

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku  
Angielskim



**Katarzyna Morawska**

**Analiza wybranych parametrów stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego  
w ślinie i krwi pacjentów z autoimmunizacyjnym zapaleniem tarczycy**

Praca na stopień doktora nauk medycznych  
Promotor: Prof. dr hab. n. med. Anna Zalewska  
Promotor pomocniczy dr n. med. Mateusz Maciejczyk

Zakład Stomatologii Zachowawczej  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Białystok 2021

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Promotorowi pracy*

***Pani Prof. dr hab. Annie Zalewskiej,***

*która ma nieoceniony wpływ na mój rozwój naukowy oraz zawodowy.*

*Dziękuję za zaangażowanie, poświęcony mi czas, motywację,*

*ogromną pomoc merytoryczną*

*w trakcie przygotowywanie niniejszej rozprawy,*

*a także za serdeczność i wsparcie.*

*Składam podziękowania **dr n. med. Mateuszowi Maciejczykowi***

*za okazaną pomoc, cenne uwagi i sugestie,*

*które wpłynęły na kształt tej pracy.*

*Katarzyna Morawska*

## Spis treści

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską.....	4
2. Podsumowanie dorobku naukowego.....	5
3. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń.....	6
4. Wstęp.....	8
4.1 Wolne rodniki tlenowe i azotowe, antyoksydanty, stres oksydacyjny.....	8
4.2 Źródła RFT w przebiegu AITD.....	13
5. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską.....	16
5.1 <i>Enhanced salivary and general oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis women in euthyreosis</i> .....	16
5.2 <i>Cytokine/Chemokine/Growth Factor Profiles Contribute to Understanding the Pathogenesis of the Salivary Gland Dysfunction in Euthyroid Hashimoto's Thyroiditis Patients</i> .....	18
6 Streszczenie.....	20
7 Summary.....	24
8 Publikacje stanowiące rozprawę doktorską.....	27
9 Piśmiennictwo.....	57
10 Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu każdego z nich oraz oświadczenie o zgodzie na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej.....	66

## 1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

Prace oryginalne:

1. **Katarzyna Morawska**, Mateusz Maciejczyk, Łukasz Popławski, Anna Popławska-Kita, Adam Krętowski, Anna Zalewska, *Enhanced salivary and general oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis women in euthyrosis*.

Journal Clinical Medicine, 2020, 9, 2102; doi:10.3390/jcm9072102, IF 4,241, MNiSW 140

Udział własny: koncepcja pracy, współwykonywanie części laboratoryjnej, opracowanie i interpretacja wyników, napisanie i przygotowanie artykułu do druku. Udział własny 70%.

2. **Katarzyna Morawska**, Mateusz Maciejczyk, Sara Zięba, Łukasz Popławski, Anna Kita-Popławska, Adam Krętowski, Anna Zalewska, *Cytokine/Chemokine/Growth Factor Profiles Contribute to Understanding the Pathogenesis of the Salivary Gland Dysfunction in Euthyroid Hashimoto's Thyroiditis Patients*.

Mediators and Inflammation 2021, <https://doi.org/10.1155/2021/3192409>, IF 4,711, MNiSW 100

Udział własny: koncepcja pracy, współwykonywanie części laboratoryjnej, opracowanie i interpretacja wyników, napisanie i przygotowanie artykułu do druku. Udział własny 67%.

## 2. Podsumowanie dorobku naukowego

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	MNiSW
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	2	8,952	240
Prace niewłączone do rozprawy doktorskiej	1	3,303	140
Polskie streszczenia zjazdowe	1	-	-
Zagraniczne streszczenia zjazdowe	-	-	-
Skrypt „Endodoncja krok po kroku” współautor	1	-	-
<b>Razem</b>	<b>4</b>	<b>12,255</b>	<b>380</b>

### 3. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

AITD – autoimmunizacyjna choroba tarczycy

Anty- Tg / TG-Ab - przeciwciała skierowane przeciwko tyreoglobulinie

Anty- TPO / TPO-Ab - przeciwciała przeciwko peroksydazie

BMI - body mass index, indeks masy ciała

CAT - katalaza

$\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$  - jony miedzi

DIT – dijonotyrozyna

GPx - peroksydaza glutationowa

GSH – glutation

$\text{HO}_2^{\cdot}$  - rodnik wodorotlenkowy

$\text{H}_2\text{O}_2$  - nadtlenuk wodoru

HT - choroba Hashimoto

ICAM-1 - międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1

IFN –  $\gamma$  - interferon gamma

IL-1 - interleukina 1

IL-6 - interleukina 6

IL-12 - interleukina 12

LOOH - wodoronadtlenek kwasu tłuszczowego

MDA - dialdehyd malonowy

MIT – monojodotyrozyna

NADPH - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NO – tlenek azotu

NWS - ślina niestymulowana

$\text{O}_2$  - tlen singletowy

$^1\text{O}_2$  – tlen singletowy

$O_2^{\bullet}$  - anionorodnik ponadtlenkowy

$O_3$  - ozon

$\bullet OH$  - rodnik hydroksylowy

$ONOO^-$  - nadtlenoazotyn, peroksynitryt

OS - stres oksydacyjny

UA - kwas moczowy

USG – ultrasonografia

Px - peroksydaza ślinowa

RFT - reaktywne formy tlenu

$SCN^-$  - jon tiocyjankowy

SOD1 - dysmutaza 1, miedziowo-cynkowa

SOD2 - dysmutaza 2, dysmutaza manganowa

SOD3 - dysmutaza ponadtlenkowa

SS - zespół Sjögrena

SWS - ślina stymulowana

T3 - trijodotyronina

T4 - tetrajodotyronina (tyroksyna)

