

Valutazione quantitativa degli immunociti e della interleuchina-17 nella saliva di fumatori con BPCO di basso e medio grado

Quantitative assessment of immunocytes and interleukin-17 in the saliva of smokers with mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease

Ekaterina I. Altynbaeva, Svetlana N. Teplova

Riassunto

Introduzione. Il nostro obiettivo è stato l'identificazione di problemi dell'omeostasi immunitaria nella saliva di lavoratori di un impianto radiochimico, con BPCO in fase precoce e in fumatori senza BPCO.

Materiali e metodi. È stata utilizzata la citofluorimetria a flusso per analizzare le popolazioni delle cellule immunitarie, e un immunoassay quantitativo degli enzimi per la misurazione dell'interleuchina-17 (IL-17) nella saliva. Lo studio ha incluso 23 persone con BPCO e 10 fumatori senza BPCO. I due gruppi erano equiparabili per età, sesso, condizioni lavorative e anamnesi di fumo. Le persone non avevano esacerbazioni durante il periodo dello studio.

Risultati. Non c'è stata nessuna differenza significativa tra il gruppo di BPCO e il gruppo di controllo per ciò che riguarda il numero totale di leucociti e delle cellule esprimenti marcatori dei granulociti (CD13+) nella saliva. Il livello di CD13+ era 0,36% nel gruppo di BPCO e 0% in quello di controllo. Nel gruppo di BPCO, è stato osservato un aumento significativo del numero di CD3+CD8- (25,85% contro 1,4% del gruppo di controllo, $p=0,049$) e di CD3+CD4+ (3,3% contro 0,6%, $p=0,049$), indicando un incremento del numero totale dei linfociti T e T-helper nella regione mucosaliare che è costantemente esposta al fumo di tabacco. Un aumento rilevante di IL-17 è stato osservato nel gruppo di BPCO rispetto a quello di controllo (0,6 contro 0,2 pg/ml, $p=0,04$).

Conclusioni. Un aumento significativo del livello di IL-17 è stato osservato in pazienti con BPCO rispetto ai fumatori senza BPCO, indicando l'attivazione della funzionalità secretoria in una sottopopolazione di linfociti CD3+CD4, Th17. I risultati ottenuti ci hanno permesso di presumere il coinvolgimento dei linfociti CD3+CD4+ nella patogenesi delle alterazioni dell'infiammazione nella BPCO.

Parole chiave: BPCO, immunociti, saliva, citometria a flusso, Interleuchina 17, T-helper..

Summary

Introduction. We aimed at identifying disorders of the immune homeostasis in the saliva of workers at a radiochemical facility with early COPD and in smokers without COPD.

Materials and methods. The flow cytometry was used to analyze immune cell populations, and a quantitative enzyme immunoassay to measure interleukin-17 (IL-17) in the saliva.

The study included 23 individuals with COPD and 10 smokers without COPD. The two groups were matched for age, gender, working conditions and smoking history. Subjects were exacerbation-free at the time of the study.

Results. There were no significant differences between the COPD group and the control group in terms of total amount of leukocytes and cells expressing markers of granulocytes (CD13+) in the saliva. The level of CD13+ was 0.36% in the COPD group and 0% in the control group.

A significant increase in the amounts of CD3+CD8- (25.85% versus 1.4% in the control group, $p=0.049$) and CD3+CD4+ (3.3% versus 0.6%, $p=0.049$) was observed in the COPD group, suggesting an increase in the total amounts of T-lymphocytes and T-helpers in the mucosal region constantly exposed to tobacco smoke. A significant increase of IL-17 was observed in the COPD group compared with the control group (0.6 vs. 0.2 pg/ml, $p=0.04$).

Conclusions. A significantly increased level of IL-17 was observed in COPD patients compared with smokers without COPD, suggesting activation of the secretory function in a subpopulation of CD3+CD4+ lymphocytes, Th17.

The obtained findings allowed assuming involvement of CD3+CD4+ lymphocytes in pathogenesis of inflammatory alterations at COPD.

Keywords: COPD, immunocytes, saliva, flow cytometry, Interleukin 17, T-helpers.

Altynbaeva I. Ekaterina (katealt@mail.ru)
Federal Medical Biological Agency, Central Medical Sanitary Department No. 71,
Polyclinic No. 3, Ozersk, Chelyabinsk Region, Russia.

