

# Analisi dei fattori immunopatogeni secretori nella saliva: comparazione tra soggetti fumatori, sani e BPCO

## *Analysis of pathogenic secretory immunity factors in saliva: comparison between healthy and COPD smokers*

Altynbayeva EI, Teplova SN, Ignatova GL, Galimova OV, Egorov AN

### Riassunto

**Introduzione.** Questo studio ha analizzato i fattori secretori immunopatogeni e proinfiammatori nella saliva di lavoratori di uno stabilimento radiochimico con o senza broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO).

**Metodi.** 83 individui che hanno lavorato nello stabilimento, fumatori e affetti da vari gradi di BPCO sono stati selezionati e arruolati nello studio. Tutti i soggetti affetti da BPCO avevano una storia di tabagismo in media di 26 anni, con uno smoking index di oltre 200. L'età media era  $46.9 \pm 1.1$  ( $46.7 \pm 1.3$  per i maschi e  $47.4 \pm 2.3$  per le femmine). Il gruppo di controllo includeva 30 soggetti sani, di età e distribuzione per sesso simile, che hanno lavorato nelle stesse condizioni e che erano fumatori, tuttavia senza alcun segno di bronco-ostruzione. Nella saliva di ogni soggetto sono state misurate le proteine, la mucina, l'attività totale del complemento ed i suoi componenti (C1, C2, C3, C4, C5); C3a, C5a, i livelli di immunoglobuline sIgA, IgG) e le loro sottoclassi (G1, G2, G3, G4), la lactoferrina, la chemochina proinfiammatoria IL-8 ed i metabolici stabili dell'ossido nitrico (NO).

**Risultati.** L'analisi della saliva dei pazienti con BPCO ha rivelato un aumento significativo di IgA, IgG2, IL-8 e dei metabolici stabili dell'NO nel gruppo BPCO rispetto al gruppo di controllo, mentre la concentrazione di mucina era significativamente più bassa nei soggetti BPCO rispetto ai controlli sani.

**Conclusioni.** La saliva potrebbe essere usata per monitorare in maniera non invasiva lo status immunitario del tessuto linfoide associato alle mucose nei soggetti fumatori a rischio di sviluppare BPCO.

**Parole chiave:** BPCO, immunità secretoria, tecniche non invasive, fattori proinfiammatori, protezione antimicrobica

### INTRODUZIONE

La Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) è una malattia generalmente della seconda metà della vita, sviluppandosi più spesso in soggetti di età compresa tra i 40 ed i 60 anni. La BPCO è caratterizzata da una lenta, graduale ma costante riduzione della funzionalità polmonare. In Russia, la BPCO nei suoi stadi iniziali è attualmente sottodiagnosticata<sup>1,2</sup>. Negli

### Abstract

**Background.** This study is focused on the analysis of secretory immunity factors of antimicrobial and phlogogenic effect in saliva from workers of the large radiochemical facility with chronic obstructive disease.

**Methods.** 83 individuals, who worked at the radiochemical facility, smokers, with different degrees of COPD were selected and included in the study. All COPD patients had a long-term smoking history of about 26 years; the smoking index was over 200 in all cases. Average age was  $46.9 \pm 1.1$  ( $46.7 \pm 1.3$  for males and  $47.4 \pm 2.3$  for females). The control group included 30 healthy individuals of similar same age and gender distribution, who worked under the same conditions and were smokers but without any sign of airway obstruction. Mucin, total complement activity and its components (C1, C2, C3, C4, C5), amounts of C3a, C5a, levels of immunoglobulins (IgA, IgG) and its subclasses (G1, G2, G3, G4), lactoferrin, pro-inflammatory chemokine IL-8 and nitrogen oxide (NO) stable metabolites were measured in the saliva of each subject.

**Results.** The analysis of saliva in COPD patients showed a significant increase of IgA, IgG2, IL-8 and NO stable metabolites in comparison with the control group, while the concentration of mucin was significantly lower when compared to healthy controls.

**Conclusions.** Saliva may be used for the non-invasive monitoring of the immunitary status of mucosal-associated lymphoid tissue in smoker subjects at risk of developing COPD.

