in Figura 9. Il periodo di incubazione con l'istamina è indicato dalla barra. La freccia indica il tempo di aggiunta della fexofenadina.

B: Effetto delle differenti concentrazioni della fexofenadina (10^{-7} - 10^{-5} M) sul $[Ca^{2+}]_i$ espresso come % di incremento dei valori basali indotti da 10^{-7} M di istamina.

Ciascun punto rappresenta la media \pm ES di 6-10 cellule studiate in minimo tre differenti sessioni sperimentali. Le barre di errore non sono mostrate quando sono troppo piccole graficamente. * $p < 0.05$ vs. cellule trattate con solo istamina.

Figura 10A Effetto dell'istamina sull'espressione dell'mRNA dell'IL-6

Prodotti di amplificazione RT-PCR specifici per la β -actina (prima riga) e per IL-6 (seconda riga) da un

esperimento rappresentativo in cui i macrofagi sono stati messi in cultura da 1 a 9 ore con RPMI solo (controllo) o istamina (10^{-6} M). Un ladder di 100 bp DNA è stato usato come standard. La normalizzazione di RNA per ciascun campione è stata eseguita confrontando prodotti di amplificato RT-PCR della β -actina. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti simili.

Figura 10B Analisi Densitometrica dell'espressione dell'mRNA dell' IL-6 indotta da istamina

Analisi densitometrica della banda dell'IL-6 espressa come il rapporto tra cellule trattate con 10^{-6} M di istamina e cellule non trattate a differenti tempi di incubazione. I dati sono la media \pm ES di tre esperimenti.

Figura 11 **Espressione basale dei recettori dell'istamina H₁ sui monociti, macrofagi polmonari e cellule dendritiche.**

Prodotti di amplificazione RT-PCR per il recettore H₁ e per il gene costitutivo della β -actina in monociti del sangue periferico, macrofagi polmonari (HLM) e cellule dendritiche. L'analisi densitometrica di quattro esperimenti rivela che il rapporto tra il segnale di amplificazione H₁/ β -actina è 0.34 ± 0.09 nei monociti, 0.62 ± 0.18 negli HLM e 0.81 ± 0.11 nelle cellule dendritiche.

Figura 12 **Analisi citofluorimetrica degli MDM**

Cambiamenti in forward- e side scatter, caratteristici dei monociti appena isolati e degli MMD10. L'espressione dei vari marcatori di superficie quali CD45, CD11c, CD86 e HLA-DR in entrambe le popolazioni cellulari. L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata come descritta in materiali e metodi.

Tutti i dati mostrati sono la media \pm ES di 5 singoli esperimenti.

Figura 13 Analisi morfologica e biochimica degli MDM

Durante la differenziazione le cellule diventano più grandi, allungate e tra il settimo ed il decimo giorno di cultura confluenti. Inoltre, il contenuto cellulare dell'enzima lisosomiale β -glucuronidasi che era minimo nei monociti (0.41 ± 0.03 Unità/mg di proteine), significativamente aumentava dopo 7 giorni di cultura (1.84 ± 0.05 Unità/mg di proteine) e raggiungeva un picco massimo dopo 10 giorni di cultura (3.32 ± 0.16 Unità/mg di proteine).

Figura 14 Espressione del gene del recettore H₁ negli MDM

Nei macrofagi differenziati per 7 (MDM7) e 10 (MDM10) giorni da monociti del sangue periferico abbiamo esaminato l'accumulo di mRNA per il recettore H₁ mediante RT-PCR quantitativa.

L'espressione del recettore H_1 aumentava 5 volte negli MDM_7 (4.92 ± 1.33) e 15 volte negli MDM_{10} (15.00 ± 5) rispetto ai monociti autologhi da sangue periferico. Inoltre l'espressione del gene H_1 negli HLM era significativamente più alto (3.00 ± 1.33 fold) che nei monociti. I dati sono la media \pm ES di 4 esperimenti.

Figura 15 Western blot per il recettore dell'istamina H_1

I lisati da monociti e macrofagi (HLM e MDM) sono stati analizzati mediante Western Blot usando un anticorpo specifico contro il recettore umano H_1 . Il recettore H_1 presentava 4 bande corrispondenti a distinte varianti del recettore H_1 . La banda maggiore correva approssimativamente a 60 Kd, e corrisponde alla classica forma del recettore H_1 . Una banda dell'appropriata dimensione per il recettore H_1 era chiaramente valutabile negli HLM. La banda del

recettore H₁ era valutabile anche negli MDM ed era molto più evidente negli MDM₁₀ che negli MDM₇.

Figura 16 Produzione di IL-8 indotta da istamina nei monociti e negli MDM

Le cellule sono state incubate (37°C, 6-18 h) con le indicate concentrazioni di istamina o con LPS (1 µg/ml). Al termine dell'incubazione, i sopranatanti venivano rimossi e centrifugati due volte (1,000 g, 4°C, 5 min). Il rilascio di IL-8 è stato determinato con metodo ELISA (Euro Clone, Devon, UK). Il range di linearità del saggio era tra 62 e 2.000 pg/ml. La risposta degli MDM era significativamente aumentata rispetto a quella dei monociti (5 volte *vs* 2 volte il rilascio indotto in cellule non stimolate), rispettivamente alla più alta concentrazione di istamina (10⁻⁶ M). Il rilascio di IL-8 indotto da LPS non differiva tra monociti e macrofagi.

Figura 17 Effetto degli antagonisti recettoriali anti-H₁ ed anti-H₂ sul rilascio dell'IL-8 indotto dall'istamina negli MDM

Le cellule sono state preincubate (37°C, 30 min) con RPMI o con crescenti concentrazioni di levocetirizina (10⁻⁷ M-10⁻⁵ M) e successivamente stimulate (6 h, 37°C) con l'istamina (10⁻⁶M). Alla fine dell'incubazione, i sopranatanti venivano rimossi e centrifugati due volte (1,000 g, 4°C, 5 min). Il rilascio di IL-8 è stato determinato con metodo ELISA (Euro Clone, Devon, UK). La levocetirizina inibiva la secrezione di IL-8 indotta dall'istamina in maniera concentrazione dipendente negli MDM con IC₅₀ di 847 ± 304 nM. L'antagonista anti-H₂, ranitidina, non influenzava la secrezione indotta dall'istamina negli MDM. I dati sono la media ± di ES dei tre esperimenti.

* p < 0.05 vs. istamina

** p < 0.01 vs. istamina

Figura 18 Effetto dell'istamina (10^{-6} M) sulle concentrazioni intracellulari del Ca^{2+} nei monociti

Il pannello A mostra l'effetto dell'istamina su singole cellule caricate con Fura-2. Durante gli esperimenti le cellule sono state risospese in RPMI senza siero per 90 secondi; poi la perfusione è stata continuata con RPMI con istamina (10^{-6} M) e, alla fine, le cellule sono state perfuse con PAF (10^{-7} M), come indicato dalle barre. La traccia riportata è rappresentativa di 75 cellule registrate in tre differenti esperimenti. Il pannello B raffigura la quantificazione dell'effetto dell'istamina e del PAF sulle concentrazioni intracellulari nei monociti. I dati sono espressi come media dei valori di calcio intracellulari \pm ES. * $p < 0.01$.

Figura 19 Effetto dell'istamina (10^{-6} M) sulle concentrazioni intracellulari del Ca^{2+} negli MDM

Il pannello A mostra l'effetto dell'istamina su singole cellule caricate con Fura-2. Durante gli esperimenti le

cellule sono state risospese in RPMI senza siero per 90 secondi; poi la perfusione è stata continuata con RPMI con istamina (10^{-6} M) e, alla fine, gli MDM sono stati perfusi con PAF (10^{-7} M), come indicato dalle barre. La traccia riportata è rappresentativa di 70 cellule registrate in tre differenti esperimenti. Il pannello B raffigura l'effetto dell'istamina dopo preincubazione con l'antagonista recettoriale anti- H_1 , levocetirizina (10^{-5} M), sulle concentrazioni intracellulari negli MDM. Le cellule sono state risospese in RPMI senza siero per 60 secondi; poi la perfusione è stata continuata con RPMI supplementata con levocetirizina (10^{-5} M). Dopo 300 secondi, l'istamina (10^{-6} M) è stata aggiunta alle cellule, come indicato dalle barre. Alla fine dell'esperimento, gli MDM sono stati perfusi con PAF (10^{-7} M). La traccia riportata è rappresentativa di 80 cellule registrate in tre diversi esperimenti. Il pannello C mostra la quantificazione dell'effetto dell'istamina e dell'istamina (10^{-6} M) più la

levocetirizina (10^{-5} M) sulle concentrazioni intracellulari negli MDM. I dati sono espressi come media dei valori di calcio intracellulari \pm ES. * $p < 0.01$.

Tabella I**Effetto degli agonisti H₁ and H₂ sulla secrezione di β -glucuronidasi e di IL-6 nei macrofagi polmonari umani**

<i>Stimolo</i>		<i>β-Glucuronidasi (% del contenuto cellulare)</i>	<i>IL-6 (ng/mg di proteine)</i>
Mezzo		3.4 \pm 0.5	0.58 \pm 0.12
HTMT	10 ⁻⁷ M	6.9 \pm 1.6*	0.98 \pm 0.10*
	10 ⁻⁶ M	7.1 \pm 1.9*	1.30 \pm 0.20*
Dimaprit	10 ⁻⁷ M	3.1 \pm 0.8	0.55 \pm 0.07
	10 ⁻⁶ M	2.9 \pm 0.9	0.63 \pm 0.09

Le cellule erano incubate (37°C, 2 h per β -glucuronidasi e 6 h per IL-6) con le concentrazioni indicate di HTMT (agonista del recettore H₁) o di dimaprit (agonista del recettore H₂). Alla fine dell'incubazione, il soprannatante era raccolto e centrifugato (1,000 g, 4°C, 5 min). Il rilascio della β -glucuronidasi era eseguito con tecnica colorimetrica (40) ed il dosaggio dell'IL-6 era eseguito con metodo ELISA. I valori del rilascio della β -glucuronidasi erano espressi come la percentuale del contenuto totale cellulare determinato su cellule lisate con 0.1% Triton X-100. I valori del rilascio dell'IL-6 erano espressi come ng di IL-6/mg del contenuto totale di proteine. I dati erano la media \pm DS di 4 esperimenti. * p > 0.05 vs. controllo

Tabella II**Effetto dell'EDTA sulla secrezione dell'IL-6 indotta dall'istamina nei macrofagi polmonari umani**

	<i>IL-6 (ng/mg di proteine)</i>	
	Mezzo di coltura	Mezzo di coltura + EDTA 10 mM
Controllo	0.92 ± 0.19	0.82 ± 0.16
Istamina (10 ⁻⁸ M)	1.11 ± 0.21	0.86 ± 0.15
Istamina (10 ⁻⁷ M)	1.42 ± 0.28*	0.88 ± 0.16
Istamina (10 ⁻⁶ M)	1.69 ± 0.27*	0.92 ± 0.18

Le cellule erano incubate (37°C, 6 h) con le concentrazioni indicate di istamina in RPMI o RPMI contenente EDTA (10 mM). Alla fine dell'incubazione, i soprannatanti erano raccolti e centrifugati (1,000 g, 4°C, 5 min) ed il rilascio dell'IL-6 era misurato con metodo ELISA. I dati erano la media ± DS di 3 esperimenti.