Teplova N. Svetlana
Chelyabinsk State Medical Academy, Department of Clinical Immunology and
Allergology, Chelyabinsk, Russia;

Introduzione

Le membrane mucose che coprono il tratto respiratorio superiore sono il punto di entrata e colonizzazione per vari agenti microbiologici [1]. Le membrane mucose hanno un ruolo fondamentale nella risposta antimicrobica, che dipende sulla natura dell'antigene e sul potenziale effetto di agenti di aggressività biologica [2]. La dipendenza dal tabacco danneggia significativamente la difesa antibatterica delle membrane mucose, risultando in una violazione della barriera fisica ed in una diminuita migrazione e funzione secretiva da parte delle cellule fagocitarie. Questo può facilitare la persistenza di agenti estranei e l'accumulo di fattori proinfiammatori endogeni di natura immunitaria [3,4].

Le tecniche di laboratorio attuali permettono un'analisi precisa delle proteine immunitarie prodotte a livello del tessuto linfoide associato alla mucosa (MALT) nel tratto respiratorio e nella saliva, sia in condizioni normali sia in presenza di patologia. La citofluorimetria a flusso può essere utilizzata per analizzare la composizione cellulare dei prodotti della secrezione [5]. L'analisi dei fattori immunitari è un metodo non invasivo per la valutazione dell'effetto del fumo di tabacco sulle membrane mucose e sul sistema immunitario delle mucose della cavità orale, probabilmente riflettendo gli effetti sul sistema bronco-polmonare.

L'IL-17 è prodotta da cellule Th17. Molecole effettrici prodotte da queste cellule comprendono IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26. L'IL-17 è stata scoperta nel 1993 e il suo recettore nel 1995 [9]. L'IL-17 svolge un ruolo nella granulocitopoiesi e nella protezione contro patogeni extracellulari. Le IL-17F e IL-22 regolano la produzione di proteine ad attività antimicrobica nell'epitelio delle mucose. L'IL-17A stimola le cellule epiteliali nei bronchi, le cellule endoteliali venose e stimola la produzione e il rilascio dell'IL-8, la quale è chemioattrattiva per i neutrofili [9]. Inoltre, l'IL-17 regola l'espressione di specifici ligandi per le chemochine CXCR1 e CXCR2, nei fibroblasti e nelle cellule epiteliali. Le CXCR1 e CXCR2 promuovono la migrazione dei leucociti nel MALT. In vitro, iniezioni di IL-17 nel fluido sinoviale hanno accelerato l'accumulo di neutrofili.

Supponiamo che l'elevato livello di IL-17 nella saliva di fumatori con forme iniziali di broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) possa essere un marker di gravità per l'accertamento del processo infiammatorio nella fase iniziale della malattia.

Lo scopo di questo studio era di identificare i disturbi dell'omeostasi immunitaria nella zona mucosalivare utilizzando l'analisi citofluorometrica di popolazioni di cellule immunitarie e l'immunoassay enzimatico quantitativo dell'interleuchina-17 (IL-17). Sono stati studiati campioni di saliva dei lavoratori di un impianto radiochimico, fumatori e con fase precoce di broncopneumopatia cronica ostruttiva, senza esacerbazioni acute.



Introduction

Mucous membranes lining the upper respiratory tract are the entrance and colonization site for various microbial agents [1]. Mucous membranes play a leading role in the antimicrobial response, which depends on the nature of antigen and the potential effect of biologically aggressive environmental agents [2]. Tobacco dependence significantly impairs the antibacterial defense of mucous membranes, resulting in a breach of the anti-microbial physical barrier and decreased migration and secretory function of phagocytosing cells. This can facilitate the persistence of foreign agents and the accumulation of endogenous pro-inflammatory factors of immune origin [3,4].

Current laboratory techniques allow a precise analysis of immune proteins produced at the level of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in the respiratory tract and in the saliva, both under the normal condition and developed pathology. Flow cytometry can be used to analyze the cellular composition of secretory products [5]. The analysis of immune factors in the is a non-invasive method to assess the effect of tobacco smoke on the mucous membranes and mucosal immunity system in the oral cavity, possibly reflecting the effects on the bronchopulmonary system.

IL-17 is produced by Th17 T cells. Effector molecules produced by these cells include IL-17A, IL-17F, IL-22 and IL-26. IL-17 was discovered in 1993, and its receptor was identified in 1995 [9]. IL-17 plays a role in granulocytopenesis and protection against extra-cellular pathogens. IL-17F and IL-22 regulate production of antimicrobial proteins in mucous epithelium.