**Keywords:** secretory immunity, non-invasive technique, pro-inflammatory factors, antimicrobial protection

### INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a disease of the latter half of life which is, as a rule, often developed in individuals aged 40-60 years. COPD is characterized by a slow, gradual and steady reduction of lung function. In Russia, COPD in its early stages is currently underdiagnosed<sup>1,2</sup>. In the USA, about 24 million individuals suffer from this disease,

Altynbayeva Ekaterina I  
Central Medical Sanitary Department  
No. 71, Polyclinic No. 3, Ozyorsk,  
Chelyabinsk Region, Russia

Teplova SN  
Department of Immunology and  
Allergology, Chelyabinsk State Medical  
Academy, Chelyabinsk, Russia

Ignatova GL Galimova OV Egorov AN  
Department of Therapy, Phthisiopulmology and Occupational Pathology,  
Urals State Medical Academy of Further Education, Chelyabinsk,  
Russia

USA, circa 24 milioni di individui ne sono affetti, oltre la metà dei quali sono over 65 anni; tuttavia, solo 10 milioni di individui ne sono consapevoli, mentre 6 milioni di pazienti ricevono trattamenti<sup>2,3</sup>. La BPCO è attualmente considerata la quarta causa di morte negli USA, e diventerà la terza entro il 2020 in tutto il mondo<sup>1,13</sup>. Le perdite economiche dovute alla BPCO ammontano a circa 30.4 miliardi di dollari nel 2000, mentre le perdite indirette (per es. la diminuzione della produttività dovuta alla disabilità ed infine alla morte) ammontano a 15.5 miliardi di dollari. La World Bank of Development prevede un aumento a livello mondiale delle perdite dovute alla BPCO nei prossimi 20 anni<sup>9,13</sup>.

La bronco-ostruzione si sviluppa gradualmente in conseguenza della risposta infiammatoria al fumo di tabacco. Le frequenti infezioni respiratorie sono anch'esse un importante fattore eziologico<sup>1</sup>. Numerosi studi hanno dimostrato che l'attivazione di cellule nel lavaggio broncoalveolare<sup>5</sup> e nell'espettorato indotto<sup>6</sup> gioca un importante ruolo nell'iniziazione della risposta infiammatoria immuno-mediata nelle vie aeree dei pazienti con BPCO.

Il sistema immunitario delle mucose risponde solo agli antigeni penetranti le membrane mucose dando il via ad una reazione immune adattativa a livello sia locale che sistemico<sup>3</sup>. Al giorno d'oggi diverse tecniche sono utilizzate per studiare le reazioni immunitarie nel tessuto linfoide bronco-associato, ed utilizzano il lavaggio broncoalveolare, l'espettorato, l'espettorato indotto e l'esalato condensato. Una di queste tecniche è l'analisi delle immunoproteine nella saliva, che è costituita da secrezioni delle ghiandole salivari, tessuto linfoide associato con le tonsille e tessuto linfoide della mucosa nasale<sup>4</sup>.

L'analisi della saliva per scopi diagnostici rappresenta un metodologia non invasiva e semplice, per ottenere materiale su cui possono essere applicate precise metodiche di misurazione di immunoproteine, ormoni e neurotrasmettitori<sup>7,8</sup>.

Lo scopo di questo studio era di analizzare i fattori immunitari secreti nella saliva ed i loro effetti antimicrobici e pro-infiammatori in un gruppo di lavoratori di uno stabilimento radiochimico affetti da BPCO.

## METODI

83 lavoratori (65 maschi) di uno stabilimento radiochimico della Mayak Production Association (Mayak PA) controllati presso l'unità di Prevenzione del 71° Dipartimento Sanitario (Chelyabinsk, Russia) ed affetti da BPCO sono stati inclusi nello studio.

La diagnosi di BPCO è stata posta in base ai GOLD Diagnosing Standards<sup>9</sup> ed al Programma Federale "Chronic Obstructive Pulmonary Disease" basato sull'anamnesi, i sintomi del paziente e le prove funzionali respiratorie (PFR).