* p < 0.05 vs. controllo

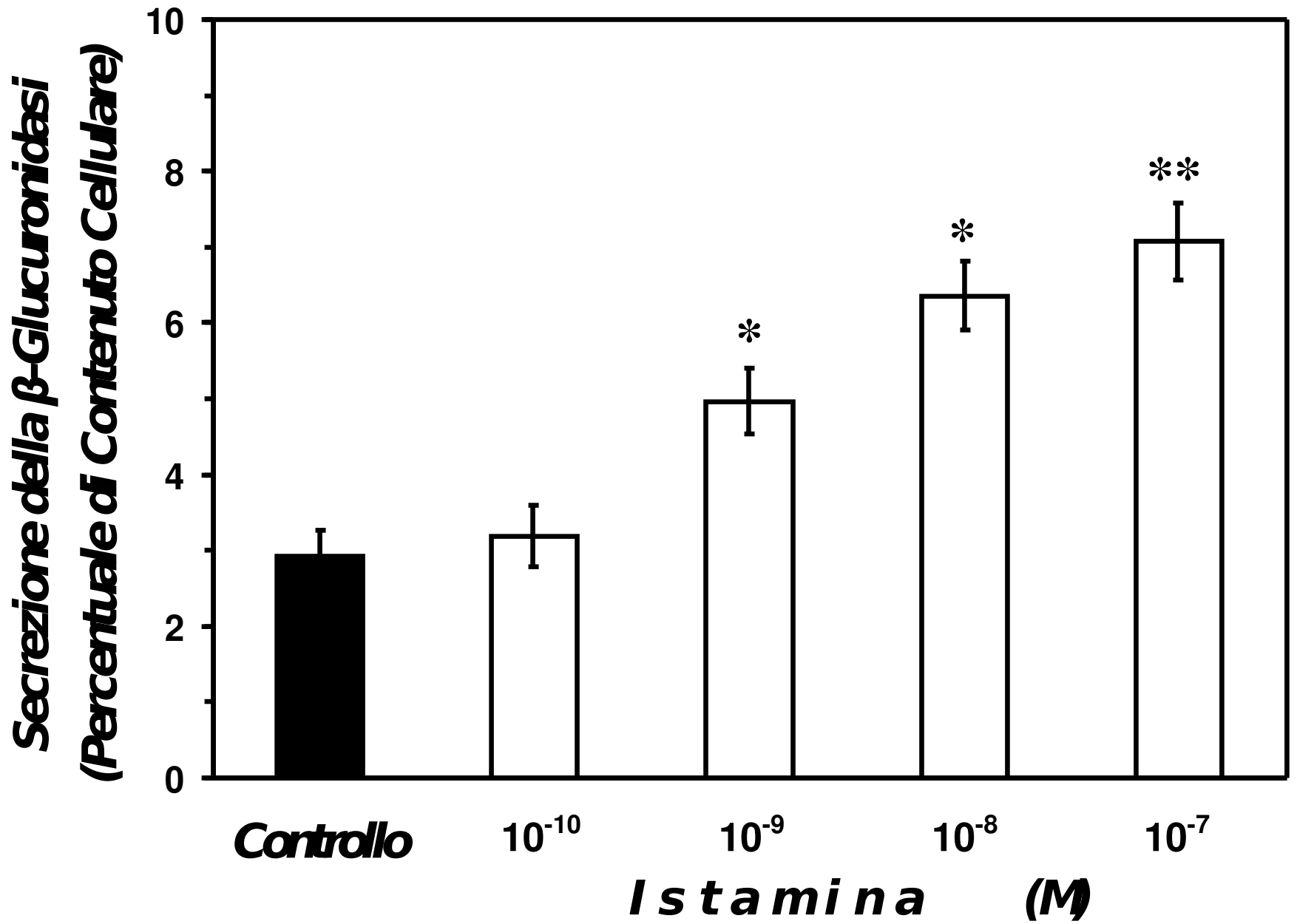


Fig. 1

**Secrezione della β -Glucuronidasi
(Percentuale del Contenuto
Cellulare)**

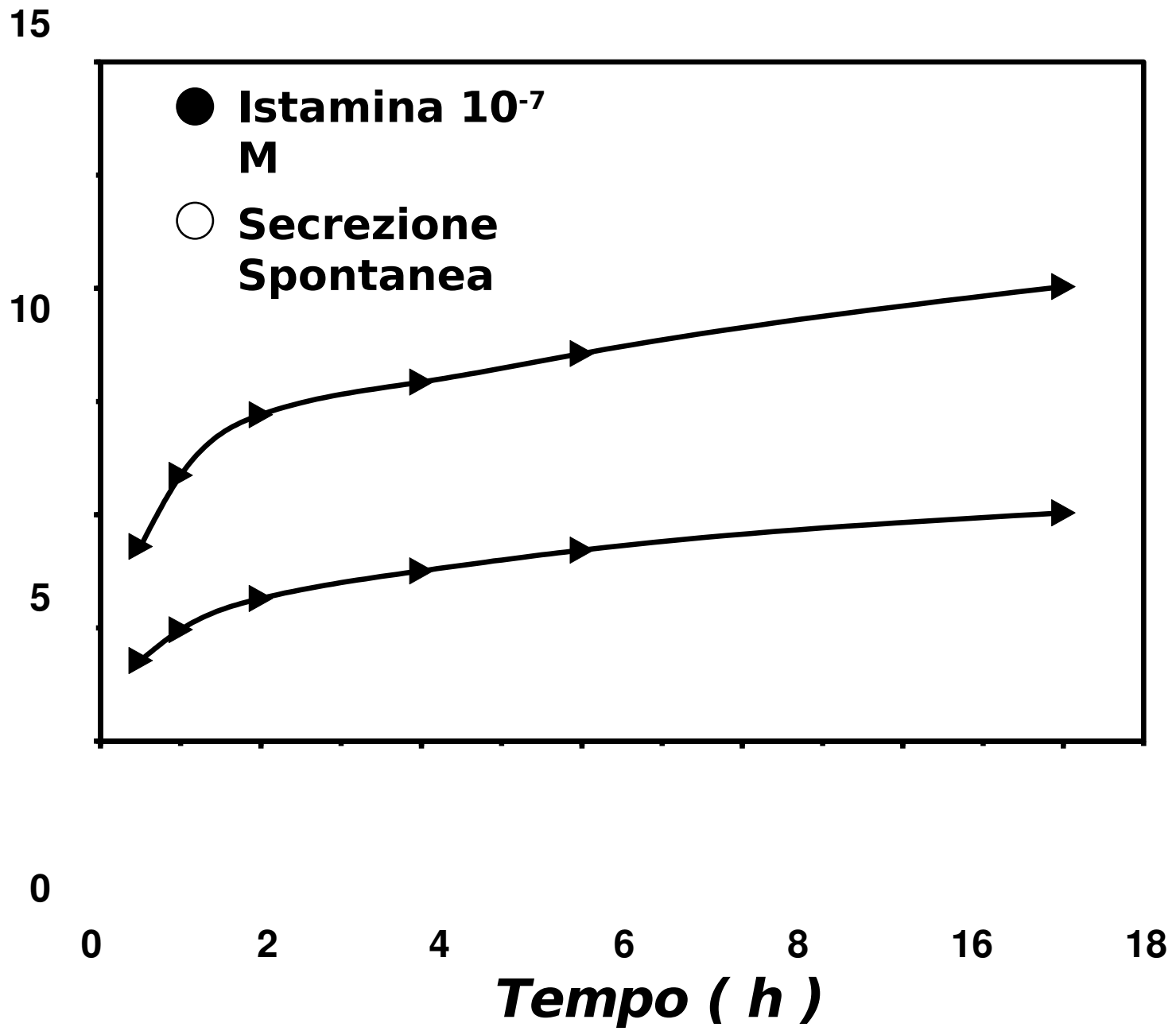


Fig. 2

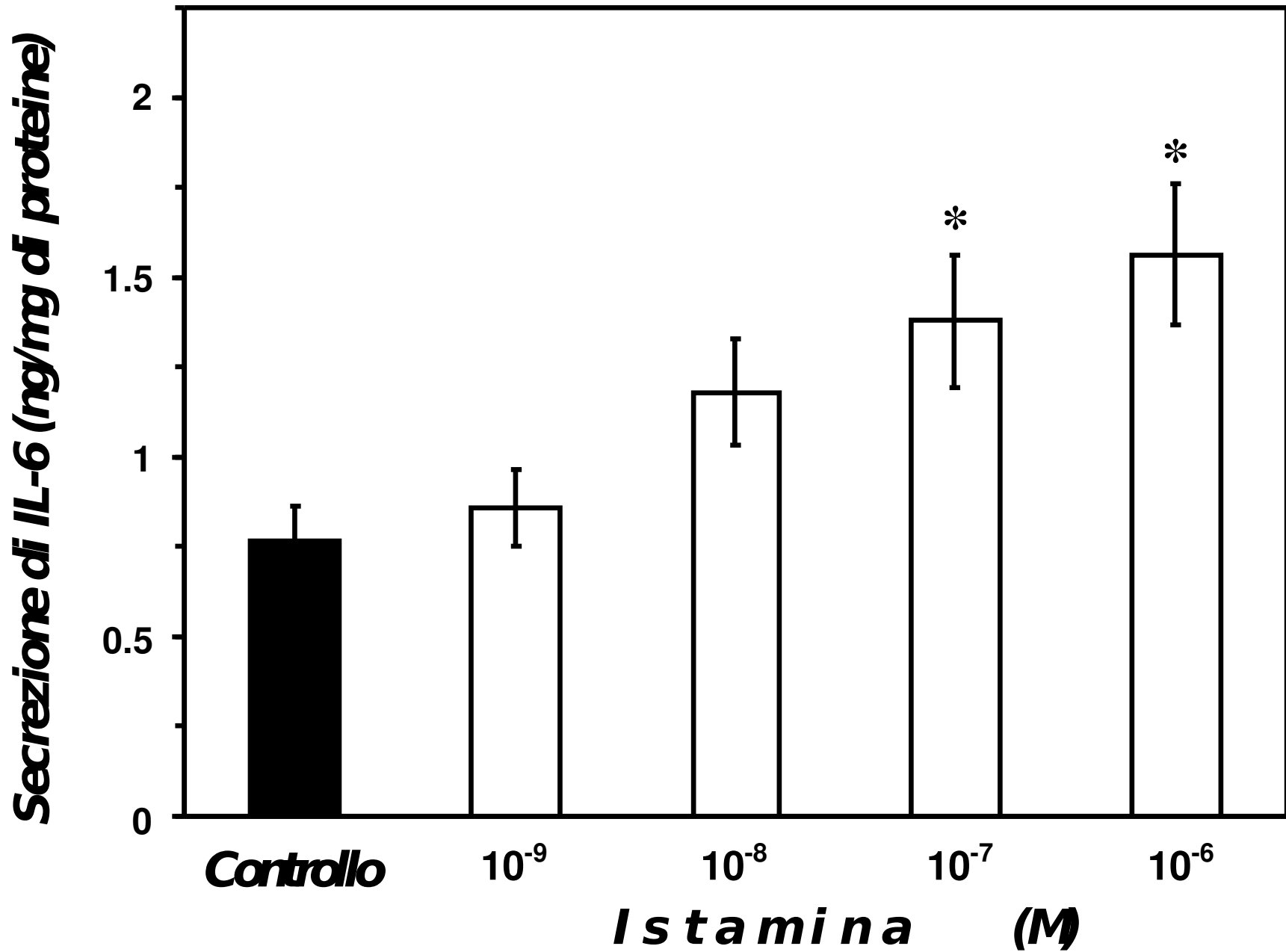


Fig. 3

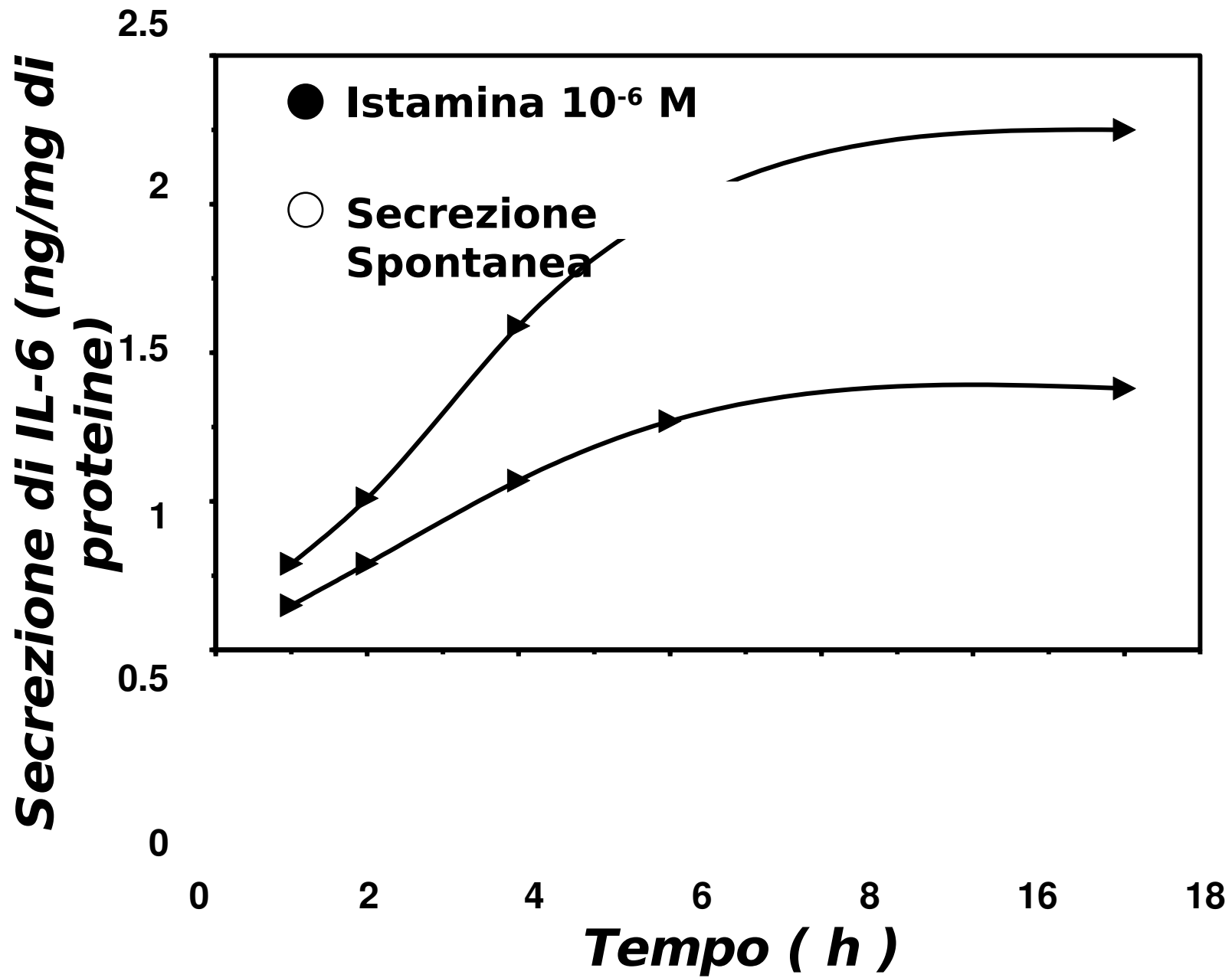


Fig. 4

Secrezione di IL-6 (ng/mg di proteine)