IL-17A stimulates epithelial cells in bronchi, venous endothelial cells and stimulates the production and release of IL-8, which is chemoattractive for neutrophils [9]. In addition, IL-17 regulates the expression of specific chemokine ligands CXCR1 and CXCR2, in the fibroblasts and epithelial cells. CXCR1 and CXCR2 promote the migration of leukocytes into the MALT. *In vitro*, IL-17 injected in the synovial fluid accelerated the accumulation of neutrophils.

We hypothesize that the increased level of IL-17 in saliva from smokers with early forms of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) could be a marker of severity for the assessment of inflammatory process at the early phase of disease.

The aim of this study was to identify disorders of immune homeostasis in mucosalivary region by using the cytofluorometric analysis of immune cell populations and the quantitative enzyme immunoassay of interleukin-17 (IL-17). Saliva samples of employees of a radiochemical facility, smokers and with early chronic obstructive pulmonary disease (COPD), free from acute exacerbations were studied.

Materiali e metodi

Questo studio fa parte di un progetto di ricerca sul ruolo dell'immunopatologia nella patogenesi della BPCO, condotta nel Dipartimento Sanitario Centrale n.71 (Ozyorsk, Russia) e nel Dipartimento di Immunologia Clinica ed Allergologia della Chelyabinsk State Medical Academy (Chelyabinsk, Russia). Negli ultimi 15 anni, è stato condotto un programma di monitoraggio spirometrico e dei parametri immunologici clinici di pazienti con BPCO che lavorano in un impianto radiochimico. La maggior parte dei lavoratori dell'impianto radiochimico sono fumatori, e quindi a rischio di sviluppo di BPCO. Lo studio è stato eseguito come parte di esami medici regolari all'Unità specializzata di Prevenzione del Policlinico / Dipartimento Sanitario Centrale n.71 dell'Agenzia Federale Medico-biologica (FMBA) della Russia.

Nel gruppo BPCO sono stati reclutati ventitré soggetti con lieve a moderata BPCO e in quello di controllo sono state incluse dieci persone senza BPCO. Tutti i soggetti erano fumatori e lavoratori nell'impianto radiochimico. Nei due gruppi c'era una corrispondenza di età, sesso, condizioni lavorative, indice di fumo e anamnesi. Entrambi i gruppi sono stati sotto costante follow-up per gli ultimi dieci anni. Le caratteristiche dei pazienti sono presentate nella **Tabella 1**. La BPCO è stata diagnosticata secondo i standard diagnostici GOLD (2003, 2006) [6,7], il Programma Federale titolato "Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva" (2004) e gli Standards per la Diagnosi ed il Trattamento della BPCO (2005). I criteri diagnostici per la BPCO includono l'anamnesi farmacologica; la presenza di sintomi cronici (tosse, produzione di espettorato, dispnea); i dati fisici (auscultazione del torace) e i test della funzionalità polmonare (PFT) ($FEV_1/FVC < 70\%$). I PFT comprendono inoltre un test di broncodilatazione (aumento di $FEV_1 < 12\%$ o < 200 mL rispetto al valore di base baseline dopo inalazione di salbutamolo 400 µg). La BPCO è stata suddivisa secondo i valori della FEV_1 : $> 80\%$ (stadio I, lieve), $50\% < FEV_1 < 80\%$ (stadio II, moderato).

La raccolta della saliva è stata fatta di mattina, a stomaco vuoto, dieci minuti dopo la risciacquatura della cavità orale con acqua, in flaconi di vetro asciutti senza

Materials and methods

This study is a part of a research project on the role of immunopathology in the pathogenesis of COPD, conducted at the Central Medical Sanitary Department n. 71 (Ozyorsk, Russia) and Department of Clinical Immunology and Allergology of Chelyabinsk State Medical Academy (Chelyabinsk, Russia).

During the last 15 years, a program of monitoring the spirometric and clinical immunological parameters of COPD patients working at the radiochemical facility has been conducted. Most workers of the radiochemical facility are smokers, therefore at risk of developing COPD. The study was performed as a part of regular medical examinations at the specialized Prevention Unit of the Industrial Polyclinic/Central Medical Sanitary Department n.71 of the Federal Medical Biological Agency (FMBA) of Russia.

Twenty-three subjects with mild to moderate COPD were included in the COPD group, and 10 subjects without COPD were included in the control group. All subjects were smokers and employed at the radiochemical facility. The two groups were matched by age, gender, working conditions, smoking index and history. Both groups were under constant follow-up for the last ten years. Patients' characteristics are shown in Table 1.