L'età media era  $46.9 \pm 1.1$  anni ( $46.7 \pm 1.3$  nei maschi e  $47.4 \pm 2.3$  per le femmine). 11 pazienti presentavano un quadro di bronchite cronica (BPCO stadio 0), 62 BPCO di I stadio, 9 BPCO di II stadio ed 1 BPCO di III stadio. Tutti i soggetti erano ex-fumatori di lunga data di circa 26 anni ( $21.6 \pm 2.1$  pacchi-anno). Tutti i soggetti sono stati esaminati al di fuori di fasi di esacerbazione clinica.

over a half of them are over 65 years, however, only 10 million individuals are aware of this disease, and 6 million patients receive treatment<sup>2,3</sup>. COPD is ranked as the fourth leading cause of death for the population in the USA and by 2020 it will become the third leading cause of death in the world<sup>1,13</sup>. Economic losses related to this pathology amounted to approximately 30.4 billion USD in 2000, indirect losses (i.e. decline in profits due to disability and untimely death) amounted to 15.5 billion of USD. The World Bank of Development predicts a global increase of losses due to COPD within the next 20 years (GOLD)<sup>9,13</sup>.

Progressing bronchial obstruction gradually develops as a consequence of the inflammatory response to tobacco smoke. Frequent airways infections also represent an important etiologic factor<sup>1</sup>. A number of studies demonstrated that the activation of inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage<sup>5</sup> and induced sputum<sup>6</sup> plays an important role in the initiation of the immune-mediated inflammation in the airways of COPD patients.

The mucosal immunity system responds only to antigens penetrating the mucous membranes starting an adaptive immune response both at the local and systemic level<sup>3</sup>. Nowadays different techniques are used to study the immune reactions in the broncho-associated lymphoid tissue and they analyze bronchoalveolar lavage fluid, sputum, induced sputum, and expiratory air condensate. One of these techniques is the analysis of immunoproteins in the saliva, which is constituted by salivary gland secretions, lymphoid tissue associated with tonsils and lymphoid tissue in the nasal mucosa<sup>4</sup>.

The analysis of saliva for diagnostic purposes represents a non-invasive and simple methodology to obtain material, on which precise technologies are available to measure immune proteins, hormones and neurotransmitters in saliva<sup>7,8</sup>.

The aim of this study was to analyze the secretory immunity factors and their antimicrobial and proinflammatory effects in saliva obtained from workers of a large radiochemical facility affected by COPD.

## METHODS

83 workers (65 males) of radiochemical facility belonging to Mayak Production Association (Mayak PA), affected by COPD and followed by the Preventive Unit of 71<sup>st</sup> Central Medical Sanitary Department (Chelyabinsk, Russia) were included in the study.

The diagnosis of COPD was established in accordance with the GOLD Diagnosing Standards<sup>9</sup> and the Federal Program entitled "Chronic Obstructive Pulmonary Disease" and based on the medical history, patient's symptoms and pulmonary function tests (PFTs).

Average age was  $46.9 \pm 1.1$  years ( $46.7 \pm 1.3$  for males e  $47.4 \pm 2.3$  for female). There were 11 individuals with chronic bronchitis, 62 patients with I degree COPD, 9 patients with II degree COPD and 1 patient with III degree COPD.

All COPD patients had a long-term smoking history of about 26 years ( $21.6 \pm 2.1$  pack-years). The patients were studied out of any clinical exacerbation phase.

Il gruppo di controllo includeva 30 soggetti sani di simile età e distribuzione dei sessi (età media  $45.6 \pm 2.7$ , 22 maschi) che lavoravano nelle stesse condizioni ed ex-fumatori ( $21.4 \pm 2.5$  pacchi-anno), senza segni clinici o funzionali di BPCO o bronchite cronica (BPCO stadio 0). Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i soggetti.

La concentrazione dei fattori immunologici secretori, quali proteine totali, mucina, attività totale del complemento, attività dei componenti C1, C2, C3, C4, C5, è stata misurata nella saliva di tutti i soggetti utilizzando la tecnica di titraggio emolitico<sup>11</sup>.

La concentrazioni delle anafilotossine C3a e C5a sono state misurate utilizzando la tecnica immunoenzimatica Multiscan plus, così come per i livelli di immunoglobuline (sIgA, IgG) e le loro sottoclassi (G1, G2, G3, G4), la lattoferrina e la chemochina proinfiammatoria IL-8<sup>10</sup>. L'ossido nitrico è stato stimato misurandone la concentrazione dei suoi metaboliti stabili nella saliva (nitrati e nitriti) utilizzando la tecnica di Griss modificata<sup>11</sup>.