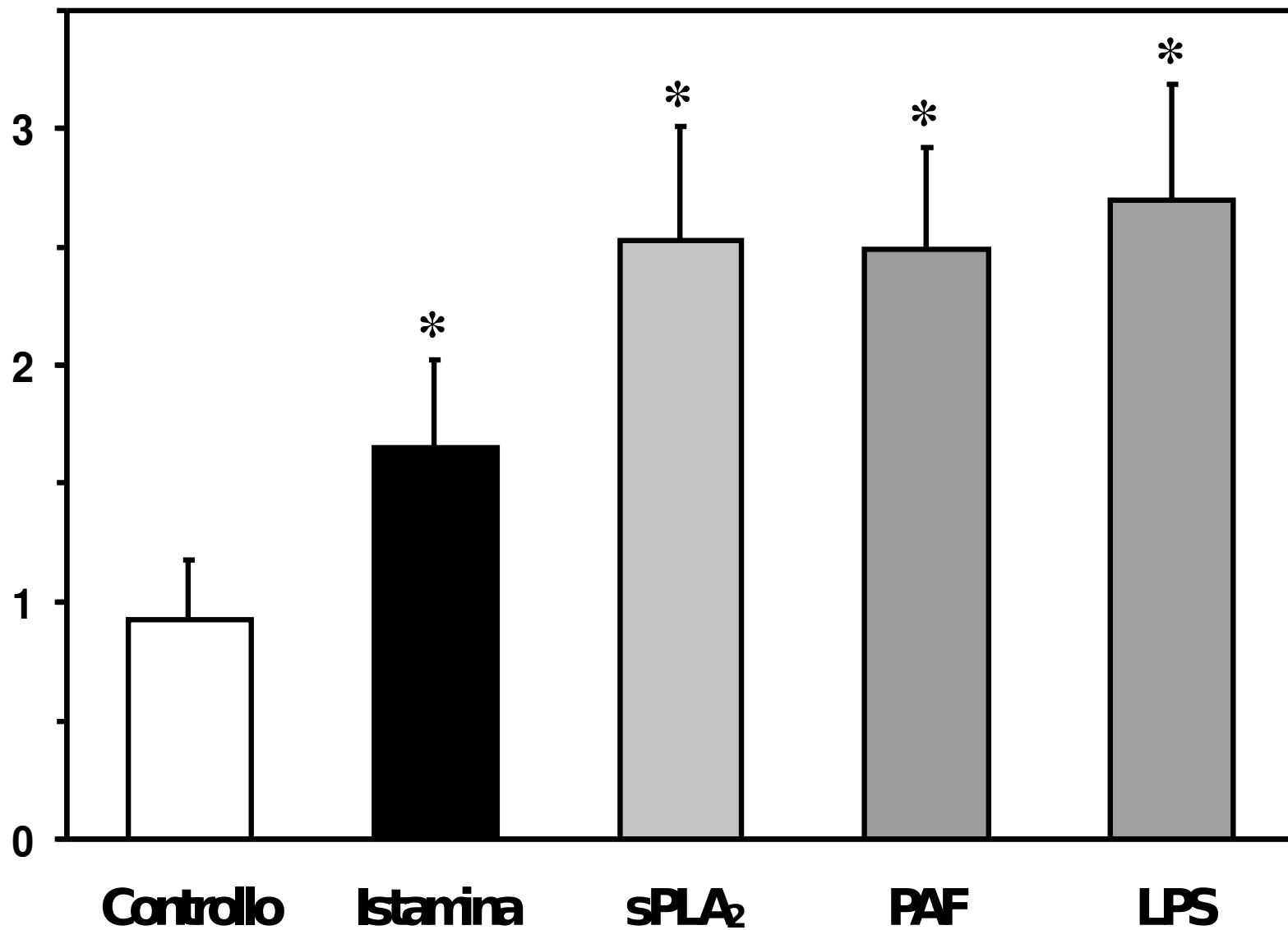


Fig. 5

**Secrezione di β -
Glucuronidasi
(Percentuale del Contenuto
Cellulare)**

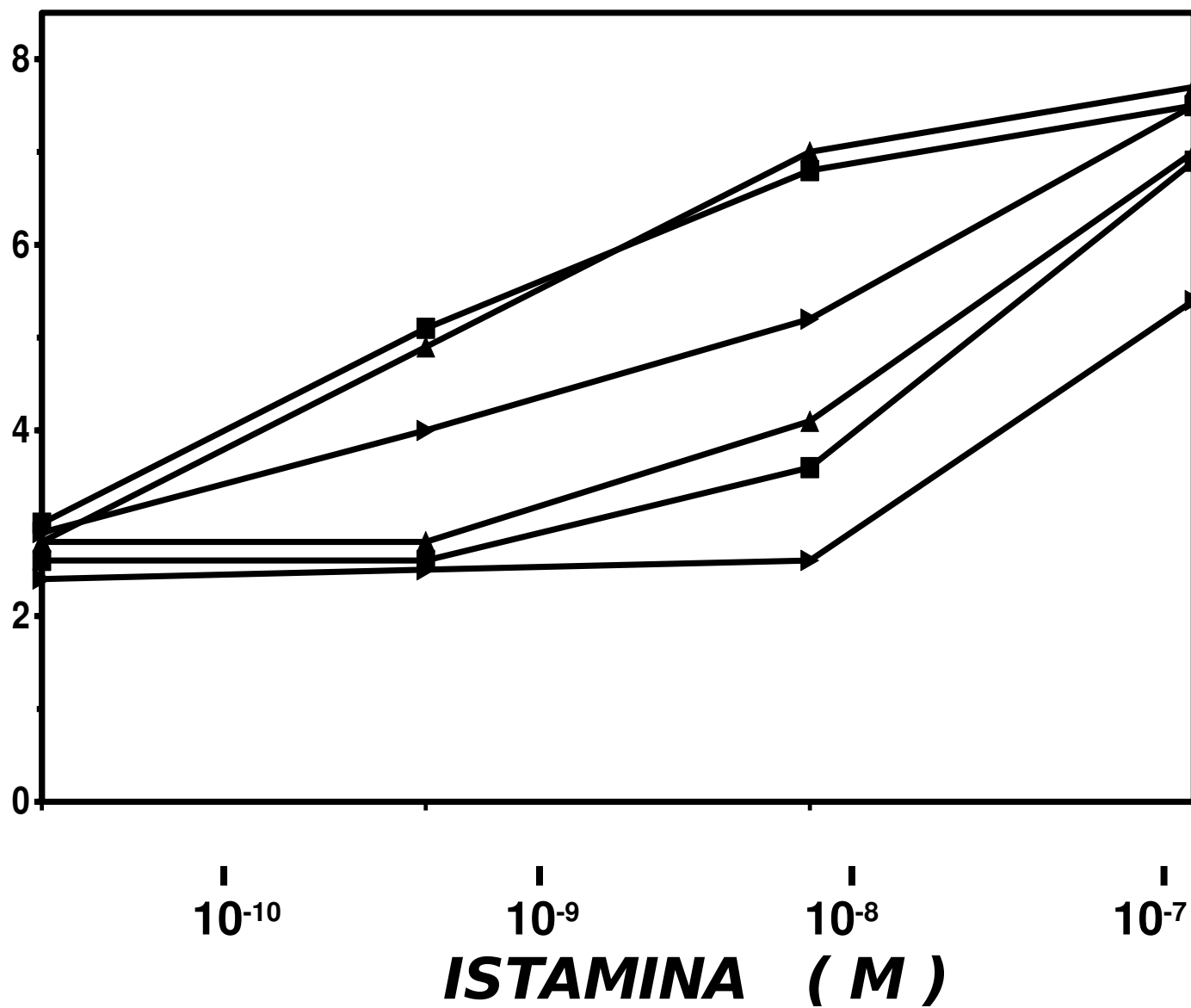


Fig. 6A

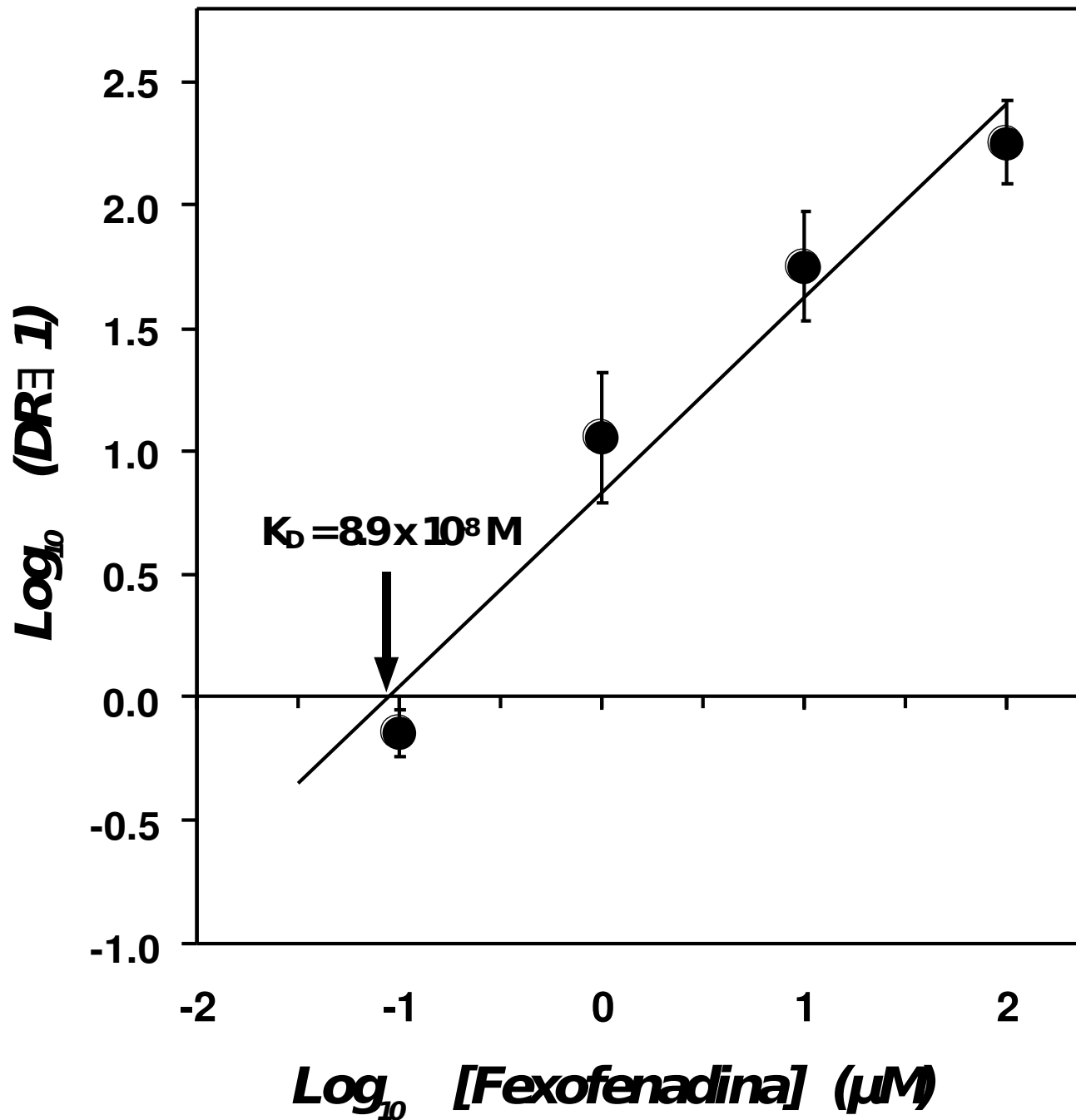


Fig. 6B

Secrezione di IL-6 (ng/mg di proteine)