COPD was diagnosed in accordance with the GOLD Diagnosing Standards (2003, 2006) [6,7], the Federal Program titled "Chronic Obstructive Pulmonary Disease" (2004), and the COPD Diagnosing and Treatment Standards (2005).

Diagnosis criteria for COPD included past medical history; presence of chronic symptoms (cough, sputum production, dyspnea); physical data (chest auscultation) and pulmonary function tests (PFTs) (FEV_1/FVC ratio $< 70\%$). PFTs also included a bronchodilation test (increase of $FEV_1 < 12\%$ or < 200 mL compared to the baseline value after inhalation of salbutamol 400 mg). COPD was staged according to FEV_1 values: $> 80\%$ (stage I, mild), $50\% < FEV_1 < 80\%$ (stage II, moderate).

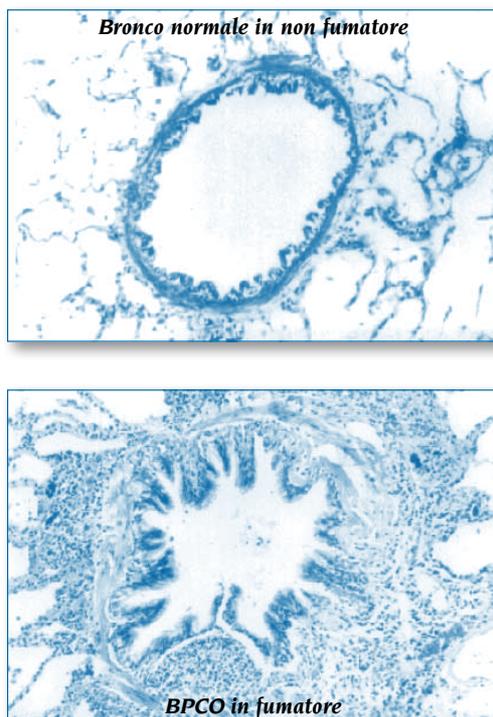
Saliva collection was performed in the morning, with empty stomach, 10 min after rinsing the oral cavity with

Tabella 1. Caratteristiche del paziente.

Caratteristiche	Gruppo BPCO (n = 23)	Gruppo di controllo (n = 10)	Valore p
Età (anni)	49,67 ± 1,14	48,58 ± 2,67	0,330
Pacchetti-anni	40 ± 13	n/d	n/d
Indice Fumo	199,66 ± 8,01	n/d	n/d
FEV_1 (% pred)*	65,1 ± 1,8	84,4 ± 1,1	0,00001
FEV_1/FVC	69,1 ± 1,2	95,5 ± 2,1	0,00001

* dopo broncodilatatore

stimolazione dell'escrezione salivare. I campioni di saliva sono stati analizzati entro le due ore successive la raccolta a temperatura di 4°C. I campioni sono stati preparati ed è stata analizzata la composizione cellulare degli immunociti presenti nella saliva utilizzando un citofluorometro a flusso *BD FACSCanto II* (Becton Dickinson, USA), secondo le procedure certificate, Patente No. 2008120724 as of 23.05.08 (Teplova S.N., Kochengina S.A., et al.). La procedura della preparazione dei campioni è stata basata sulla tecnologia del risciacquo con RPMI e bicarbonato. La composizione delle cellule immunitarie nella saliva è stata analizzata utilizzando i kit basati su anticorpi monoclonali (MAK) caratterizzati da quattro coloranti fluorescenti, la Fluoresceina isotiocianato (FITC), la Ficoeritrina (PE), la Proteina Peridina-Clorofilla (PerCP), l'Allofocianina (APC) dai MultiTest (fabbricati da Becton Dickinson, USA) e un colorante vitale, il 7-AAD. L'analisi citofluorometrica della composizione cellulare della saliva ha individuato almeno 10,000 eventi. Il numero delle cellule vitali che esprimevano un antigene leucocitario comune, CD45+, incluse le popolazioni di immunociti come i granulociti (CD45+CD13+CD14-), i monociti (CD45+CD14+CD13-), i linfociti T citotossici (CD45+CD3+CD8+), i T-helper (CD45+CD3+CD4+), le cellule NK (CD45+CD56+16+), è stato rilevato usando il 7-AAD. Le cellule sono state distinte in base all'espressione di un marker di differenziazione, il CD45. Il rapporto CD45+/CD45- delle cellule e dei pellet cellulari presenti nella saliva sono illustrati nella **Figura 1**. Le cellule vitali con un marker di differenziazione lineare, CD45+, è mostrato nella **Figura 2**. I livelli di IL-17 nella saliva sono stati misurati utilizzando l'immunoassay enzimatico con un sistema di test, il Human IL-17A ELISA BMS2017 e BMS2017TEN (Bender MedSystems, Vienna, Austria), per le analisi dei fluidi biologici, con un fotometro, Multiscan plus (Labsystems, Finlanda), 450 nm. La sensibilità del test-system era di 1 pg/mL. Sono stati misurati nella saliva i livelli di IL-17 prodotta da una relativamente nuova linea di cellule T, Th17, correlati ai linfociti CD+ [8]. Lo studio è stato approvato dalla commissione etica del Dipartimento Sanitario Centrale No.71 dell'FMBA Russia. Il consenso informato è stato ottenuto da ogni partecipante e lo studio è stato eseguito secondo la Dichiarazione di Helsinki sui Principi Etici per la Ricerca Medica che Coinvolge Soggetti Umani.