Gli esperimenti sono stati condotti in accordo con gli standard etici stabiliti dal comitato etico istituzionale o nazionale e con la Dichiarazione di Helsinki del 1975, revisionata nel 2000.

Sono riportati i valori medi  $\pm$  la deviazione standard (SD). Le differenze tra i diversi gruppi sono state studiate utilizzando il test di Mann-Whitney dopo aver valutato la distribuzione con il test di Kolmogorov-Smirnov. Le differenze sono state considerate significative per valori di  $p < 0,05$ . Il software Statistics (ver. 6) è stato utilizzato per tutte le analisi.

## RESULTATI

La tabella 1 riporta le caratteristiche demografiche, la storia di fumo e il valore di FEV<sub>1</sub> dei soggetti studiati nei due gruppi, BPCO e controlli sani.

**Tabella 1.** Caratteristiche demografiche, storia di fumo e valori di FEV<sub>1</sub> dei due gruppi.

Variabile	Pazienti con BPCO (83 soggetti)	Controlli sani (30 soggetti)
Età (anni)	$46.9 \pm 1.1$	$45.6 \pm 2.7$
Storia lavorativa nell'impianto (anni)	>15	>15
Smoking history (pacchi-anno)	$21.6 \pm 2.1$	$21.4 \pm 2.5$
FEV <sub>1</sub> (% pred)	$65.1 \pm 1.8^*$	$84.4 \pm 1.1$

L'asterisco\* indica le differenze statisticamente significative.

I risultati delle misurazioni delle immunoproteine secretorie nella saliva sono illustrati nella **tabella 2**.

Il confronto tra pazienti affetti da BPCO e controlli sani ex-fumatori che lavoravano nelle stesse condizioni mostra significative differenze riguardo ad una serie di fattori immunitari nella saliva.

La concentrazione di mucina nel gruppo BPCO era circa la metà di quella nei controlli sani ( $p=0.03$ ). La lattoferrina, invece, una proteina che trasporta ferro prodotta dai neutrofili, era invece significativamente più alta nei soggetti BPCO che nei controlli ( $p=0.003$ ).

The control group included 30 healthy individuals of similar age and gender distribution (average age  $45.6 \pm 2.7$ , 22 males), working under the same conditions, ex-smokers ( $21.4 \pm 2.5$  pack-years), without clinical or functional signs of COPD or chronic bronchitis. Informed consent was obtained from each subject.

All patients were examined for secretory immunity factors in saliva such as proteins, mucin, total complement activity by 50% hemolysis, and activity of its components (C1, C2, C3, C4, C5) using the hemolytic titration technique<sup>11</sup>. Amounts of C3a, C5a anaphylatoxins were measured by the enzymatic immune technique using Multiscan plus, as well as levels of immunoglobulins (sIgA, IgG) and their subclasses (G1, G2, G3, G4), lactoferrin, and pro-inflammatory chemokine (IL-8)<sup>10</sup>. Nitrogen oxide was estimated by measuring the concentration of its finite stable metabolites in saliva (nitrates and nitrites) using a modified Griss' technique<sup>11</sup>.

All experiments have been carried out in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000

Mean values  $\pm$  standard deviations (SD) are reported. To compare different groups, the Mann-Whitney test was used, after testing the distribution with the Kolmogorov-Smirnov test. P values  $< 0.05$  were regarded as significant. All statistical tests were performed with the Statistics (ver. 6) software.

## RESULTS

Demographic data, smoking history and FEV<sub>1</sub> values of the two groups (COPD and healthy controls) are reported in Table 1.

**Table 1.** Demographic data, smoking history and FEV<sub>1</sub> values of the two groups

The \* indicates statistically significant differences

Results of immunity secretory factors measurements in saliva are showed in **table 2**.

The comparison between COPD patients and healthy smoker controls working under the same conditions revealed significant differences in regard of the inborn immunity factors in saliva.