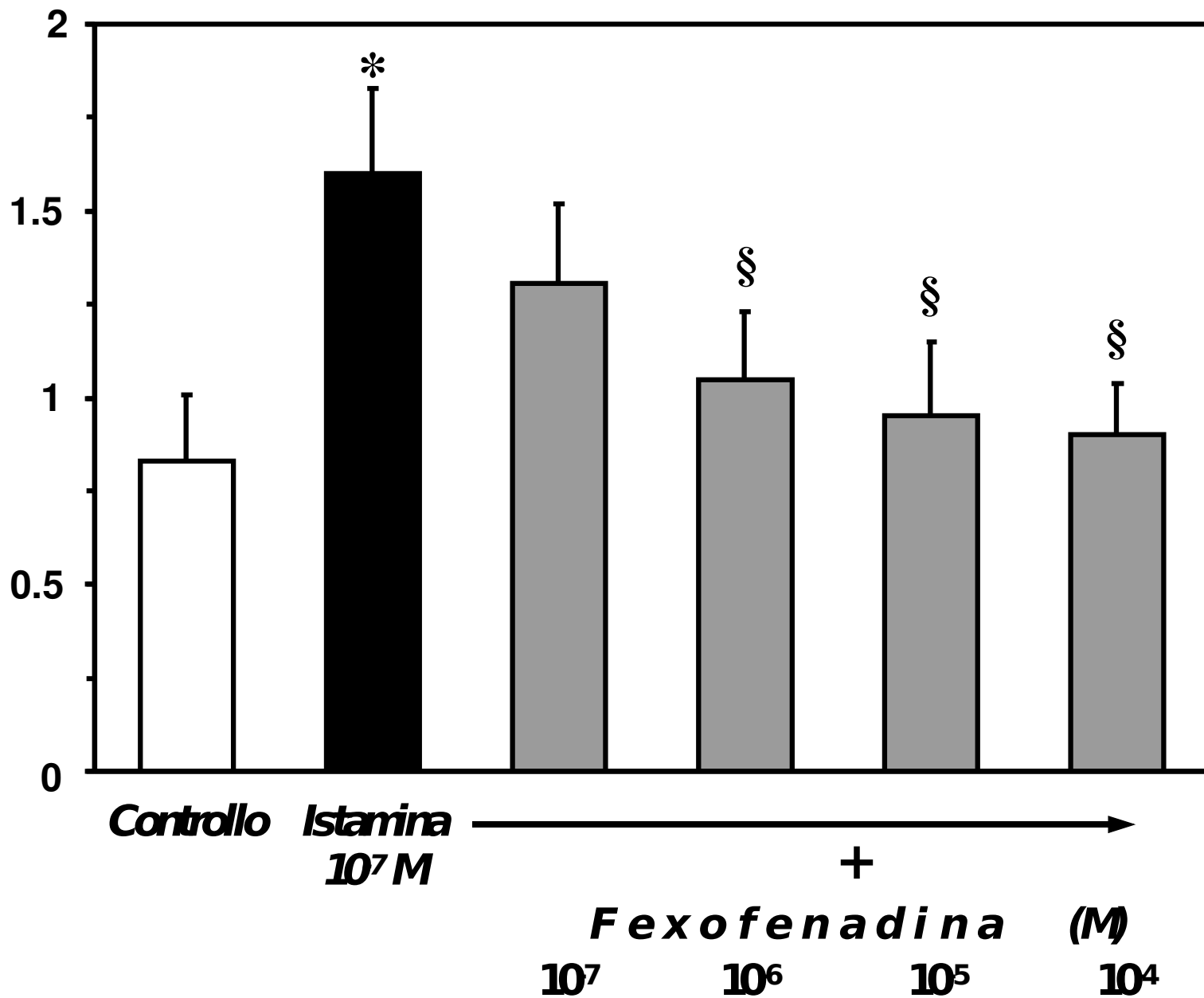


Fig. 7

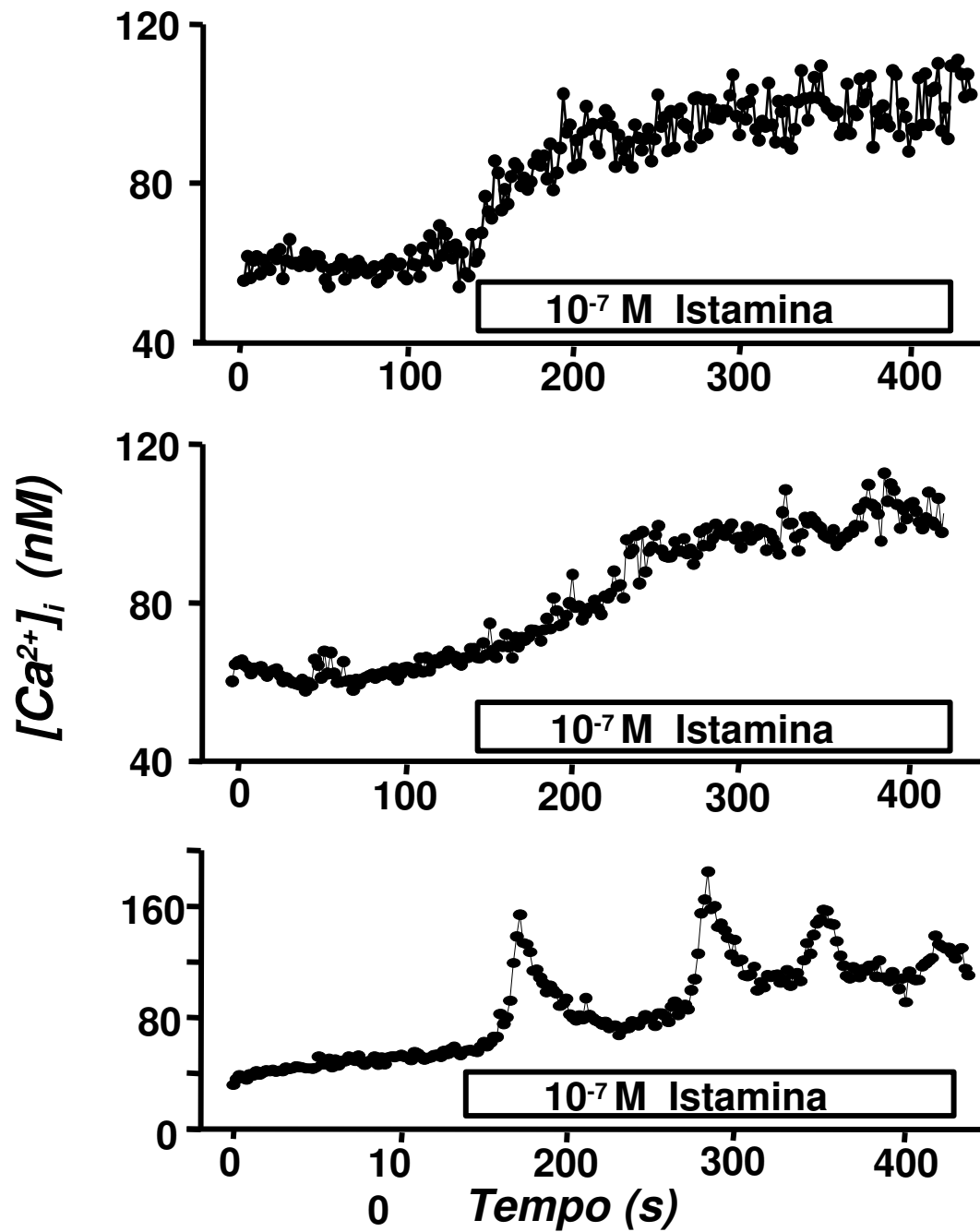


Fig. 8A

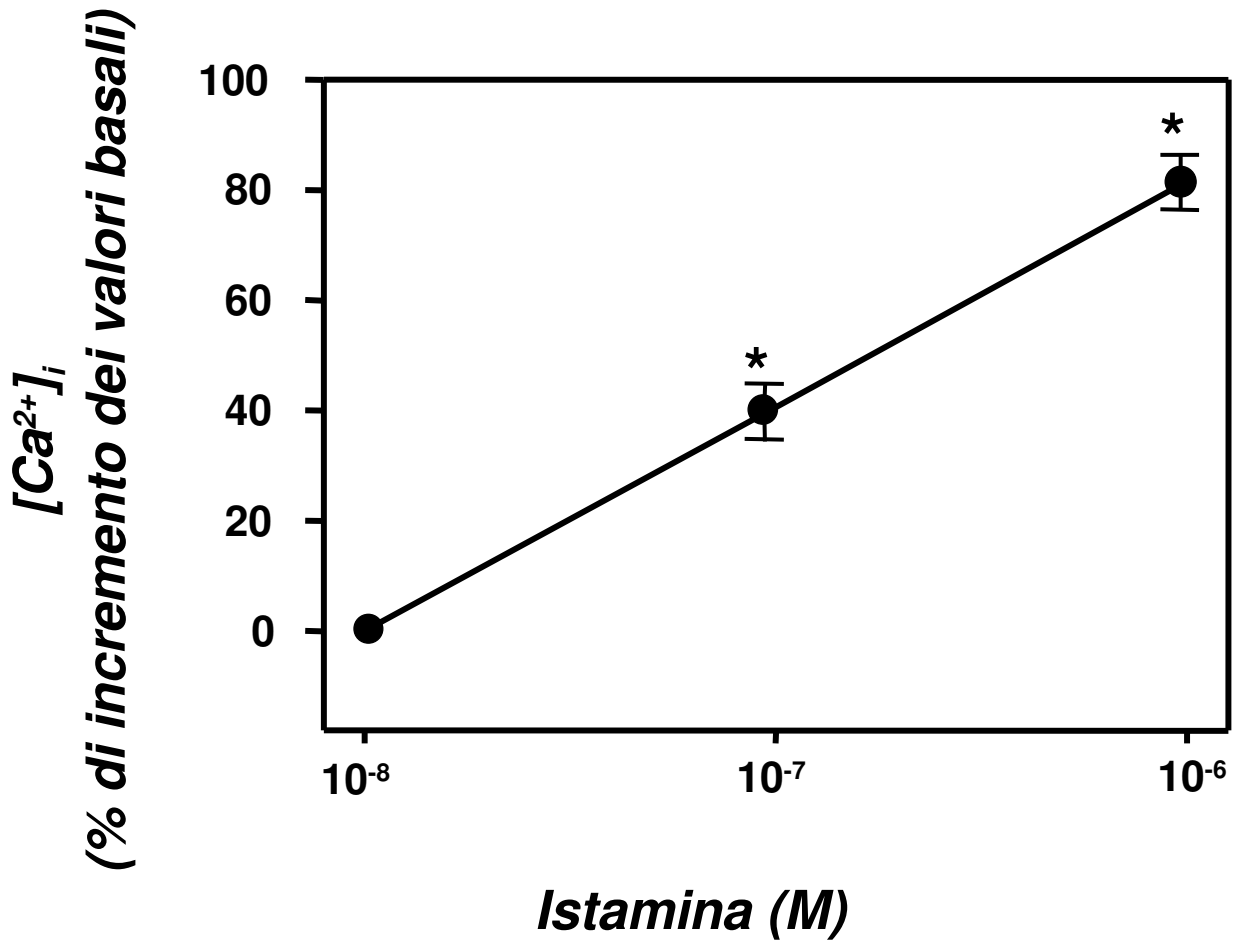


Fig. 8B

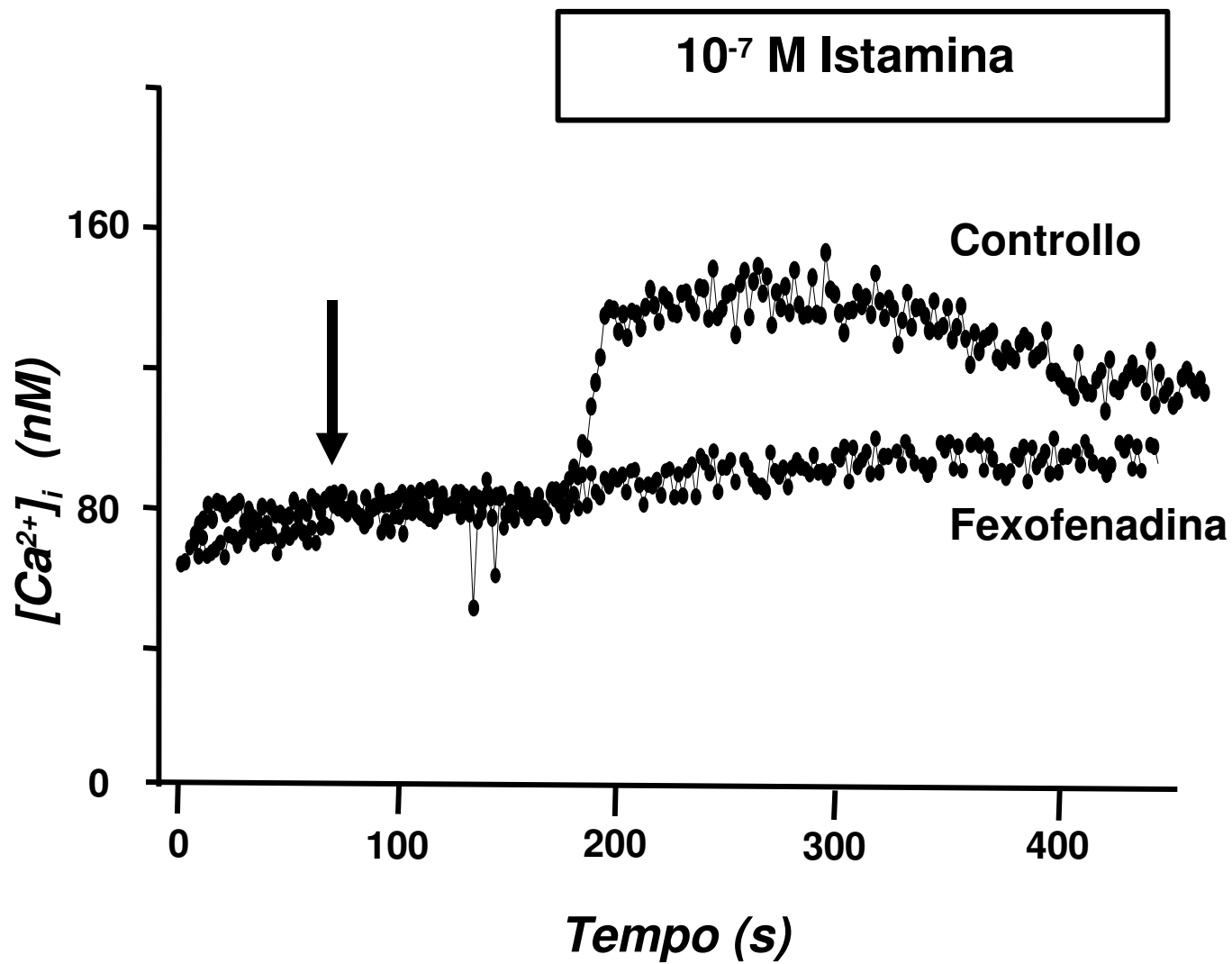