water, in dry glass flasks without stimulation of salivary discharge. Saliva specimens were analyzed within 2 hrs after collection at the maintained at 40C. Saliva specimens were prepared and cellular composition of immunocytes in saliva was analyzed using a flow cytometer, *BD FACSCanto II* (Becton Dickinson, USA), in accordance with the certified procedure, Patent No. 2008120724 as of 23.05.08 (Teplova S.N., Kochengina S.A., et al.).

The procedure of samples preparation was based on the rinse technology with RPMI and bicarbonate. The population composition of immune cells in saliva was analyzed using the monoclonal antibody-based kits (MAK) labeled with four fluorescent dyes, Fluorescein Isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridin-Chlorophyll Protein (PerCP),

Allophycocyanin (APC) from the MultiTest series (manufactured by Becton Dickinson, USA), and a vital dye, 7-AAD.

The cytofluorometric analysis of the cellular composition of saliva accounted for at least 10,000 events. The number of viable cells expressing a leukocyte common antigen, CD45+, was accounted for using 7-AAD, including populations of immunocytes such as granulocytes (CD45+CD13+CD14-), monocytes (CD45+CD14+CD13-), T-cytotoxic lymphocytes (CD45+CD3+CD8+), T-helper (CD45+CD3+CD4+), NK-cells (CD45+CD56+16+).

Cells were separated based on the expression of a differentiation marker, CD45. CD45+/CD45- ratio of cells and cell pellets in saliva is illustrated in Figure 1. The gate of viable cells with a linear differentiation marker, CD45+, is shown on Figure 2.

Levels of IL-17 in saliva were measured using enzyme immunoassay with a test-system, Human IL-17A ELISA BMS2017 and BMS2017TEN (Bender MedSystems, Vienna, Austria), for analyses of biological fluids, with a plate photometer, Multiscan plus (Labsystems, Finland), 450 nm. The test-system sensitivity was 1 pg/mL. The levels of IL-17 produced by a relatively new line of T-cells, Th17, related to CD+ lymphocytes, were measured in saliva [8].

The study was approved by the Ethical Committee of the Central Medical Sanitary Department No. 71 of the FMBA Russia.

The informed consent was obtained from each participant, and the study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki on Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.

L'analisi statistica è stata condotta con il programma *Statistics*, Versione 6. I risultati vengono presentati nelle tabelle come mediane e i suoi range interquartili. Le comparazioni tra i gruppi sono state eseguite attraverso il test Mann-Whitney. Valori di $p < 0,05$ sono considerati significanti.

Risultati

I risultati dell'analisi citofluorometrica della popolazione delle cellule immunitarie nella saliva si trovano nella Tabella 2. Non ci sono state differenze significative tra il numero relativo e assoluto di cellule vitali nella saliva degli individui dei due gruppi (25% del gruppo BPCO contro 18% del gruppo di controllo). Vari tipi di anticorpi monoclonali e traccianti fluorescenti sono stati utilizzati per misurare la quantità di specifiche popolazioni vitali di immunociti in campioni di saliva. Come è mostrato nella **Tabella 2**, i granulociti con fenotipo (CD45+CD13+CD14-) rappresentavano l'89-95% di leucociti vitali in entrambi i gruppi. Sono stati osservati meno macrofagi (5,6% nel gruppo BPCO e 1,15% in quello di controllo) e linfociti (5,7% nel gruppo BPCO e 0,9% in quello di controllo) nei campioni di saliva. Non ci sono state differenze tra i due gruppi per quanto riguarda il numero relativo ed assoluto di granulociti (CD13+CD14-), macrofagi (CD14+CD13+), natural killers (singolo- e doppio-positivo CD16+ e CD56+), e linfociti B (CD19+). È stato trovato un aumento significativo di linfociti CD3+CD4+ nel gruppo BPCO in confronto al gruppo di controllo, (3,3% contro 0,6%, $p=0,049$), il quale ha mostrato un incremento significativo dei linfociti T-helper, senza alterazione del numero totale di cellule citotossiche nella regione mucosalivare. I livelli di IL-17 prodotti da