The concentration of mucin was about half in the COPD group compared with healthy controls ( $p < 0.03$ ). In contrast, lactoferrin, a ferro-transport protein produced by neutrophils, was significantly higher in the COPD group compared with healthy controls.

**Tabella 2.** fattori immunitari secretori nella saliva dei soggetti fumatori che lavoravano nello stabilimento radiochimico.**Table 2.** Secretory immunity factors in saliva from smokers working at the radiochemical facility.

Factors		COPD patients n = 83		Healthy individuals n = 30		p-value
		Me	Lower and upper quartiles	Me	Lower and upper quartiles	
Protein	mg%	392	304-430		274-376	0.11
Mucin		28	16-42	58	30-70	0.03*
IgA	mg/ml	254	235-458	88.7	46.3-100	0.00001*
IgG1		1.2	0.7-2.33	1.09	0.69-1.32	0.21
IgG2		0.47	0.14-1.2	0.01	0-0.2	0.001*
IgG3		0.03	0.01-0.37	0.11	0.01-0.25	0.82
IgG4		0.2	0-0.42	0.005	0-0.02	0.116
Complement activity 50)		24.7	22.8-26.7	22.2	21.2-25.8	0.33
C1	□108 effective molecules	2.2	1.3-3.6	2.5	2.1-3.8	0.28
C2		2.0	1.2-3.6	2.3	2.3-3.2	0.18
C3		2.2	1.6-7.0	3.0	2.4-4.2	0.3
C4		2.1	1.2-3.1	2.9	1.9-4.6	0.28
C5		2.2	1.3-3.0	2.5	1.2-6.3	0.45
C3a	µg/ml	0.3	0.18-3.37	0.22	0.08-1.65	0.39
C5a		0.20	0.14-0.24	0.12	0.06-0.23	0.33
Lactoferrin	ng/ml	1236	563.5 - 2366.5	410	147-1236	0.003*
Interleukin-8	pg/ml	73.1	38.1-365	0.12	0-1.2	0.000006*
NO <sub>2</sub>	µmole/l	1.2	0.79-1.6	0.43	0.2-1.02	0.002*
NO <sub>3</sub>		5.6	3.6-7.1	4.2	1.28-6.2	0.1
NO <sub>x</sub> #		6.4	4.7-8.6	5.1	2.5-6.3	0.04*

L'asterisco\* indica le differenze statisticamente significative  
#: NO<sub>x</sub> indica tutti gli ossidi di azoto.

The \* indicates statistically significant differences  
#: No<sub>x</sub> indicated all nitrogen oxides.

Il sistema del complemento è stata analizzato sia esaminando l'efficienza emolitica totale del sistema (CH50) che le componenti iniziali della via di attivazione classica (C1-C5) utilizzando la tecnica di titraggio. Non sono state trovate differenze significative tra i due gruppi riguardo allo stato di attivazione del sistema del complemento. Una concentrazione significativamente più elevata ( $p=0.00001$ ) di IgA, prodotta dai linfociti B nel tessuto linfoide associato alle mucose e che gioca un ruolo chiave nella protezione antimicrobica delle membrane mucose, è stata trovata nei pazienti BPCO rispetto ai controlli sani. Un aumento significativo della IgG2 è stato anche trovato nel gruppo BPCO in confronto con i controlli ( $p=0.001$ ).

Un aumento molto significativo della IL-8 ( $p=0.000006$ ), prodotta dalle cellule epiteliali e dai macrofagi, è stato osservato nei soggetti BPCO in confronto con i controlli sani.

L'analisi dei metaboliti terminali stabili dell'ossido nitrico ha mostrato un aumento significativo dell'NO<sub>2</sub> ( $p=0.002$ ) e degli ossidi di azoto in generale (NO<sub>x</sub>) ( $p=0.04$ ) nel gruppo BPCO rispetto al gruppo dei controlli.