Fig. 9A

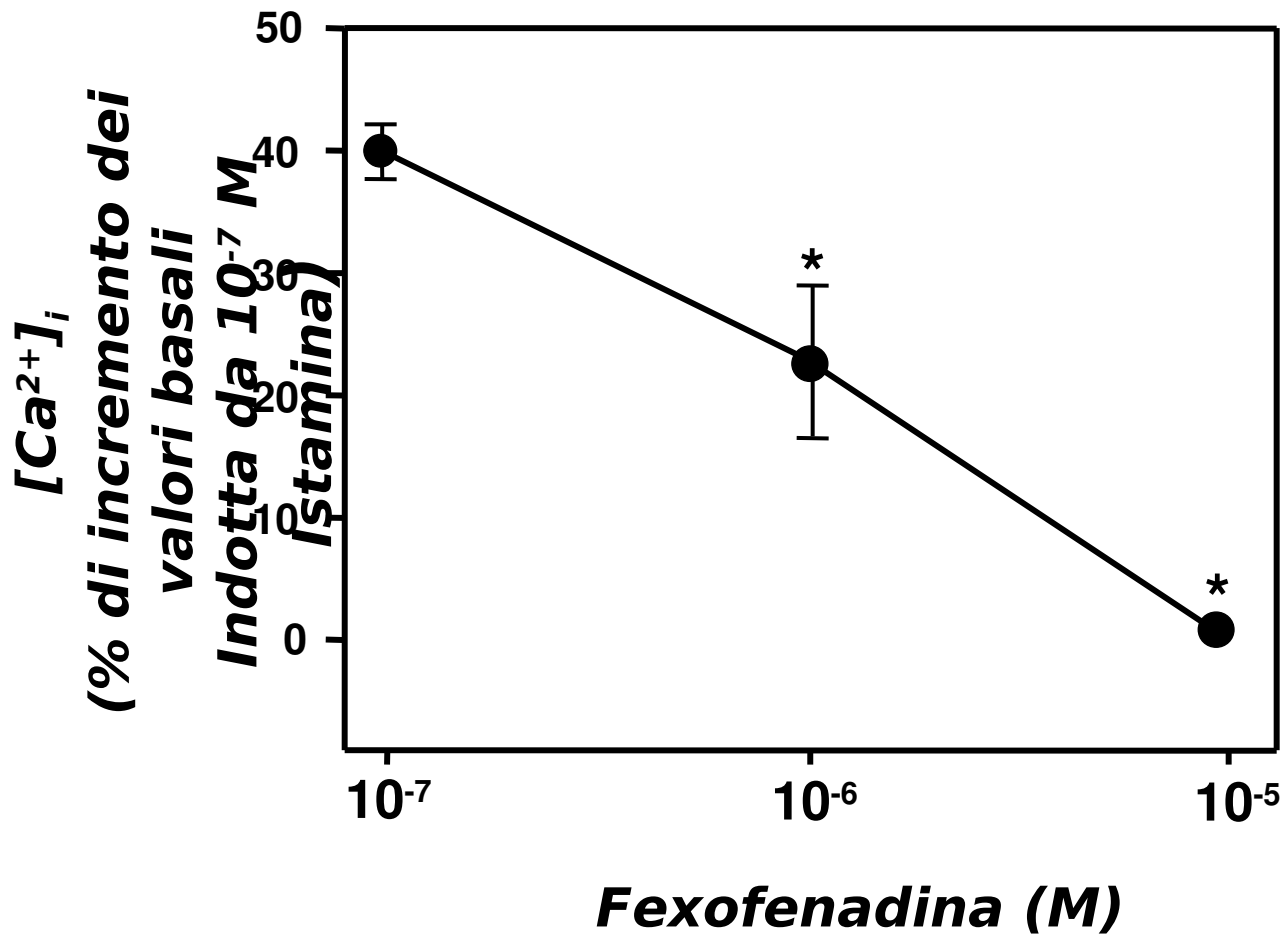


Fig. 9B

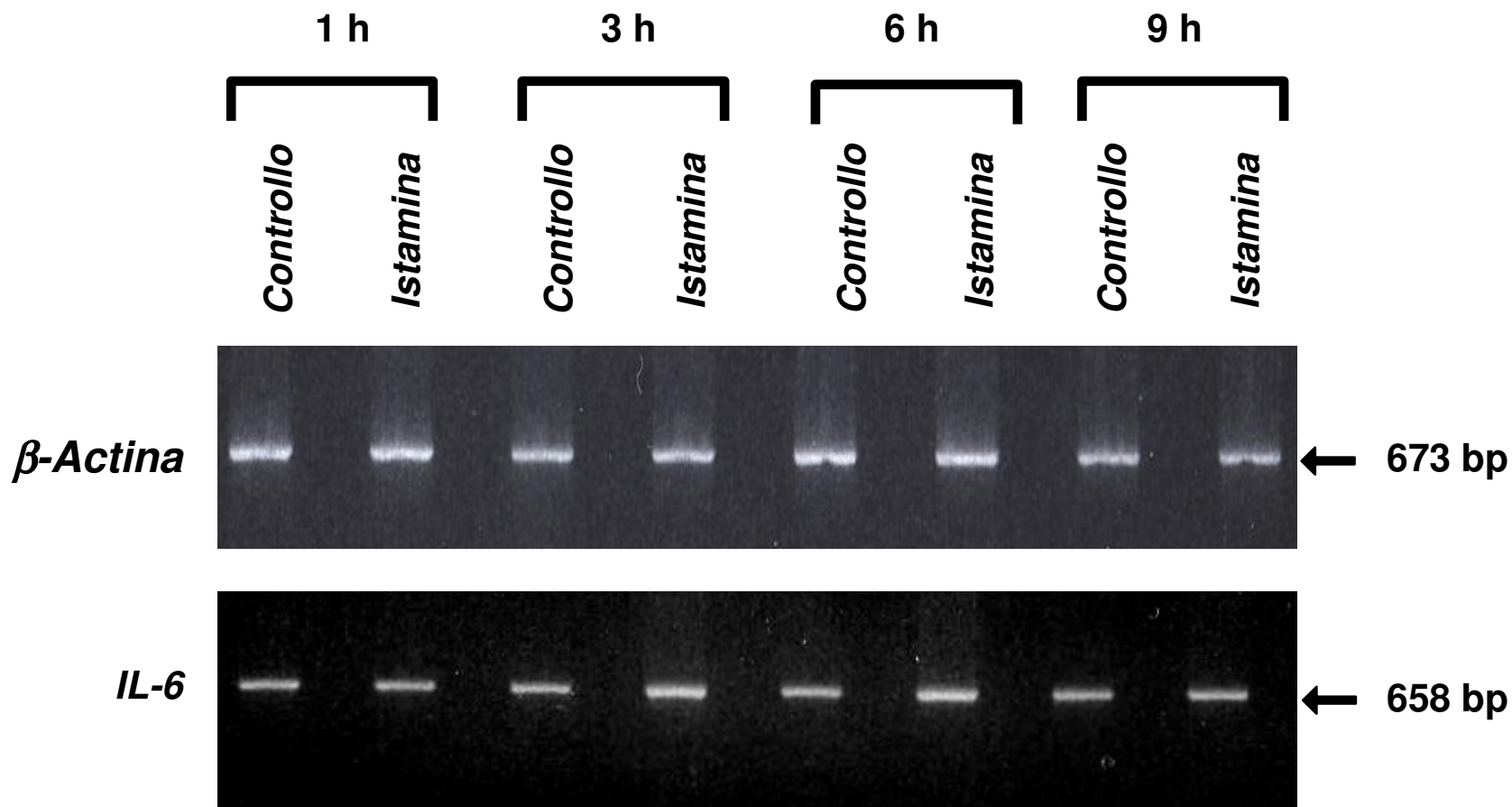


Fig. 10A

**Rapporto dell'intensità di segnale
(Istamina / Controllo)**

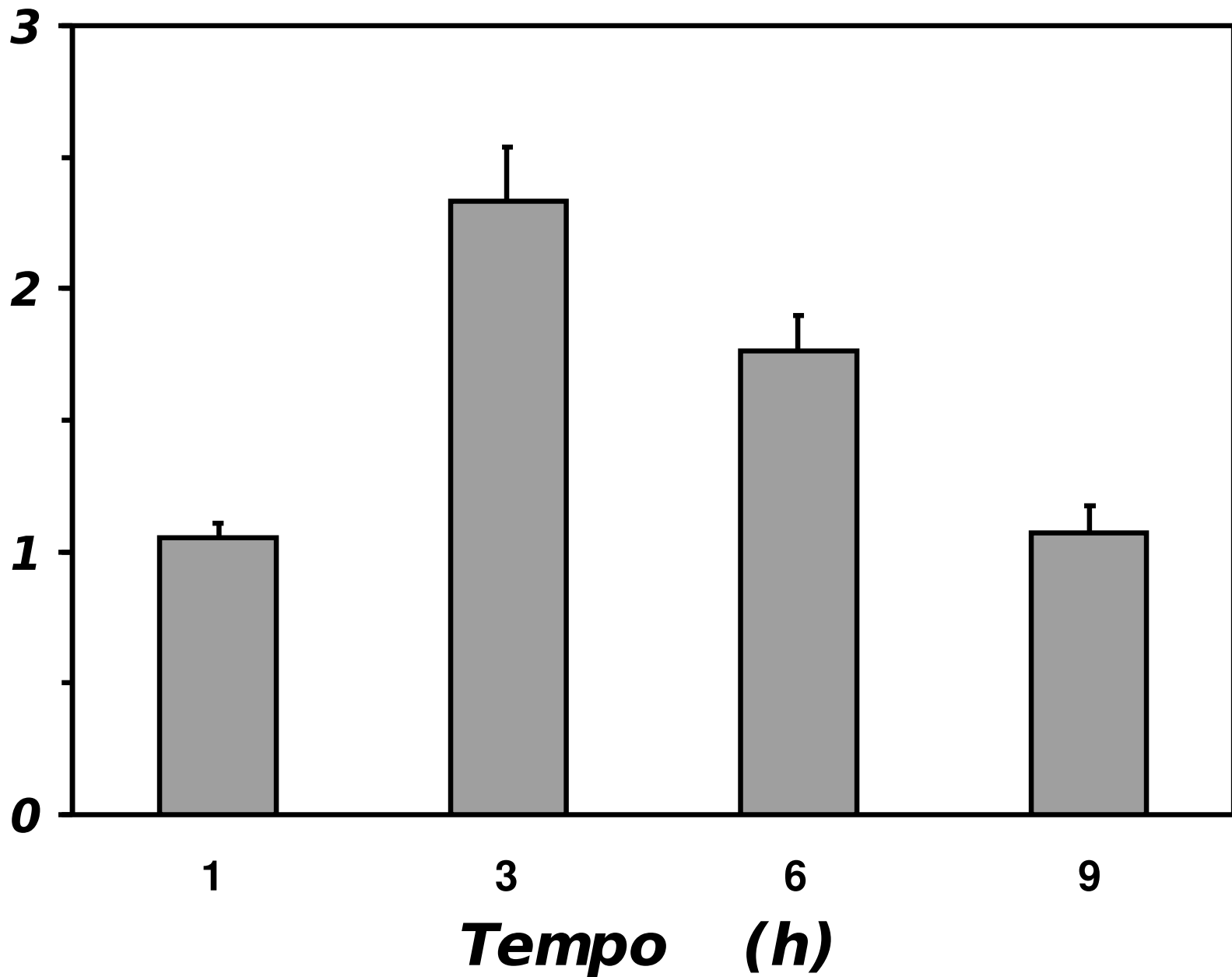