Statistical analysis was performed using *Statistics*, Version 6. The obtained results are given in the tables as the median and its quartile range. The inter-group comparisons were performed by Mann-Whitney test. p values < 0.05 were regarded as significant.

Results

The findings of cytofluorometric analysis of the population of immune cells in saliva are given in Table 2. There were no significant differences between the relative and absolute amounts of viable cells in the saliva of individuals from the two groups (25% in the COPD group vs. 18% in the control group). Several types of monoclonal antibodies and fluorescent labels were used to measure the amount of specific viable populations of immunocytes in saliva samples. As shown in Table 2, granulocytes with phenotype (CD45+CD13+CD14-) represented 88-95% of viable leukocytes in both groups. Fewer macrophages (5.6% in the COPD group and 1.15% in the control group) and lymphocytes (5.7% in the COPD group and 0.9% in the control group) were observed in the saliva samples.

There were no differences between the two groups in terms of relative and absolute amounts of granulocytes (CD13+CD14-), macrophages (CD14+CD13+), natural killers (single- and double-positive CD16+ and CD56+), and B-lymphocytes (CD19+). A significant increase in the CD3+CD4+ lymphocytes (3.3% vs. 0.6%, $p = 0.049$) was found in the COPD group in comparison with the control group, which indicated a significant increase of T-helpers lymphocytes, without alteration of the total amount of cytotoxic cells in the mucosalivary region. IL-17 levels produced by a relatively new line of T-cells, Th17, related to the CD4+ lymphocytes, were measured in saliva. A sig-

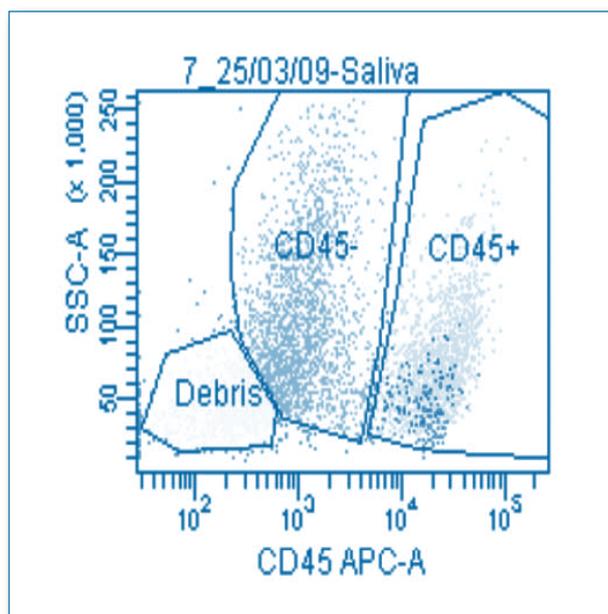


Fig. 1. Distribuzione delle cellule nella saliva sotto analisi citofluorometrica.

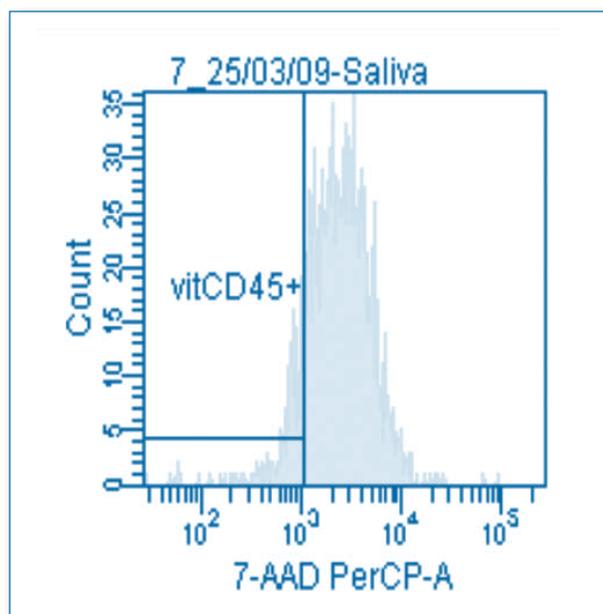


Fig. 2. Gate delle cellule vitali CD45+ nella saliva.