## DISCUSSIONE

Nella patogenesi della BPCO un ruolo importante viene attualmente assegnato alle alterazioni della risposta immunitaria a livello delle mucose respiratorie, che induce lo sviluppo di una risposta immunitaria anormale, stress ossidativo, indebolimento dell'atti-

The complement system was analyzed with regard both to the total hemolytic efficiency of the system (CH50) and initial components of the classical activation mode (C1-C5) using the hemolytic titration technique. No significant differences regarding the activation status of the complement system between the two groups were found. A significantly higher ( $p=0.00001$ ) concentration of IgA, produced by B-lymphocytes in the mucous-associated lymphoid tissue and which plays a key role in the antimicrobial protection of mucous membranes, was found in the COPD patients in comparison with healthy controls. A significant increase of IgG2 was also found in COPD group compared with controls ( $p=0.001$ ).

A very significant increase of IL-8 ( $p=0.000006$ ), produced by epithelial cells and macrophages, was observed in COPD subjects compared with healthy controls.

The analysis of terminal stable metabolites of nitrogen oxide showed a significant increase of NO<sub>2</sub> ( $p=0.002$ ) and nitrogen oxides in total (NO<sub>x</sub>) ( $p=0.04$ ) in the COPD group compared with the control group.

## DISCUSSION

In the pathogenesis of COPD an important role is currently assigned to the impairment of the mucosal immunity response, which induces development of abnormal inflammatory response, oxidative stress, impairment of anti-colonization activity of

vità anti-colonizzatrice nelle mucose delle vie aeree, e sviluppo di bronco-ostruzione progressiva. Il fumo di tabacco causa alterazioni nel tessuto linfoide associato alle mucose non solo nell'albero bronchiale, ma anche nella cavità orale. Questo ci permette di valutare l'effetto del fumo sui fattori immunitari non solo nel fluido broncoalveolare, ma potenzialmente anche nella saliva, che è il prodotto di secrezione delle ghiandole salivari e del tessuto linfoide associato alle tonsille, naso ed alte vie aeree, e che è facilmente ricavabile con tecniche non invasive. In questo studio, abbiamo trovato differenze statisticamente significative riguardo a diversi fattori immunitari secreti nella saliva tra soggetti BPCO e controlli sani di età e sesso simili, che lavoravano nello stesso stabilimento e con una lunga storia di fumo. Queste differenze riguardavano innanzitutto la barriera anti-colonizzazione delle membrane mucose nel cavo orale rappresentata dalla mucina, il cui livello nel gruppo BPCO era circa la metà che nei controlli sani. La mucina è coinvolta nell'immunità innata e nel processo di legame ed eliminazione di particelle ed antigeni estranei, limitando quindi l'accesso di sostanze irritanti alla superficie delle cellule epiteliali dell'albero respiratorio, prevenendone l'adesione<sup>8</sup>. La mucina è importante anche per assicurare la stabilità della temperatura nelle cavità orale e nelle vie aeree. La riduzione della produzione di mucina da parte delle cellule mucipare nelle membrane mucose potrebbe essere uno dei meccanismi che spiegano il ridotto rilascio di mucina nel tratto respiratorio, che è tipico dei pazienti con BPCO<sup>11</sup>. L'analisi dei meccanismi di immunità acquisita ha messo in evidenza un aumento delle IgA e delle IgG2 nei soggetti con BPCO rispetto ai controlli. Le IgA sono le principali immunoglobuline protettive prodotte dai linfociti B nel tessuto linfoide associato alle mucose. L'aumento delle IgG2 potrebbe essere legato all'afflusso dalla circolazione sistemica, a causa dell'aumentata permeabilità tipica dei processi infiammatori. Gli aumentati livelli di IgA ed IgG2 rappresenta una tipica risposta specifica del tessuto linfoide associato alle mucose. Le IgA non sono in grado di attivare il complemento attraverso la via classica, mentre la IgG2 ha una scarsa capacità di legare il complemento, il che può spiegare la mancanza di attivazione del complemento e le fluttuazioni nei livelli di anafilotossine pro-infiammatorie (C3a e C5a) osservate nella BPCO. La IL-8 è considerata un marker di severità dell'infiammazione delle

airways mucous membranes and development of progressive bronchial obstruction. Tobacco smoking affects the mucous-associated lymphoid tissue in the bronchial tree, but also in the oral cavity. This allows to assess the effect of smoking on the immune factors not only in broncho-alveolar fluid, but potentially also in saliva, which is a mixed secretion of salivary glands and mucous-associated lymphoid tissue from the tonsils, nose, upper airways, and which is easily available with non-invasive techniques. In this study, we found significant differences in regard of immune factors in saliva between COPD patients versus the healthy subjects of the same age and gender, who worked at the same facility, with a long-term smoking history.