Fig. 10B

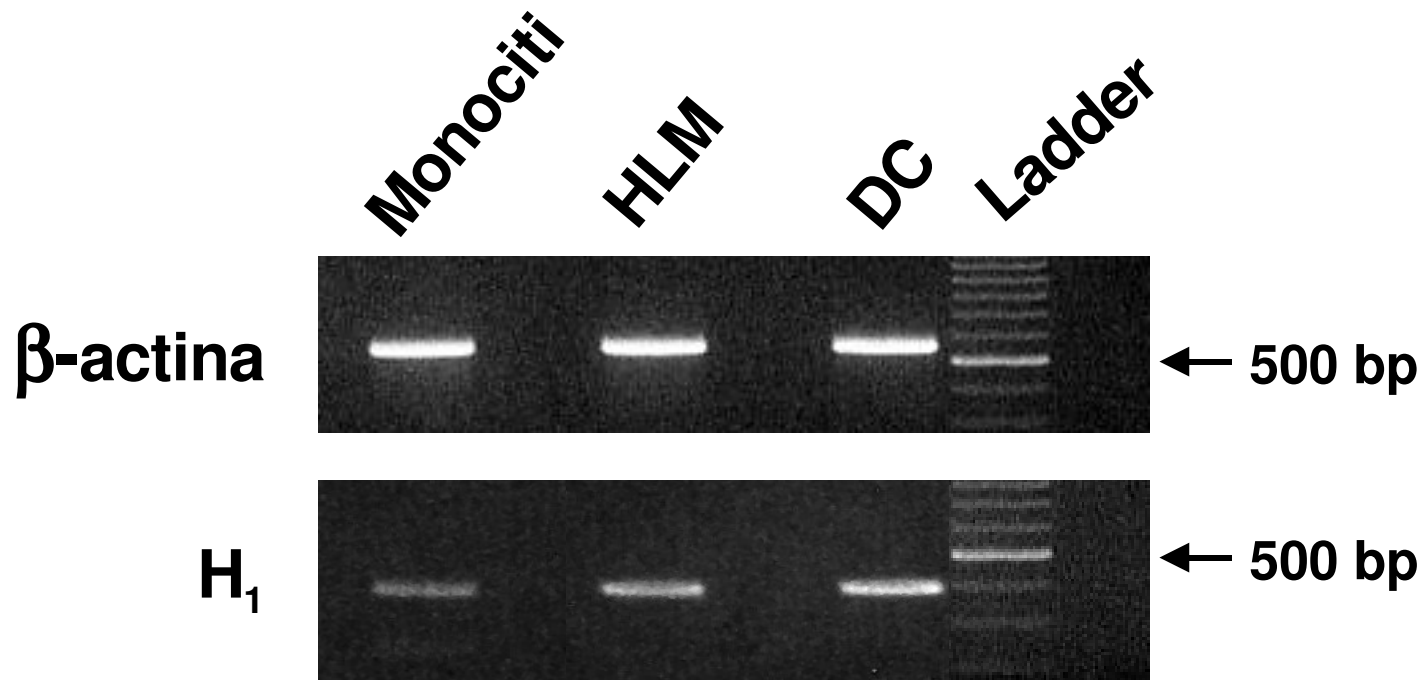


Fig. 11

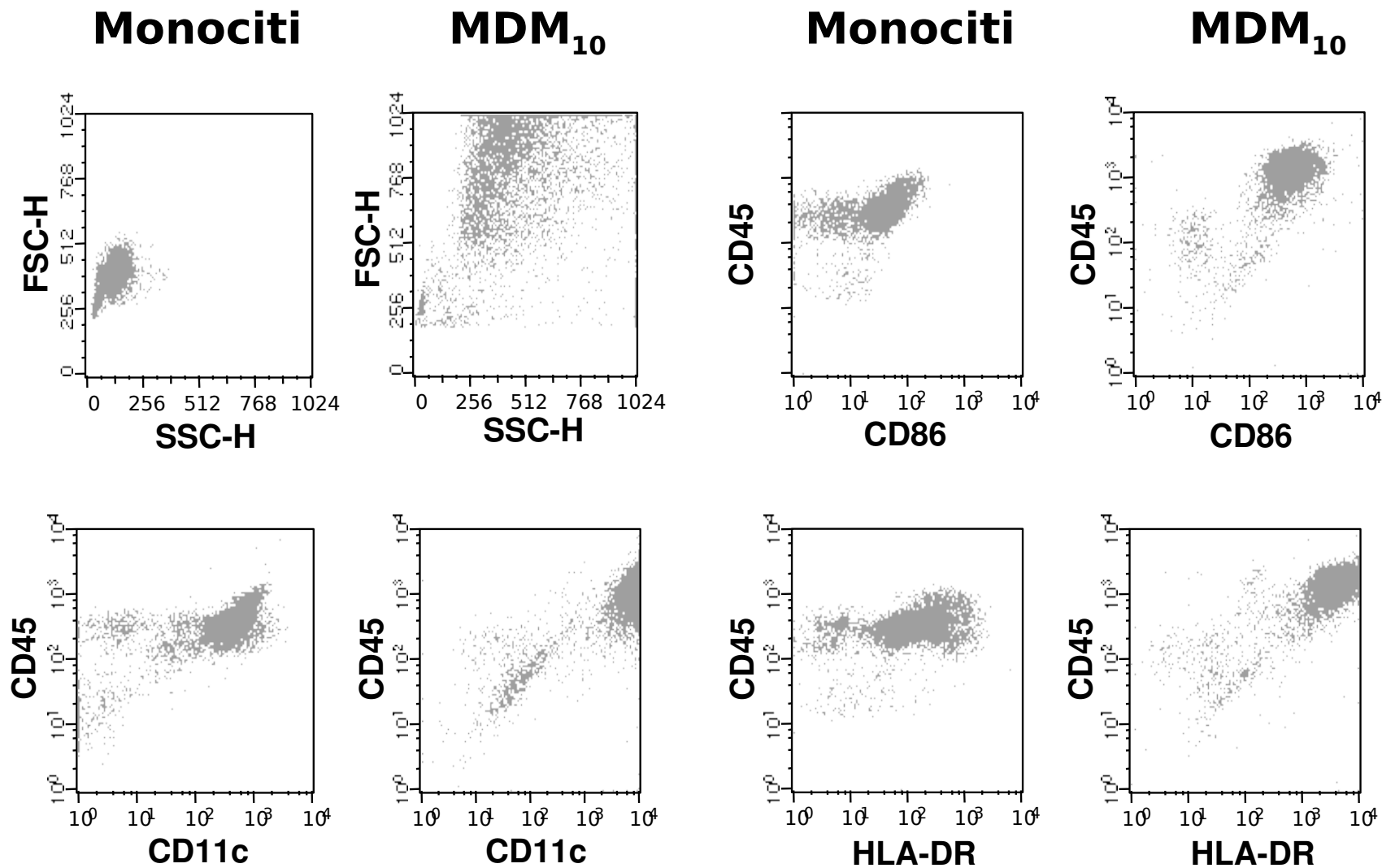


Fig. 12

**Receptore H_1 mRNA
Fold Increase vs.
control**