TAS/TAC - całkowita pojemność antyoksydacyjna

Tg - tyreoglobulina

TNF - czynnik martwicy nowotworów

TNF- $\alpha$  - czynnik martwicy nowotworów - alfa

TPO - peroksydaza tarczycowa

TSH - hormon tyreotropowy, tyreotropina

TSH-R przeciwciała przeciwko receptorowi TSH

## 4. Wstęp

Autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy (AITD), inaczej choroba Hashimoto, jest chorobą autoimmunologiczną charakteryzującą się naciekiem zapalnym miększu gruczołu tarczowego. AITD jest jedną z najczęstszych chorób autoimmunizacyjnych, częstszą wśród kobiet po 40-50 roku życia, choć zdarzają się przypadki choroby wśród dzieci i młodzieży (1, 2). Autoimmunizacyjnemu zapaleniu tarczycy często towarzyszy stan jej niedoczynności na skutek zniszczenia lub włóknistego zwyrodnienia tkanki gruczołowej. Należy zaznaczyć, że częste są przypadki pacjentów w stanie eutyreozy, jak i w stanie nadczynności tarczycy, co oczywiście zależy od nasilenia stanu zapalnego gruczołu tarczowego (3). U chorych z AITD, tak jak w przypadku każdej z chorób autoimmunizacyjnych, występują autoprzeciwciała: przeciwko tyreoglobulinie (Anty- Tg) i/lub przeciwko tyreoperoksydazie (Anty- TPO) (4). Tg jest glikoproteiną, która jest związana z przechowywaniem hormonów tarczycy w komórkach pęcherzykowych. TPO jest enzymem transbłonowym, występuje w postaci dimeru na szczytach komórek w pęcherzykach tarczycy. Jego główną rolą jest udział w syntezie hormonów tarczycy przez katalizowanie utleniania jodu, jodowanie reszt tyrozyny i sprzęganie jodotyrozyny (MIT – monojodotyrozyny oraz DIT – diiodotyrozyny) w trijodotyroninę ( $T_3$ ) i tetrajodotyroninę ( $T_4$  – tyroksynę). U niektórych pacjentów stwierdza się także obecność przeciwciał przeciwko receptorowi TSH (TSH-R) (5). Przeciwciała przeciwko  $T_4$  i  $T_3$  występują w 15-35% przypadków (6). Anty- TPO powodują niszczenie tyreocytów, a także odgrywają istotną rolę w inicjacji, przebiegu oraz diagnozie AITD. Rozpoznanie AITD opiera się na badaniu ultrasonograficznym, jak również na serologicznym zaprezentowaniu obecności podwyższonego miana przeciwciał, głównie anty TG/ anty-TPO.

### 4.1. Wolne rodniki tlenowe i azotowe, antyoksydanty, stres oksydacyjny

Inny mechanizm patofizjologiczny AITD nawiązuje do reaktywnych form tlenu (RFT) i stresu oksydacyjnego (OS).

Co to są wolne rodniki tlenowe/azotowe?

Tlen cząsteczkowy jest utleniaczem, wchodząc w reakcje ze związkami organicznymi, utlenia je odbierając im elektrony. Sam zaś ulega redukcji. Redukcja tlenu wiąże się z przyłączeniem do cząsteczki czterech elektronów i czterech protonów. Reakcja ta prowadzi do wytworzenia 2 cząsteczek wody. Niestety, cząsteczka tlenu tylko w 90% ulega redukcji według przedstawionego schematu. Pozostałe 10% tlenu nie zostaje w pełni zredukowanych, co prowadzi do powstania molekuł znanych jako RFT. RFT to atomy lub cząsteczki zdolne do samodzielnej egzystencji (7, 8). Większość z nich posiada co najmniej 1 niesparowany elektron na orbicie walencyjnej. Dlatego też, reaktywne formy tlenu występują zarówno w formie wolnorodnikowej, jak i nierodnikowej (9). Formy wolnorodnikowe RFT są wysoce reaktywne. Dążąc do pozbycia się wolnych elektronów, wchodzą w reakcje z innymi



cząsteczkami (10, 11). W sytuacji, gdy wolne rodniki uwszólniają swoje niesparowane elektrony dochodzi do powstania cząsteczki niebędącej wolnym rodnikiem (12).

Do nierodnikowych aktywnych metabolitów tlenu zaliczamy: tlen singletowy ( $^1\text{O}_2$ ), ozon ( $\text{O}_3$ ), nadtlenuk wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), chloraminy (10, 11, 13-18).

Do form wolnorodnikowych RFT należą: anionorodnik ponadtlenukowy ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), rodnik wodorotlenkowy ( $\text{HO}_2^{\cdot-}$ ) i rodnik hydroksylowy ( $\cdot\text{OH}$ ).  $\text{O}_2^{\cdot-}$  będąc prekursorem pozostałych RFT zapoczątkowuje kaskadę reakcji prowadzących w sprzyjających warunkach do rozwoju OS. Addycja elektronu do anionorodnika ponadtlenukowego ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) lub 2 elektronów do cząsteczki tlenu generuje tworzenie  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$  nie jest aż tak reaktywny jak pozostałe wolne rodniki tlenowe, jednak jest bardziej aktywny od tlenu cząsteczkowego. W obojętnym pH, wykazuje ogromne powinowactwo do grup tiolowych, indolowych, imidazolowych, fenolowych, tioestrowych i metionylowych aminokwasów, co prowadzi do oksydacyjnych modyfikacji łańcuchów białkowych i uraty funkcji biologicznych zmodyfikowanych białek (19, 20). Co ciekawe,  $\text{H}_2\text{O}_2$  dyfunduje przez błony biologiczne, a więc łatwo przedostaje się do odległych miejsc w komórce. Jego szkodliwe działanie ulega spotęgowaniu w obecności histydyny, jak również jonów żelaza, miedzi, kobaltu, niklu, manganu i chromu. W obecności wymienionych metali przejściowych  $\text{H}_2\text{O}_2$  wchodzi w tzw. reakcję Fentona prowadzącą do wytworzenia rodnika hydroksylowego ( $\cdot\text{OH}$ ). Histydyna tworzy kompleksy z metalami katalizującymi reakcję Fentona (20). Wspomniany  $\cdot\text{OH}$  jest jednym z najbardziej reaktywnych utleniaczy, co pozwala mu na reakcję ze wszystkimi cząsteczkami obecnymi w organizmie. Niestety, jest to jeden z nielicznych wolnych rodników tlenowych w stosunku do którego organizm ludzki nie posiada systemów neutralizujących (9). Jeżeli w środowisku znajdują się jony chloru,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ulega przekształceniu w kwas podchlorawy. Ten ostatni reaguje szczególnie łatwo ze związkami zawierającymi wolne grupy aminowe z wytworzeniem pochodnych azotowo-chlorowych typu monochloramin i dichloramin, będących utleniaczami. Kwas podchlorawy utlenia grupy disiarczkowe białek i glutationu (GSH), centra żelazowo-siarkowe białek, jak również jony żelaza w białkach hemowych. Reaguje z resztami nienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów i z cholesterolem, co wpływa na strukturę błon komórkowych. Podobne właściwości wykazują kwas podbromawy i kwas podjodawy (21-24). Reakcje RFT ze związkami organicznymi prowadzą do wytworzenia rodnika alkoksylogowego, nadtlenukowego oraz rodnika i anionorodnika semichinonowego, jak również związków nie będących RFT: kwasu chlorowego(I), bromowego (I), jodowego(I) oraz rodników ferrylogowego nadferrylogowego.