una relativamente nuova linea di cellule T, la Th17, correlata ai linfociti CD4+, sono stati misurati nella saliva. Un significativamente elevato livello di IL-17, secreta dai T-helper 17 è stato trovato nel gruppo BPCO in confronto al gruppo di controllo. È stata analizzata la relazione tra la quantità di immunociti e livelli di IL-17 nella saliva. È stata trovata una correlazione notevolmente positiva tra i livelli di IL-17 e il numero dei T-helper, in entrambe le espressioni, percentuale ed assoluta ($r = 0,45$, $p = 0,001$), suggerendo un ruolo primario delle cellule CD4+ nella produzione di interleuchine nei fumatori.

Discussione

L'analisi citofluorometrica dello spettro della popolazione di immunociti nei campioni di saliva, hanno rivelato che il gruppo di leucociti vitali è stato piuttosto piccolo, circa il 20-25% del numero totale delle cellule, con una quantità grande di pellet cellular, in fumatori con e senza BPCO. I granulociti sono stati la popolazione prevalente tra le cellule vitali, rappresentando l'88-95% degli immunociti totali presenti nella saliva. Tuttavia, i linfociti T-helper (CD45+CD3+CD4+) sono stati più numerosi negli individui con BPCO lieve a moderata in confronto ai fumatori senza BPCO. È stato inoltre trovato un aumento di IL-17 nella saliva di lavoratori con BPCO in confronto al gruppo di controllo. I livelli di IL-17 in correlazione con il numero totale delle cellule CD4+ nella saliva,

nificantly increased level of IL-17 secreted by T-helpers 17 was found in the COPD group compared with the control group. The relationship between the amounts of immunocytes and the levels of IL-17 in the saliva was analyzed. A significantly positive correlation between levels of IL-17 and amounts of T-helpers, both in the percentage and absolute expression, was found ($r = 0.45$, $p = 0.001$), suggesting a leading role of the CD4+ cells in production of the interleukins in smokers.

Discussion

The cytofluorometric analysis of the population spectrum of immunocytes in saliva samples revealed that the pool of viable leukocytes was rather small, about 20-25% of the total number of cells, with a large amount of cell pellet, in smokers with and without COPD. Granulocytes were the prevalent population among viable cells, representing 88-95% of total immunocytes in the saliva.

However, T-helper lymphocytes (CD45+CD3+CD4+) were more numerous in individuals with mild to moderate COPD in comparison with smokers without COPD. An increase of IL-17 in the saliva of workers with COPD, compared with the control group, was also found. IL-17 levels correlated with the total amount of CD4+ cells in the saliva, suggesting an activation of the secretory function by a subpopulation of the CD3+CD4+ lymphocytes, especially T-helpers 17. The two groups of subjects, with and

Tabella 2. Sottopopolazioni di immunociti presenti nella saliva nel gruppo BPCO e nel gruppo di controllo.

Fattore	Gruppo BPCO n = 23			Gruppo di controllo n = 10			Valore p
	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Media±dev.st.	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Media±dev.st.	
Leucociti (abs*10 ⁶)	2,40	1,75-2,90	2,42±0,72	2,43	2,20-2,65	2,43±0,32	0,944
Cellule vitali (L-vital) (%)	25,20	18,70-41,60	28,92±16,75	18,85	7,40-30,30	18,85±16,19	0,482
CD45+CD13+14- (%)	88,80	39,25-95,50	68,80±35,96	95,35	93,70-97,00	95,35±2,33	0,261
CD45+CD14+13- (%)	0,00	0,00-0,02	0,10±0,22	0,00	0,00-0,00	0,00±0,00	0,440
CD45+CD 13+14+ (%)	5,60	2,00-58,25	26,78± 36,82	1,15	1,00-1,30	1,15 (0,21)	0,160
CD45+CD3+ (%)	2,25	0,35-5,00	8,61±20,16	0,20	0,10-0,30	0,20 (0,14)	0,205
CD45+CD3+CD4+ (%)	3,30	2,20-10,15	13,84±24,77	0,60	0,00-1,20	0,60 (0,85)	0,049
CD45+CD3+8- (%)	25,85	6,00-81,85	38,11± 37,69	1,40	1,10-1,70	1,40 (0,42)	0,049
CD45+CD3+8+ (%)	0,20	0,05-0,75	0,74±1,18	0,15	0,00-0,30	0,15±0,21	0,617
CD45+CD19+ (%)	3,35	1,10-6,85	7,04±12,18	0,70	0,30-1,10	0,70±0,57	0,182
CD45+CD16+56- (%)	0,75	0,15-1,85	1,59±2,44	0,00	0,00-0,00	0,00±0,00	0,106
CD45+CD56+16- (%)	44,15	17,75-74,90	46,59± 30,10	31,90	0,60-63,20	31,90±44,26	0,433
CD45+CD56+16+ (%)	5,20	1,45-21,20	11,65±14,79	29,80	0,90-58,70	29,80±40,87	0,602