These differences, first of all, related to the anti-colonization barrier of mucous membranes in the oral cavity ensured by mucin, the level of which in saliva of COPD patients was about half than in the healthy group. It is known that mucin relates to mechanisms of the innate immunity and it is involved in the binding and elimination process of various particles and foreign antigens, thus restricting the access of irritants to the surface of epithelial cells in the respiratory tract, preventing their adhesion<sup>8</sup>. Mucin is also important for ensuring the temperature stability in oral cavity and in the bronchial tree. Decline in mucin production by goblet cells in the mucous membranes may be one of the mechanisms explaining the reduced sputum discharge from the respiratory tract, which is typical for COPD patients<sup>11</sup>. Analysis of the acquired immunity mechanisms showed higher levels of IgA and IgG2 in COPD compared with controls. IgA is the main protective immunoglobulin produced by B-lymphocytes in the mucous-associated lymphoid tissue. The increase of IgG2 may be due to the income from the systemic circulation, due to the enhanced permeability typical of inflammatory processes.

The enhanced level of IgA and IgG2 represent a typical specific response of the mucous-associated lymphoid tissue. It is known that IgA is not capable of activating the complement by the classic pathway, while IgG2 has a weak capability of complement binding, which might explain the lack of the complement activation and the fluctuations in amounts of pro-inflammatory anaphylatoxins (C3a and C5a) observed



vie aeree, ed è principalmente prodotta dalle cellule epiteliali e dai macrofagi<sup>10</sup>. Gli studi di Barnes e Colleghi hanno dimostrato l'importante ruolo degli aumentati livelli di IL-8 nel lavaggio bronco-alveolare nella patogenesi della BPCO<sup>14</sup>. L'IL-8 è un chemo-attraente e promuove la migrazione dei leucociti dal sangue ai tessuti flogosati, oltre alla loro attivazione, che risulta in una accelerata secrezione di fattori pro-infiammatori, facilitando quindi la persistenza dell'infiammazione nelle vie aeree dei pazienti con BPCO. In accordo con questa osservazione, abbiamo trovato nella saliva dei pazienti con BPCO un marcato incremento dei livelli di IL-8 rispetto ai controlli sani. Nei soggetti affetti da BPCO è stata trovata anche un aumento significativo della lattoferrina rispetto ai controlli. La lattoferrina, una proteina di trasporto microbico coinvolta nell'immunità innata, viene prodotta dai neutrofili e rappresenta un fattore di protezione anti-batterica per le membrane mucose<sup>8</sup>. L'aumentata concentrazione dei metaboliti stabili dell'NO nella saliva dei pazienti con BPCO rispetto al gruppo di controllo suggerisce la presenza di aumentato stress ossidativo, il quale gioca un ruolo importante nell'iniziazione ed amplificazione dell'infiammazione e dei processi di distruzione del parenchima polmonare<sup>14</sup>. Un ruolo importante nell'aumento della produzione di NO appartiene alle cellule endoteliali ed ai macrofagi. Alterazioni nel pattern di regolazione nitrossidergica delle citochine possono influenzare significativamente l'espressione e l'attivazione di vari fattori di trascrizione nelle cellule immuni e nelle membrane mucose dell'albero respiratorio<sup>14</sup>.

## CONCLUSIONI

La valutazione non-invasiva della saliva nella BPCO evidenzia un aumento dei fattori immunitari che riflette e condiziona lo stato dell'immunità a livello delle mucose locali. Questi marker potrebbero essere utili nel monitoraggio degli ex fumatori con BPCO e dei fumatori con e senza BPCO. ■

Gli autori non dichiarano alcun conflitto di interesse

**Fonte di finanziamento:** Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, Russia

in COPD. IL-8 is regarded as a marker of airway inflammation severity, and it is mainly produced by epithelial cells and macrophages [10]. Studies by Barnes and Colleagues indicated an important role of the enhanced level of IL-8 in the broncho-alveolar fluid in pathogenesis of COPD<sup>14</sup>. IL-8 is a chemoattractant and promotes the extravasation of leukocytes as well as their activation, which results in an accelerated secretion of pro-inflammatory factors facilitating to persistence of inflammation in the airways of COPD patients. Consistently with this observation, in the saliva of patients with COPD, we found a multifold increase in the level of IL-8 compared with healthy controls. In COPD patients a significant enhancement of lactoferrin in saliva was found in comparison with controls.