Nie można nie wspomnieć o tlenku azotu (NO) i nadtlenukazyocie. NO jest wolnym rodnikiem, ma nieparzystą liczbę elektronów walencyjnych, co warunkuje jego reaktywność chemiczną i biologiczną. NO wchodzi w reakcję z białkami, głównie posiadającymi centra żelazowo-siarkowe, jony metali przejściowych i grupy hemowe. NO może uwalniać żelazo z ferrytyny, co także sprzyja reakcji

Fentona (25). NO jest bardzo nietrwały, a w obecności tlenu jego okres półtrwania wynosi zaledwie kilka sekund. Reagując z anionorodnikiem ponadtlennym wytwarza nadtlenoazotyn, który nie jest wolnym rodnikiem, ale ma bardzo silne właściwości utleniające. Nadtlenoazotyn ma szczególne powinowactwo do grup disiarczkowych białek i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (26). Hamuje działanie oksydazy cytochromowej i innych enzymów łańcucha oddechowego. Hamuje także aktywność akonitazy, kluczowego enzymu cyklu Krebsa (27).

Należy wspomnieć, że 90% wymienionych reaktywnych form tlenu powstaje przy współudziale mitochondrialnego łańcucha oddechowego (28). Pozostałe 10 % generowane jest przez oksydazę NADPH, oksydazę ksantynową lub oksydazę L-aminokwasową w trakcie reakcji zachodzących w pozostałych przedziałach komórkowych (29). Inne egzogenne źródła RFT obejmują: promieniowanie jonizujące, ultradźwięki, podwyższoną temperaturę ciała/otoczenia, leki i produkty ich metabolizmu (10, 30-32).

Oczywiście, organizm ludzki nie jest bezbronny w aspekcie zwalczania RFT. Pierwszą linią obrony jest niedopuszczanie do reakcji pomiędzy RFT a składnikami komórek. Kolejną - przerwanie wolnorodnikowych i nierodnikowych reakcji utleniania. Eliminacja oksydacyjnych uszkodzeń składników komórki jest natomiast końcowym mechanizmem ochrony organizmu (33). Wyróżniamy antyoksydanty enzymatyczne i nieenzymatyczne. Ze względu na zakres prezentowanych badań tylko omówię niektóre z nich.

W organizmie człowieka występują 3 rodzaje dysmutaz ponadtlennych. W cytoplazmie aktywny jest enzym zawierającym w centrum aktywnym miedź i cynk (SOD1, dysmutaza 1, miedziowo-cynkowa), w macierzy mitochondrialnej występuje dysmutaza zawierająca mangan (SOD2, dysmutaza 2, dysmutaza manganowa), a w przestrzeni pozakomórkowej znajdujemy pozakomórkową dysmutazę ponadtlenną (SOD3). Generalnie wszystkie wymienione formy dysmutaz katalizują reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlennego i co warto podkreślić, są te jedyne enzymy zdolne neutralizować anionorodnik ponadtlenny. Powstały  $H_2O_2$  jest następnie redukowany przy udziale enzymów z rodziny peroksydaz (34, 35). Redukując  $H_2O_2$  peroksydaza ślinowa (Px) katalizuje reakcję utlenienia jonu tiocyjankowego, z wytworzeniem kwasu podtiocyjanowego i anionu podtiocyjanowego oraz jonu tiocyjankowego, produktu utleniania  $SCN^-$  i tiocyjanogenu. Wymienione produkty reakcji mają wybitne działanie bakteriobójcze (36).

Organizm ludzki zawiera ponadto peroksydazę glutationową (GPx), która katalizuje reakcję pomiędzy glutationem zredukowanym (GSH) a  $H_2O_2$ . Wynikiem tej reakcji jest powstawanie utlenionej formy glutationu. Ten ostatni związek jest toksyczny dla komórki, gdyż utlenia grupy tiolowe białek, prowadząc do ich inaktywacji. Dlatego też, utleniony glutation jest szybko przekształcany w formę zredukowaną przy udziale reduktazy glutationu (37). Kolejną grupą enzymów zaangażowanych w reakcję dysproporcjonowaną  $H_2O_2$  jest rodzina katalaz (CAT). Stężenie  $H_2O_2$  determinuje rodzaj

aktywności CAT. Przy wysokim stężeniu  $H_2O_2$ , przewagę zyskuje aktywność katalazowa, zaś przy niskim stężeniu nadtlenu wodoru katalaza zachowuje się jak peroksydaza (inaktywacja  $H_2O_2$  zachodzi przy udziale wspomnianej GPx) (38-40). GPx wykazuje znacznie większe powinowactwo do  $H_2O_2$  niż CAT, dlatego ten ostatni enzym jest niezmiernie istotny przy niskich stężeniach  $H_2O_2$  (41-44).

Jednym z ważniejszych antyoksydantów nieenzymatycznych jest wspomniany już GSH, a ściślej ujmując system glutationu. System ten składa się z GSH i enzymów włączonych w jego komórkowe przemiany: ligazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej, syntetazy glutationu, peroksydazy glutationu, S-transferazy glutationu i glutararedoksyny. W skład systemu wchodzi również reduktaza glutationu i glutation utleniony (45, 46). Główną funkcją GSH jest utrzymanie grup disiarczkowych białek w stanie zredukowanym, co jest fundamentalne dla biologicznych właściwości białek. Ponadto GSH unieczynnia RFT, regeneruje  $\alpha$ - tokoferol i witaminę C (45, 46).