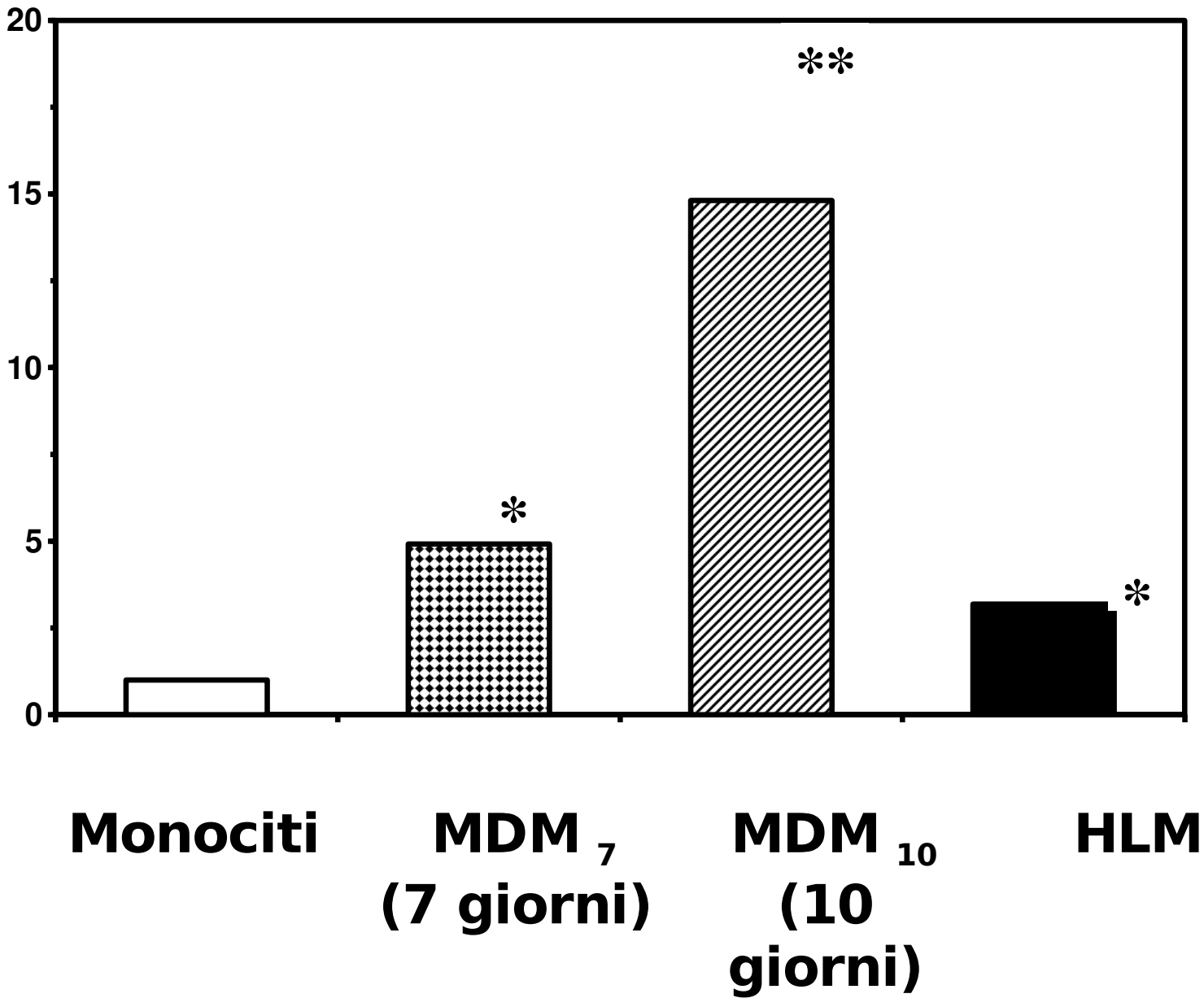


Fig. 14

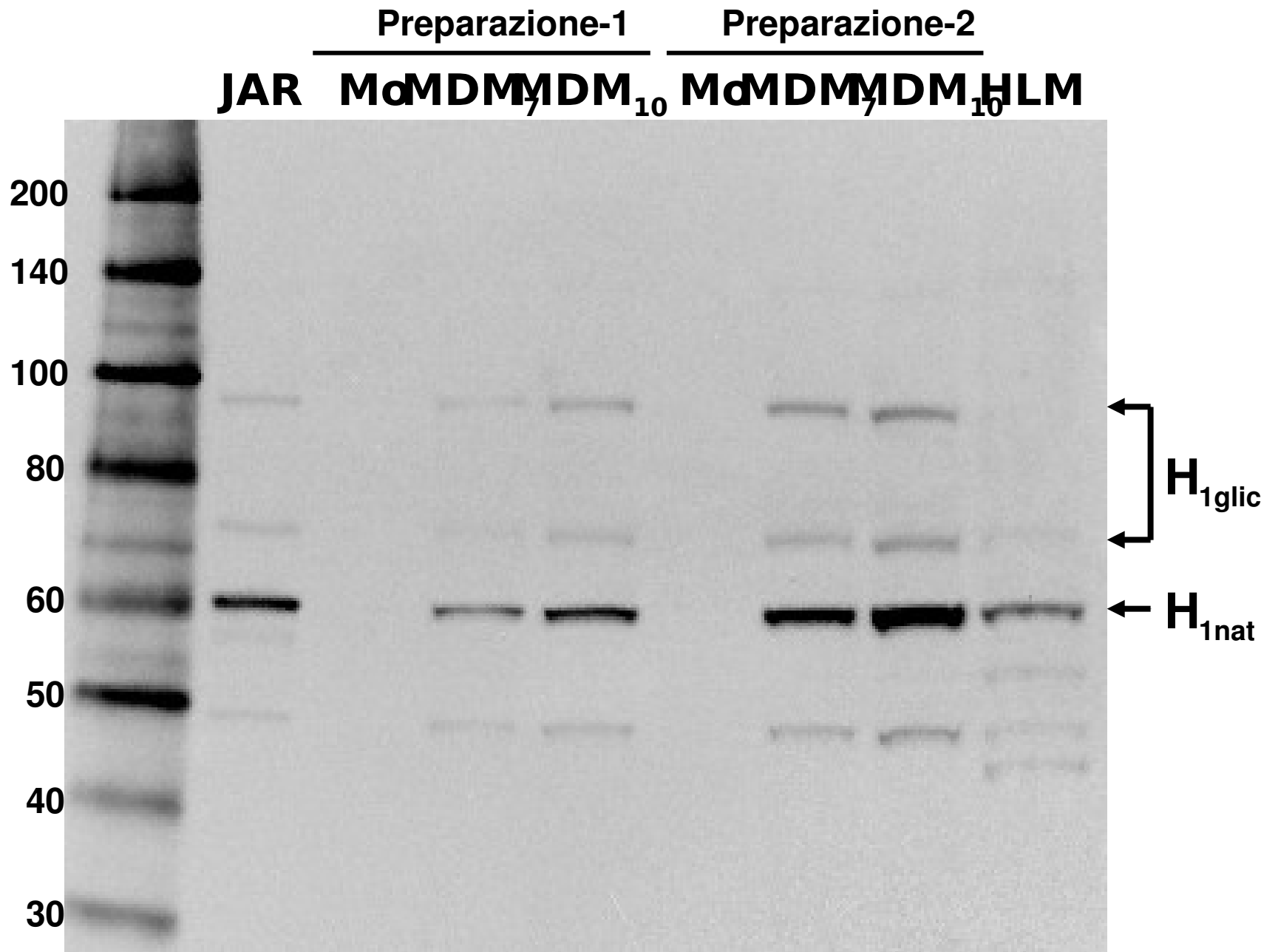


Fig. 15

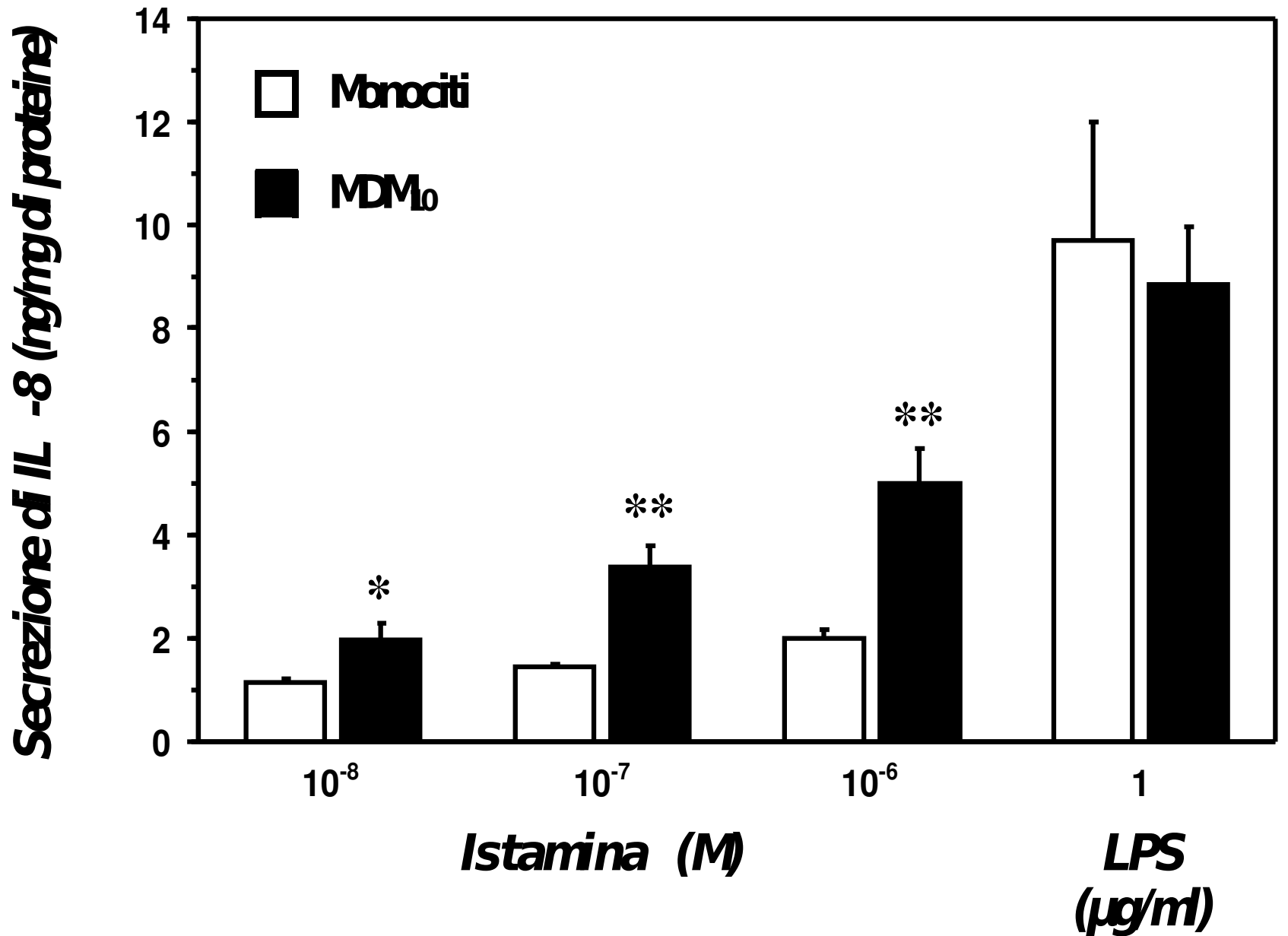


Fig. 16

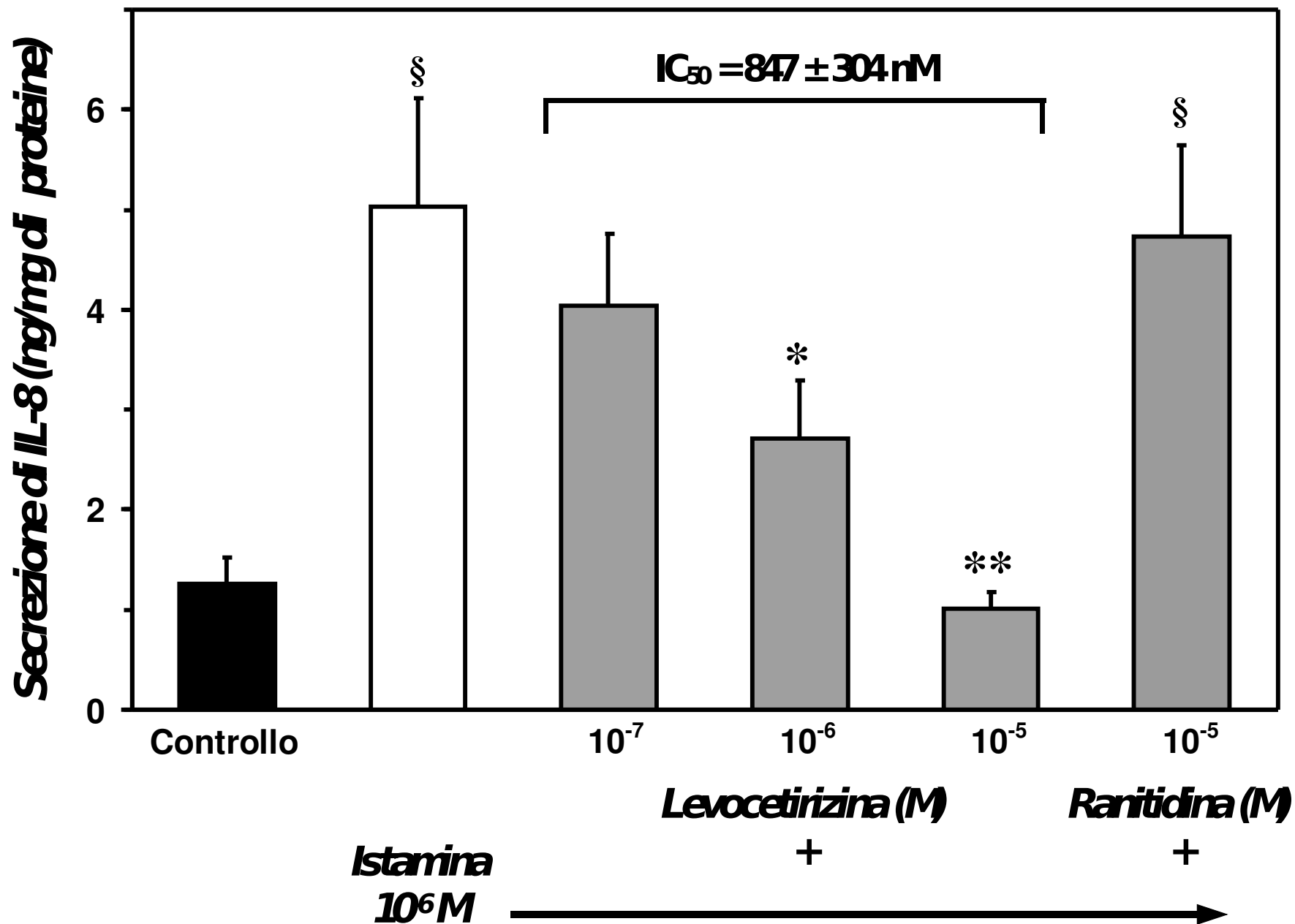


Fig. 17