Lactoferrin, a transporting microbial protein involved in innate immunity, is produced by neutrophils and represents a factor of anti-bacterial protection for mucous membranes<sup>8</sup>. The increased concentration of NO stable metabolites in the saliva of COPD patients, in comparison with the healthy group, suggests an increased oxidative stress, which plays an important role in initiation and amplification of the inflammation and lung destructive processes<sup>14</sup>. An important role in the enhancement of NO production belongs to endothelial cells and macrophage cells. Alterations in the pattern of cytokine-nitroxidergic regulation might significantly affect the expression and activation of various transcription factors in the immune cells and in the mucous membranes of the respiratory tract<sup>14</sup>.

## CONCLUSIONS

The non-invasive assessment of saliva in COPD reveals the increase of immune factors that reflects the status of local mucosal immunity. These markers may be useful in the follow-up of ex-smokers with COPD and smokers with and without COPD. ■

Authors do not declare any conflict of interest

**Source of funding:** Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, Russia

### Bibliografia

1. Chuchalin A.G. Chronic obstructive lung disease. In: Chuchalin A.G. (ed.). *Chronic obstructive pulmonary diseases*. M: ZAO "BINOM", 1998. p. 11-26 [Russian].
2. Ovcharenko S.I. Current problems of diagnosing chronic obstructive lung disease. In: Ovcharenko S.I., Leshchenko I.V. (ed.). *Russian Medical Journal*, 2003. Vol. 5, p.160-163 [Russian].
3. Staats H.F., McGhee J.R. Application of basic principles of mucosal immunity to vaccine development. In: *Mucosal Vaccines*. Kiyono H., Pgra P.L., McGhee J.R., editors. San Diego: Academic Press, 1996. p. 17-39.
4. Mikryukova J.A., Stepanishcheva L.A., Ignatova G.L., Teplova S.N. Some local markers indices of saliva inflammation in patients with COPD. 14 ERS Annual Congress Glasgow, UK. September 4-8, 2004. P. 62.
5. Di Stefano A., Capelli A., Donner C.F. Role of interleukine-8 in the Pathogenesis and Treatment of COPD. *Chest*, September 1, 2004; 126(3): 676-678.
6. Pavord I.D., Sterk P.J., Hargreave F.E., Kips J.C., Inman M.D., Louis R., Pizzichini M.M.M., Bel E.H., Pin I., Grootendorst D.C., Parameswaran K., Djukanovic R.. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. *Eur Respir J* 2002; 20: 40-43.
7. Abadzi M.A., Lukushkina E.F., Mayanskaya I.V., Tolkacheva I.I. Ashkinazi V.I. Level of cytokines in oral cavity secretion from children with bronchial asthma. *Cytokines and Inflammation* 2002; 1(3), p. 9-15 [Russian].
8. Teplova S.N., Alekseev D.A. Secretory immunity. Chelyabinsk, 2002. p. 143-155 [Russian].
9. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. NHLBI/WHO workshop report. Bethesda, National Heart, Lung and Blood Institute, April 2001; NIH Publication No. 2701: 1-100.
10. Yamamoto C., Yoneda T., Yoshikawa M., Fu A., Tokuyama T., Tsukaguchi K. et al. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*, 1997; 112: 505-10.
11. Korobeinikova E.N., Il'inykh E.I. Quantitative determination of proteins and mucin (glycoproteins) in saliva. *Klin Lab Diagn* 2001; Aug (8): 34-5 [Russian].
12. Belley A. et al. Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60 (4): 10-15.
13. World Health Report 2001. World Health Organization, Geneva: 2001.
14. Barnes P.J. Chronic obstructive pulmonary disease: New treatments for COPD. *Thorax*, 2003. Vol. 58(9). p. 803-808.