Kwas moczowy (UA) powstaje z hipoksantyny przy udziale oksydazy ksantynowej (47). Jego głównym działaniem antyoksydacyjnym jest wychwyt  $\cdot OH$ , nadtlenuków lipidowych (LOOH) i  $^1O_2$ . UA nie unieczynnia  $O_2\cdot$  (48). UA spowalnia reakcje wolnorodnikowe i stabilizuje zredukowaną formę askorbinianu. W obecności witaminy C, UA działa protekcyjnie na błony komórkowe zapobiegając utlenieniu budujących je kwasów tłuszczowych. Efekty antyoksydacyjne UA ulegają zmniejszeniu w środowisku dwuwęglanów (34, 49). UA jest unieczynniany przez duże stężenia RFT i ONOO $\cdot$ . Wysokie stężenia UA, zwłaszcza jeżeli w środowisku obecne są jony  $Cu^+/Cu^{2+}$  sprawiają, iż kwas moczowy sprzyja peroksydacji lipidów, czyli przesuwając równowagę redoks w kierunku utleniania (50, 51).

Antyoksydanty wzajemnie się uzupełniają i współpracują w procesie neutralizowania RFT. Całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAS/TAC) to wartość odzwierciedlająca potencjał przeciwutleniający badanego materiału. Jest to uproszczona analiza „mocy” wszystkich antyoksydantów bez względu na ich pochodzenie czy mechanizm działania. TAS/TAC nie pozwala jednak oszacować mechanizmu działania antyoksydacyjnego, ale ułatwia ocenić wydolności komórek/tkanek/narządów w zapobieganiu OS (49, 52).

Zachwianie równowagi pomiędzy aktywnością/stężeniem systemów antyoksydacyjnych a stężeniem RFT i przesunięcie jej w kierunku reakcji utleniania prowadzi do sytuacji zwanej stresem oksydacyjnym (OS). Niezneutralizowane RFT mogą uszkadzać wszystkie elementy komórkowe: białka, lipidy, węglowodany i materiał genetyczny, prowadząc do nieodwracalnych zmian w funkcjonowaniu komórki, a ostatecznie do jej całkowitego uszkodzenia.

Peroksydacja lipidów jest wolnorodnikowym procesem utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych i innych lipidów. Składa się z 3 etapów. Inicjacja peroksydacji to nic innego jak oderwanie atomu wodoru od cząsteczki zwykle wielonienasyconego kwasu tłuszczowego lub jego reszty będącej fragmentem fosfolipidu. Proces ten inicjowany jest przez ozon, NO, ditlenek azotu i

siarki (53). Odłączeniu ulega najczęściej atom wodoru połączony z węglem pomiędzy wiązaniami podwójnymi. Inicjacja prowadzi do wytworzenia wolnego rodnika alkilowego z 1 niesparowanym elektronem. W rodniku alkilowym następuje przegrupowanie wiązań podwójnych z wytworzeniem wiązania sprzężonego, wiązania nie występującego naturalnie w lipidach. W kolejnej fazie, tzw. propagacji, rodniki alkilowe wchodzą w reakcję z tlenem, której produktem są rodniki nadtlencowe. Te ostatnie odrywają atomy wodoru od nieuszkodzonych cząsteczek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co prowadzi do powstania nadtlenu kwasu tłuszczowego. Ten cykl reakcji może zachodzić wiele razy, aż do momentu reakcji terminacji. Terminacja jest wynikiem oddziaływania między wolnymi rodnikami tlenowymi prowadzącego do powstania cząsteczki niebędącej wolnym rodnikiem. Produktami terminacji są dimery kwasów tłuszczowych oraz okso- i hydroksy kwasy tłuszczowe. W komórkach proces peroksydacji ma miejsce w błonach komórkowych, gdzie obecne są białka (54). Wolne rodniki tłuszczowe mogą więc reagować z białkami błonowymi, doprowadzając do powstania wolnych rodników białkowych. Należy również wspomnieć o tzw. zjawisku reinicjacji polegającym na rozkładzie nierodnikowych produktów peroksydacji z wytworzeniem wolnych rodników. Proces taki inicjowany jest przez jony metali przejściowych, głównie żelazo i miedź (53). Ulegając dalszym przemianom zachodzącym drogą np.  $\beta$ -eliminacji, produkty oksydacji rozpadają się z wytworzeniem kilkunastowęglowych produktów. Jednym z nich jest dialdehyd malonowy (MDA) czy 4-hydroksynonenal (55).

Powyżej przedstawiony schemat peroksydacji to peroksydacja nieenzymatyczna. Enzymatyczna peroksydacja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych prowadzi do generowania grupy związków z rodziny prostoglandyn, tromboksanów i leukotrienów (56). Lipooksygenazy generują wodoronadtlenki lipidowe. Z kolei fosfolipaza A<sub>2</sub> dostarcza wolnych kwasów tłuszczowych (57). Enzymatyczna forma peroksydacji inicjowana jest odłączeniem wodoru będącego częścią grupy metylenowej wielonienasyconego kwasu tłuszczowego. Generowany jest w ten sposób rodnik alkilowy. Następnie rearanzacji ulega przyłączenie elektronu wewnątrz łańcucha węglowego wielonienasyconego kwasu tłuszczowego. Powstaje nadtlenek kwasu tłuszczowego. Ostatecznie dochodzi do wbudowania tlenu cząsteczkowego i wygenerowania rodnika nadtlencowego. Rodnik nadtlencowy redukuje się do anionu, co kończy proces generowania wodorotlenków. To ostatnie zjawisko, tj. wytworzenie anionu, odróżnia peroksydację enzymatyczną od nieenzymatycznej (58).

Produkty peroksydacji lipidów są mniej reaktywne niż RFT dzięki czemu dyfundują na znaczne odległości w komórce. Aldehydy reagują z grupami disiarczkowymi białek oraz z grupami aminowymi lipidów, białek, aminocukrów i materiału genetycznego. Produkty peroksydacji lipidów zaburzają także funkcjonowanie błon komórkowych. Obecność naładowanych elektrycznie grup nadtlencowych, ketonowych, aldehydowych i hydroksylowych pomiędzy cząsteczkami fosfolipidów redukuje

hydrofobowość lipidowego wnętrza błon i dezintegruje budowę dwuwarstwy. Zmiany te zwiększają przepuszczalność błon dla substancji polarnych, które w normalnych warunkach nie przenikają do wnętrza komórek. Peroksydacja lipidów depolaryzuje również błony komórkowe oraz zmienia ich asymetrię. Skutkuje to ekspozycją fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni błony. Ponadto wykazano, że peroksydacja lipidów hamuje aktywność enzymów błonowych i białek transportujących, jak również rozpręża fosforylację oksydacyjną w mitochondriach. Zaburzona zostaje budowa receptorów błonowych, jak również powinowactwo receptorów i determinant antygenowych. Skutkiem tych ostatnich jest uwolnienie enzymów lizosomalnych i śmierć komórki (7, 10, 59-63)