indica un'attivazione della funzione secretoria da parte di una sottopopolazione dei linfociti CD3+CD4+, specialmente dai T-helper 17. I due gruppi di soggetti, con e senza BPCO in fase precoce, corrispondevano per sesso, età, anamnesi di fumo ed erano impiegati nello stesso impianto radiochimico. Tutti gli individui non hanno avuto esacerbazioni nella durata dello studio. L'elevata quantità di cellule CD4+ e livelli di IL-17 nella saliva di soggetti con BPCO può rispecchiare una attivazione del sistema immunitario a livello del MALT della regione mucosaliare, la quale costituisce il sito di entrata per patogeni, antigeni ed allergeni. La regione mucosaliare come parte del sistema di protezione delle membrane mucosali, potrebbe inoltre indicare alterazioni simili nel tratto respiratorio superiore ed in particolare, nel tessuto linfatico associato ai bronchi (BALT). Questo fatto, però, deve essere confermato da studi specifici.

Conclusion

Lo studio ha mostrato una specificità della composizione cellulare degli immunociti presenti nella saliva di fumatori con BPCO che lieve a moderata che è stata vista nella prevalenza della popolazione dei T-helper, con un rapporto alto di CD4+/CD8+. È stato inoltre misurato nello stesso gruppo, un elevato livello di IL-17 nella saliva, in confronto al gruppo di controllo di fumatori senza BPCO. ■

without early COPD, were matched for gender, age, smoking history and were employed in the same radiochemical facility. All subjects were exacerbation-free at the time of the study. The increased amounts of CD4+ cells and IL-17 levels in the saliva of subjects with COPD may reflect an activation of the immune system in MALT of the mucosal region, which is the entrance site for pathogens, antigens and allergens. As part of protection system of mucous membranes, the mucosal region may also reflect similar alterations in the upper respiratory tract and, in particular, in the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). This, however, remains to be confirmed with specific studies.

Conclusion

The study indicated that a specificity of the cellular composition of immunocytes in the saliva of smokers with mild to moderate COPD was in the prevalence of T-helper population, with a correspondingly high ratio of CD4+/C8+. A high level of IL-17 in saliva was also measured in this group in comparison with the control group of smokers without COPD. ■

Disclosure: L'Autore dichiara l'assenza di qualsiasi tipo di conflitto di interesse.

Traduzione: Charilaos Lygidakis

BIBLIOGRAFIA

1. Teplova SN, Alexeev DA Secretary immunity. Chelyabinsk 2002: 143-155 [Russian].
2. Ignatova GL, Immune status in patients with chronic bronchitis. In: Factors of Cellular and Humoral Immunity in Various Pathological and Physiological Conditions. The Book of Abstracts of the Republican Research Conference. Chelyabinsk 1992: 42 [Russian].
3. Schwarzman JS, Hazenson LB Local immunity. Moscow 1978: 224 [Russian].
4. Simbirtsev AS, Cytokines: classification and biological functions. Cytokines and Inflammation 2004; 3(2): 16-23 [Russian].
5. Haydukova SV, Zurochki SV, Issues of the Modern Flow Cytometry. Clinical Application. Chelyabinsk 2008: 195 [Russian].
6. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Executive summary. Bethesda, National Heart, Lung and Blood Institute 2003; www.goldcopd.com.
7. Global Initiative for Chronic Obstruc-
8. Ley K, Smith E, Stark MA, IL-17A-producing neutrophil-regulatory Th-lymphocytes. Immunol Res 2006; 34(3): 229-242.
9. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK, Th17 cells and mucosal host defense. Semin Immunol 2007; 19: 362-371.