Monociti del Sangue Periferico

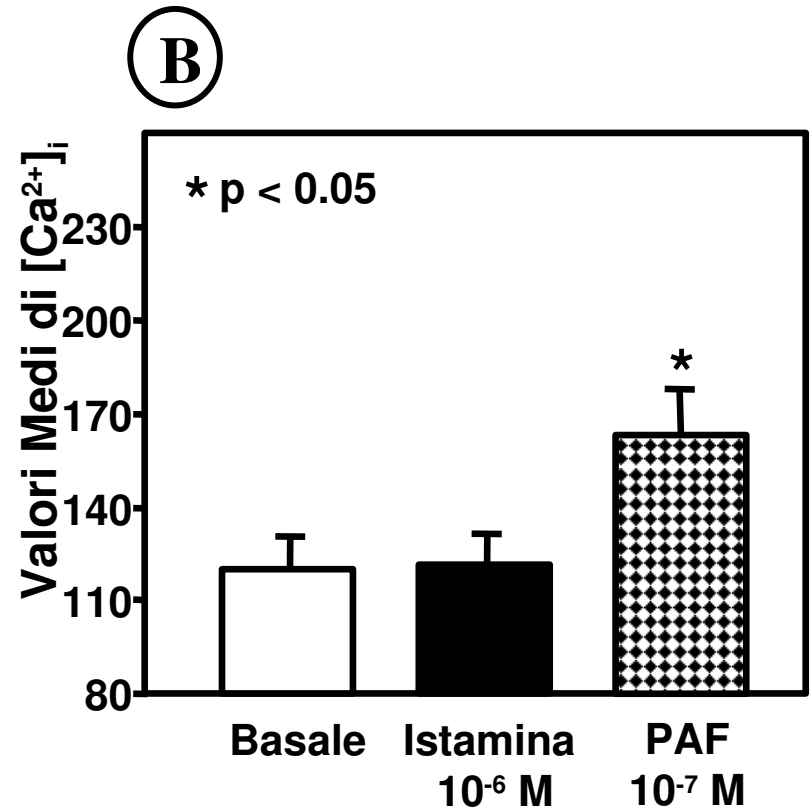
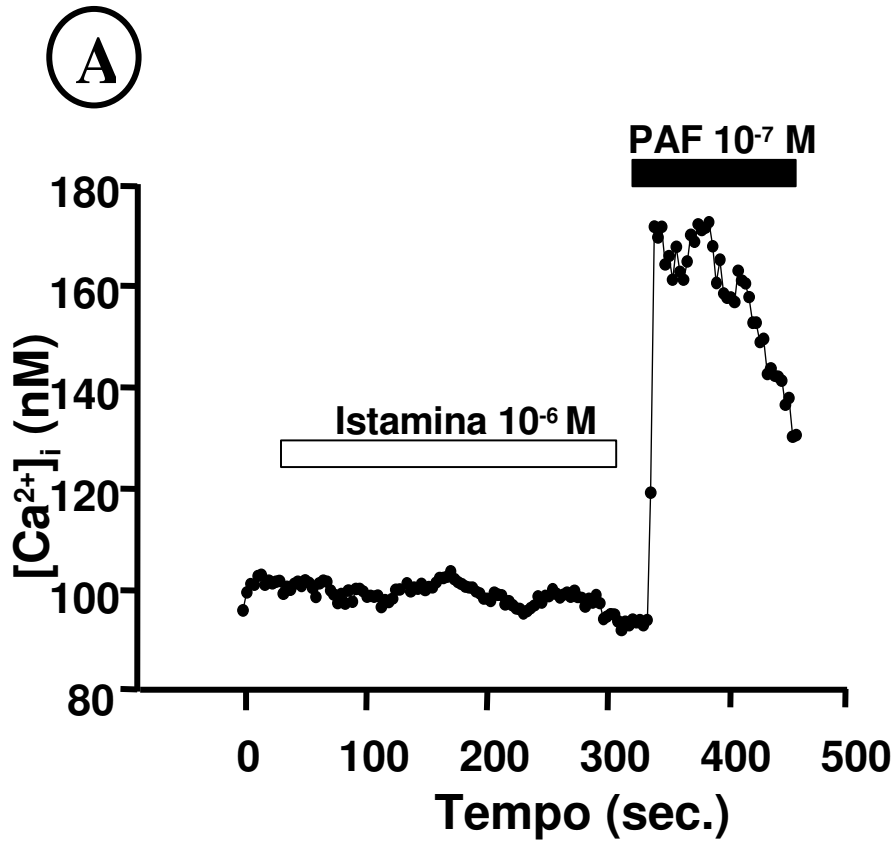


Fig. 18

Macrofagi Derivati da Monociti

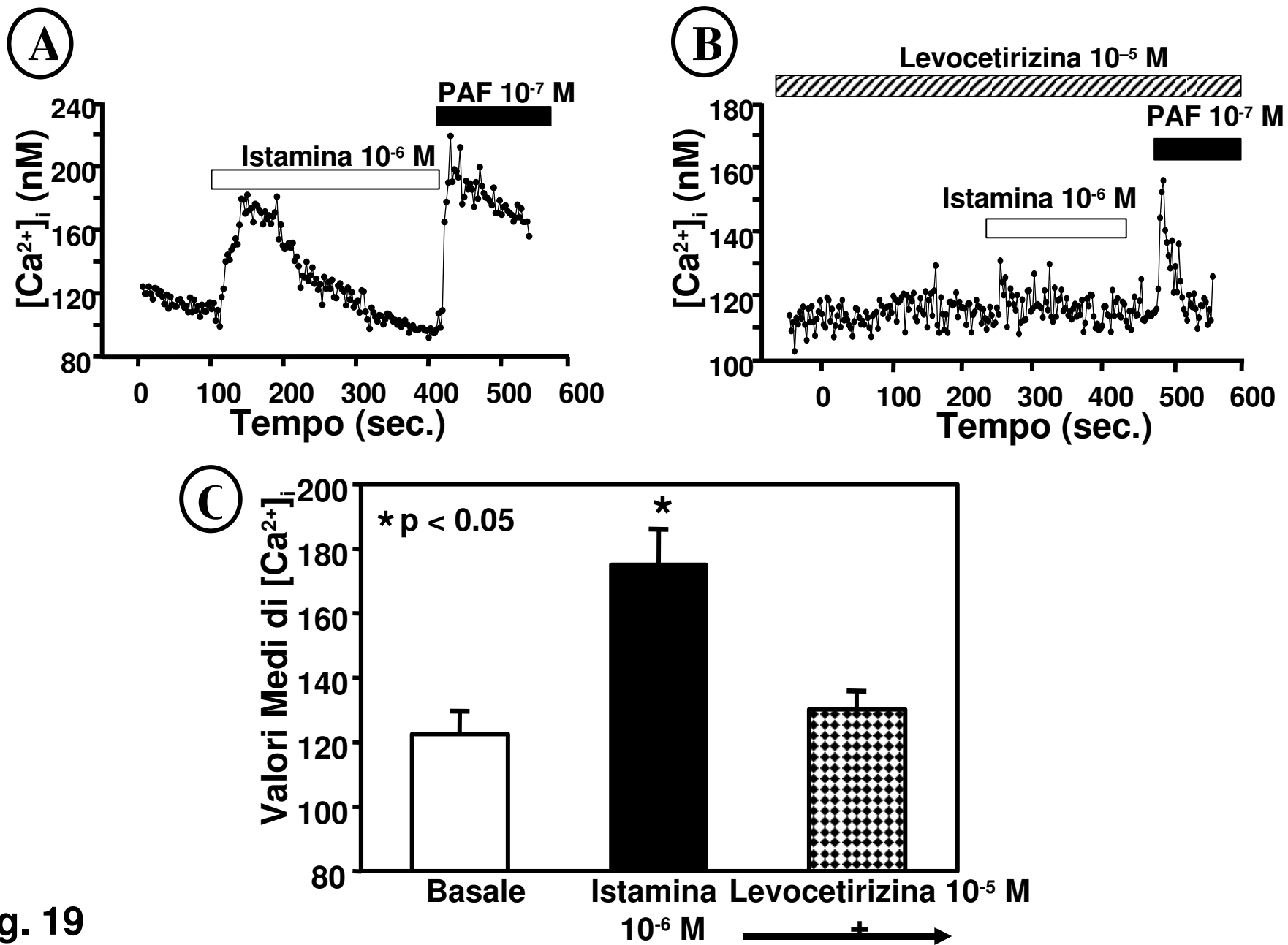


Fig. 19