RFT reagując z białkami zmieniają budowę reszt aminokwasowych i grup prostetycznych oraz prowadzą do agregacji i fragmentacji łańcuchów białkowych. Najsilniejszym modyfikatorem reszt aminokwasowych jest głównie  $\cdot\text{OH}$ , za utlenianie grup disiarczkowych odpowiadają natomiast  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2^-$ . RFT mogą także reagować z jonami metali w metaloproteinach. Kwas podchlorawy i nadtlenoazotyn mogą natomiast utleniać grupy metionylowe i tiolowe białek (64, 65). Wrażliwe na uszkodzenia oksydacyjne są, oprócz reszt cysteiny i metioniny, reszty lizyny, proliny, histydyny, tryptofanu, fenyloalaniny, tyrozyny i argininy. Uszkodzenia oksydacyjne skutkują szybką utratą biologicznej aktywności białka. Oksydacyjnie zmodyfikowane aminokwasy mogą zapoczątkowywać cykl reakcji, których produktem są nowe rodniki. Utlenione aminokwasy mogą również tworzyć wiązania kowalencyjne z DNA (61, 62, 66).

Kwasy nukleinowe są najmniej podatne na oksydacyjne uszkodzenia, ich biologicznym zadaniem jest przechowywanie i duplikacja materiału genetycznego.  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2^-$  nie powodują oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych będących składową RNA i DNA. Dopiero reakcje  $\cdot\text{OH}$  i tlenu singletowego z kwasami nukleinowymi uszkadzają zasady nukleinowe, reszty cukrowe lub skutkują zniszczeniem wiązań fosfodiesterowych pomiędzy nukleotydami. Najbardziej podatne na działanie RFT są reszty tymidyny, która ulegając modyfikacji tworzy wolne rodniki/nadtlenki reszt tymidynylowych. Zmienione oksydacyjnie zasady azotowe: 8-hydroksyguanina, dipirymidynowe addukty adeniny i guaniny, glikol tyminy generują w DNA mutacje punktowe (60, 67). Mutacje te wpływają negatywnie na wzrost, podział, różnicowanie i dojrzewanie komórek oraz adhezję międzykomórkową. Stanowią jeden z możliwych mechanizmów inicjacji transformacji nowotworowej (68, 69). DNA zmodyfikowany przez RFT jest silnie immunogeny, co może prowadzić do chorób z autoimmunoagresji (70).

#### **4.2. Źródła RFT w przebiegu AITD**

Badania wykazują, że zarówno limfocyty CD4, jak i CD8 są niezbędne do inicjacji procesów patologicznych zachodzących w przebiegu AITD. Jakkolwiek jedynie CD4 odpowiadają za jej

przewlekły przebieg (71). Dane literaturowe wskazują, że naciekające tkankę gruczołową pobudzone limfocyty CD4 i CD8, uwalniając IL-1, TNF,  $\gamma$ -IFN mogą być przyczyną nadmiernej produkcji wolnych rodników tlenowych. RFT wytwarzane są również przy udziale oksydazy NADPH pochodzącej z pobudzonych komórek fagocytarnych. Fizjologicznie, RFT (głównie  $H_2O_2$ ) powstają w procesie syntezy hormonów tarczycy.  $H_2O_2$  wytwarzany jest podczas utleniania jodu i jego przyłączenia do rdzenia białkowego, następnie sam ulega deaktywacji przy udziale GPx. Niestety, jak wykazują badania, AITD współistnieje z niedoborem selenu, kluczowego pierwiastka dla funkcjonowania wyżej wymienionych enzymów, i nadmiarem spożywanego jodu (72, 73). Sytuacja taka skutkuje generowaniem nadmiernych ilości  $H_2O_2$ , które nie ulegają neutralizacji. Dobrze wiadomo, że nadprodukcja  $H_2O_2$  jest destrukcyjna dla komórek tarczycy. Związek ten zapoczątkowuje niszczenie tyreocytów na drodze apoptozy lub nekrozy (74). Co więcej RFT ( $H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot-}$ ) stymulują gen promotorowy cząsteczki ICAM-1 (międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1) w tyreocytach (75). ICAM-1 odgrywa kluczową rolę we wczesnych stanach odpowiedzi zapalnej zwiększając migrację komórek jednojądrzastych w kierunku tarczycy (3). Inny mechanizm prowadzący do nadmiernej produkcji RFT w niedoczynnej tkance gruczołowej tarczycy związany jest z niedoborem enzymów antyoksydacyjnych (76). Deficyt antyoksydacyjny z jednej strony może być powodowany przez zużycie enzymów w procesie neutralizacji RFT, niedobór ich kofaktorów (np. selenu w przypadku GPx) bądź być wynikiem oksydacyjnych modyfikacji ich łańcuchów białkowych. Z drugiej strony może również wynikać z niedoboru T3 (24, 77). W stężeniach fizjologicznych T3 wykazuje działanie anaboliczne, sprzyja więc biosyntezie białek, w tym również o charakterze antyoksydacyjnym (78). AITD jest ponadto związany z istotnym obniżeniem stężenia antyoksydantów nieenzymatycznych, takich jak  $\alpha$ -tokoferol czy koenzym Q (24). Co ciekawe, hormony tarczycy same w sobie mogą także zachowywać się jak cząsteczki utleniające. Wykazano, iż są w stanie wywołać oksydacyjne uszkodzenie DNA, prawdopodobnie poprzez swoje grupy fenolowe (79). Wiadomo ponadto, iż TSH bezpośrednio indukuje wydzielanie TNF- $\alpha$  przez komórki szpiku kostnego (80) oraz IL-6 przez adipocyty (81), co w przypadku podwyższonego stężenia TSH (częste w AITD) prowadzi do rozwoju stanu zapalnego (82). TNF- $\alpha$  jest kluczową cytokiną kontrolującą wydzielanie NO, a podwyższone stężenia TNF- $\alpha$  mogą promować ekspresję indukowalnej syntazy NO, prowadząc do zwiększonego stresu nitrozacyjnego (82). Dowody naukowe wskazują na redukcję potencjału antyoksydacyjnego i nasilony OS w osoczu pacjentów z AITD. Lassoued i wspólnicy (83) wykazali zwiększone stężenie MDA w osoczu oraz zredukowaną aktywność SOD i CAT w porównaniu z grupą kontrolną. Rostami i wspólnicy (84) zaobserwowali zmniejszenie stężenia GSH w osoczu pacjentów z nowo rozpoznaną niedoczynnością tarczycy na tle AITD w porównaniu do grupy kontrolnej. Autorzy sugerują nawet, że niedobór GSH inicjuje OS i rozwój nietolerancji immunologicznej w przebiegu AITD. Ates i wspólnicy (85) argumentowali, że wyższy poziom OS u pacjentów z progresją jawnej niedoczynności tarczycy u

pacjentów z AITD może służyć jako istotny czynnik w inicjacji i progresji tej choroby. Co ciekawe, w badaniu przeprowadzonym przez Nandę i współpr. (86) poziom OS był wyższy w grupie z niedoczynnością tarczycy z dodatnim przeciwciałem tarczycowym niż w grupie z niedoczynnością tarczycy bez przeciwciał tarczycowych. Autorzy doszli do wniosku, że obecność przeciwciał anty- TG, anty- TPO jest kluczowym czynnikiem wzmożonej produkcji RFT i zwiększonych stężeń oksydacyjnych modyfikacji białek, podczas gdy stężenia hormonów tarczycy mają drugorzędne znaczenie.

Ogólnoustrojowe stany zapalne, podwyższony poziom przeciwciał tarczycowych, zaburzone stężenie hormonów tarczycy i chronicznie podwyższone poziomy RFT w przebiegu AITD prowadzą do licznych powikłań ogólnoustrojowych. Nieliczne co prawda publikacje naukowe wskazują także na zaburzenie funkcji gruczołów ślinowych w przebiegu tej choroby autoimmunologicznej (4, 87, 88), co biorąc pod uwagę rolę śliny dla zachowania zdrowia jamy ustnej ma pierwszorzędowe znaczenie dla pacjentów i lekarzy stomatologów. Niedobór ilościowy i jakościowy śliny jest dużym problemem dla pacjenta, tym bardziej, w sytuacji współistnienia innych objawów choroby podstawowej. Powszechnie obserwowane objawy związane z dysfunkcją ślinianek to: pobruzdowany, zaczerwieniony i bolesny język, atroficzna, wysuszona błona śluzowa jamy ustnej, i nasiloną próchnicę głównie w rejonie przyszyjkowym zębów (89, 90). Pacjenci zgłaszają problemy z przełykaniem kęsów pożywienia, niemożnością spożywania pokarmów o wyrazistym smaku i problemy z fonacją (91). Agha-Hosseini i wsp. (92) wykazał, że funkcja wydzielnicza gruczołów podżuchwowych wśród kobiet z HT jest upośledzona, co manifestuje się istotnie zredukowanym tempem wydzielania śliny niestymulowanej. Po uzyskaniu hormonalnej eutyreozy wyniki badań sialometrycznych ulegały normalizacji, chociaż ilość wydzielanej śliny pozostawała istotnie niższa niż w grupie pacjentów bez choroby autoimmunizacyjnej tarczycy. Za pomocą obiektywnej i ilościowej scyntygrafii ślinowej stwierdzono znamienne obniżoną czynność sekrecyjną gruczołów ślinowych u pacjentów z HT z kserostomią (subiektywne odczucie suchości) w porównaniu z pacjentami z HT bez kserostomii i osobami zdrowymi z kserostomią lub bez niej (87, 93). Syed i wsp. (94) przekonują, że kliniczne podejrzenie chorób tarczycy powinno być brane pod uwagę, gdy występuje przewlekłe zmniejszenie wydzielania śliny; dlatego też sugerują wykonanie profilu tarczycy (hormony, przeciwciała) jeśli wykluczono inne przyczyny hiposaliwacji. Nieprawidłowości zarówno w składzie, jak i ilości wydzielanej śliny wpływają negatywnie na zdrowie jamy ustnej i kondycję całego organizmu. Dlatego ważne jest poznanie mechanizmów prowadzących do dysfunkcji gruczołów ślinowych w przebiegu opisywanej choroby.

## 5. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską

### Publikacja 1.

#### 5.1 *Enhanced salivary and general oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis women in euthyrosis.*

*Journal Clinical Medicine, 2020, 9, 2102; doi:10.3390/jcm9072102, IF 4,241, MNiSW 140*

**Katarzyna Morawska, Mateusz Maciejczyk, Łukasz Popławski, Anna Popławska-Kita, Adam Krętowski, Anna Zalewska**

Przyczyna dysfunkcji gruczołów ślinowych w przebiegu AITD nie została jeszcze jednak wyjaśniona. Na uwagę zasługuje zaobserwowanie dysfunkcji gruczołów ślinowych u pacjentów w eutyrozie. Wcześniejsze badania wykazały zaburzenia bariery antyoksydacyjnej śliny oraz udział OS w rozwoju i progresji dysfunkcji gruczołów ślinowych w przebiegu innych chorób autoimmunologicznych: łuszczycy zwyczajnej, twardziny układowej, reumatoidalnego zapalenia stawów, cukrzycy typu 1, stwardnienia rozsianego, zespołu Sjögrena oraz toczenia rumieniowatego układowego (91, 95-97). Ogólnie rzecz biorąc, w ślinie pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi obserwuje się obniżony/podwyższony poziom endogennych, nieenzymatycznych antyoksydantów lub zwiększoną/osłabioną aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz nasiloną oksydacyjną modyfikację składników komórek gruczołów ślinowych.

Celem pracy była ocena parametrów obrony antyoksydacyjnej oraz mierzalnych skutków stresu oksydacyjnego w ślinie niestymulowanej i stymulowanej oraz osoczu/erytrocytach pacjentów z AITD w stanie eutyrozy, jak również porównanie uzyskanych wyników z osobami zdrowymi (kontrola).

Na badania uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej w Białymstoku (R-I-002/386/2016). Wszyscy uczestnicy badania zostali poinformowani o ich celu oraz wyrazili pisemną zgodę.

Grupa badana składała się z 45 kobiet z rozpoznaniem AITD. Chorobę potwierdzono, gdy stężenie anti-TG i/lub anti-TPO w surowicy przekraczało normę i występowało z niejednorodnością miększu gruczołu tarczowego w badaniu USG. W grupie badanej znalazły się jedynie pacjentki z AITD w stanie eutyrozy [wolna tyroksyna (fT4) i hormon tyreotropowy (TSH) w normie], w tym 24 leczone Eutyroxem (dawki od 50 do 150 mg; ostatnia tabletką przyjmowana 24 godziny przed badaniem poziomu hormonów) i 21 nieleczonych. Pacjenci zgłaszali się na wizyty kontrolne do Kliniki Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Postanowiliśmy stworzyć tylko jedną grupę, ponieważ wyniki poszczególnych testów równowagi redoks nie różniły się między pacjentami w trakcie terapii hormonalnej a tymi, którzy jej nie wymagali.

Grupę referencyjną stanowiło 45 kobiet ogólnie zdrowych, dopasowanych do grupy badanej pod względem wieku i BMI, wybranych spośród tych, które zgłosiły się na wizyty kontrolne do Zakładu



Stomatologii Zachowawczej UMB. Uczestniczki grupy kontrolnej miały prawidłowy wynik badania USG tarczycy, jak również stężenie TPO-Ab, TG-Ab, fT4 i TSH we krwi w normie dla osób zdrowych.

Kryteria włączenia i wyłączenia do badań i dokładna metodyka badawcza zostały przedstawione w publikacji 1 będącej podstawą mojej dysertacji.

Wykazałam, że wydzielanie śliny niestymulowanej (NWS) było istotnie niższe u pacjentów z AITD w porównaniu ze zdrowymi osobami z grupy kontrolnej, podobnie jak aktywność amylazy ślinowej w NWS i ślinie stymulowanej (SWS). Aktywność CAT i Px była istotnie wyższa w NWS i SWS pacjentów z AITD, natomiast stężenia GSH i UA były istotnie niższe w porównaniu z osobami zdrowymi. Całkowity potencjał antyoksydacyjny był znacząco niższy, podczas gdy całkowity status oksydacyjny i poziom produktów utleniania białek (końcowe produkty zaawansowanej glikacji, zaawansowane produkty utleniania białek) i lipidów (MDA, wodoronadtlenki lipidów) były znacznie wyższe w NWS, SWS i osoczu pacjentów z AITD w porównaniu do grupy kontrolnej. Dokładny opis wyników znajduje się w publikacji 1 będącej podstawą mojej dysertacji.

## **Wnioski**

1. Ślinianki przyuszne i podżuchwowe u pacjentek z AITD w stanie eutyreozy cechowały się upośledzoną zdolnością do utrzymania równowagi redoks na poziomie obserwowanym w śliniankach kobiet kontrolnych.

2. Ślina pacjentek z AITD w eutyreozie wykazywała zmniejszony potencjał antyoksydacyjny. Co więcej, istotny wzrost stężenia zmodyfikowanych oksydacyjnie biomolekuł w NWS i SWS sugeruje niewydolność bariery antyoksydacyjnej ślinianek w zwalczaniu nadmiernej produkcji RFT.

3. OS w NWS i SWS kobiet z AITD wydaje się być ściśle związany z zapaleniem w przebiegu autoimmunizacji, a nie ze stężeniem hormonów tarczycy czy TSH.

4. Funkcja wydzielnicza ślinianek podżuchwowych u pacjentek z AITD w stanie eutyreozy jest zmniejszona, co objawia się istotnym zmniejszeniem niestymulowanego wydzielania śliny.

## **Publikacja 2.**

### ***5.2 Cytokine/Chemokine/Growth Factor Profiles Contribute to Understanding the Pathogenesis of the Salivary Gland Dysfunction in Euthyroid Hashimoto's Thyroiditis Patients***

***Mediators and Inflammation 2021, <https://doi.org/10.1155/2021/3192409>, IF 4,711, MNiSW 100***

**Katarzyna Morawska, Mateusz Maciejczyk, Sara Zięba, Łukasz Popławski, Anna Kita-Popławska, Adam Krętowski, Anna Zalewska**

Podobieństwo na podłożu genetycznym i immunopatologicznym pomiędzy zespołem Sjögrena (SS) i AITD (98-100) sugeruje, że zaburzenia sekrecyjnej (wydzielniczej) funkcji ślinianek przez analogię do SS, mogą mieć podłoże immunologiczne i być następstwem zaburzeń wydzielania cytokin, chemokin i czynników wzrostowych. Tym bardziej, że dochodzi do zmniejszenia rozmiarów i wzrostu nacieku zapalnego w gruczołach ślinowych myszy (bez genu kodującego sulfotransferazę tyrosulproteinową) z niedoczynnością tarczycy na tle autoimmunologicznego zapalenia (101).

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej w Białymstoku (R-I-002/386/2016). Każdy z pacjentów i uczestników grupy kontrolnej został poinformowany o celach i metodologii obecnego eksperymentu i wyraził pisemną zgodę na udział w badaniach.

Grupę badaną stanowiło 25 pacjentek z rozpoznaną chorobą Hashimoto. Rozpoznanie choroby oparte było na pozytywnym wyniku badania USG i stwierdzeniu we krwi stężenia przeciwciał TPO-Ab, TG-Ab powyżej normy laboratoryjnej. Wyodrębnione pacjentki były to kobiety z AITD w stanie eutyrozy, co ważne nigdy nie leczone za pomocą syntetycznych i naturalnych hormonów tarczycy, nie stosowano u nich żadnych innych terapii. Pacjentki zgłaszały się na okresowe badania kontrolne do Kliniki Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Grupę kontrolną stanowiło 25 ogólnie zdrowych kobiet dopasowanych pod względem wieku oraz BMI, które zgłaszały się na stomatologiczne wizyty kontrolne do Zakładu Stomatologii Zachowawczej. Uczestniczki grupy kontrolnej miały prawidłowy wynik badania USG tarczycy, jak również stężenie TPO-Ab, TG-Ab, fT4 i TSH we krwi w normie dla osób zdrowych.

Kryteria włączenia i wyłączenia do badań i dokładna metodyka badawcza zostały przedstawione w publikacji 2 będącej podstawą mojej dysertacji.

U ponad połowy badanych pacjentek odnotowałam wydzielanie NWS poniżej 0.2 mL/min wskazujące na osłabioną funkcję wydzielniczą ślinianek. Dodatkowo dowiodłam, że kliniczne objawy niewydolności gruczołów ślinowych pogłębiają się z czasem trwania choroby, niemniej jednak zachodzące w nich zmiany zapalne są niezależne od zmian zapalnych towarzyszących AITD. Uzyskane wyniki wskazują na występowanie zaburzeń w profilu cytokin, chemokin i czynników wzrostowych w NWS oraz osoczu pacjentek z AITD w eutyrozie, a stężenia IL-6 i IL-1 oraz INF- $\gamma$ ,

TNF- $\alpha$ , IL-12 mogą być potencjalnymi biomarkerami dysfunkcji gruczołów ślinowych w przebiegu AITD. Dokładny opis wyników znajduje się w publikacji 2 będącej podstawą mojej dysertacji.

#### Wnioski:

1. Redukcja wydzielania NWS przez pacjentki AITD w stanie eutyrozy w porównaniu do kontroli jest wyrazem osłabionej funkcji gruczołów ślinowych. Co więcej obserwowane u 60% badanych pacjentek z AITD wydzielanie NWS poniżej 0,2 mL/min jest klinicznym dowodem dysfunkcji sekrecyjnej gruczołów ślinowych.
2. Nasilenie dysfunkcji wydzielniczej gruczołów ślinowych jest ściśle związane ze stężeniem przeciwciał.
3. Kliniczne objawy niewydolności gruczołów ślinowych pogłębiają się z czasem trwania choroby.
4. Ocena stężeń badanych cytokin w ślinie i osoczu pacjentek z HT w stanie eutyrozy nie wskazuje na dominację żadnej z odnóg odpowiedzi immunologicznej.
5. IL-6 i IL-1 oraz INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , a także IL-12 mogą być potencjalnymi biomarkerami dysfunkcji gruczołów ślinowych w przebiegu AITD.
6. Zmiany zapalne i związana z nimi dysfunkcja gruczołów ślinowych nie jest związana ze ogólnoustrojowym stanem zapalnym.
7. Ślinowa IL-12 (p40) może być pomocna w ocenie progresji autoimmunologicznego zapalenia tarczycy.

## 6. Streszczenie

Przyczyna zaburzonej funkcji gruczołów ślinowych w przebiegu AITD nie została wyjaśniona. Na uwagę zasługuje występowanie dysfunkcji gruczołów ślinowych u pacjentów w eutyreozie. Wcześniejsze badania wykazały zaburzenia bariery antyoksydacyjnej śliny oraz udział OS w rozwoju i progresji dysfunkcji gruczołów ślinowych w przebiegu innych chorób autoimmunologicznych: łuszczycy zwyczajnej, twardziny układowej, reumatoidalnego zapalenia stawów, cukrzycy typu 1, stwardnienia rozsianego, SS, toczenia rumieniowatego układowego. Podobieństwo na podłożu genetycznym i immunopatologicznym pomiędzy SS i AT (98-100) sugeruje natomiast, że zaburzenia sekrecyjnej (wydzielniczej) funkcji ślinianek przez analogię do SS, mogą mieć podłoże immunologiczne i być następstwem zaburzeń wydzielania cytokin, chemokin i czynników wzrostowych. Tym bardziej, że dochodzi do zmniejszenia rozmiarów i wzrostu nacieku zapalnego w gruczołach ślinowych myszy (bez genu kodującego sulfotransferazę tyrosulproteinową) z niedoczynnością tarczycy na tle autoimmunologicznego zapalenia (101).

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej w Białymstoku (R-I-002/386/2016). Każdy z pacjentów i uczestników grupy kontrolnej został poinformowany o celach i metodologii obecnego eksperymentu i wyraził pisemną zgodę na udział w badaniach.

Celem publikacji 1 była ocena parametrów obrony antyoksydacyjnej oraz mierzalnych skutków stresu oksydacyjnego w niestymulowanej i stymulowanej ślinie i osoczu/erytrocytach pacjentów z AT w stanie eutyreozy oraz porównanie uzyskanych wyników z wynikami grupy kontrolnej.

Grupa badana składała się z 45 kobiet z rozpoznaniem AT. Chorobę potwierdzono, gdy stężenie anty-TG i/lub anty-TPO w surowicy przekraczało normę i występowało z niejednorodnością miąższu w badaniu USG tarczycy. W grupie badanej znalazły się jedynie pacjentki z AT w stanie eutyreozy [wolna tyroksyna (fT4) i hormon tyreotropowy (TSH) w normie], w tym 24 leczonych Eutyroxem (dawki od 50 do 150 mg; ostatnia tabletką przyjmowana 24 godziny przed badaniem poziomu hormonów) i 21 nieleczonych. Pacjenci zgłaszali się na wizyty kontrolne do Kliniki Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Postanowiliśmy stworzyć tylko jedną grupę, ponieważ wyniki poszczególnych testów równowagi redoks nie różniły się między pacjentami w trakcie terapii hormonalnej a tymi, którzy jej nie wymagali.

Grupę referencyjną stanowiło 45 ogólnie zdrowych kobiet, dopasowanych do grupy badanej pod względem wieku i BMI, wybranych spośród tych, które zgłosiły się na wizyty kontrolne do Zakładu Stomatologii Zachowawczej UMB. Uczestniczki grupy kontrolnej miały prawidłowy wynik badania USG tarczycy, jak również stężenie TPO-Ab, TG-Ab, fT4 i TSH we krwi w normie dla osób zdrowych.

Kryteria włączenia i wyłączenia do badań i dokładna metodyka badawcza zostały przedstawione w publikacji 1 będącej podstawą niniejszej dysertacji.

Wydzielanie śliny niestymulowanej (NWS) było istotnie niższe u pacjentów z AT w porównaniu ze zdrowymi osobami z grupy kontrolnej, podobnie jak aktywność amylazy ślinowej w NWS i ślinie stymulowanej (SNS). Aktywność CAT i Px była istotnie wyższa w NWS i SWS pacjentów z AT, natomiast stężenia GSH i UA były istotnie niższe w porównaniu z osobami zdrowymi. Całkowity potencjał antyoksydacyjny był znacząco niższy, podczas gdy całkowity status oksydacyjny i poziom produktów utleniania białek (zaawansowane produkty końcowe glikacji, zaawansowane produkty utleniania białek) i lipidów (MDA, wodoronadtlenki lipidów) były znacznie wyższe w NWS, SWS i osoczu pacjentów z AT w porównaniu do grupy kontrolnej. Dokładny opis wyników znajduje się w publikacji 1 będącej podstawą obecnej dysertacji.

## Wnioski

1. Ślinianki przyuszne i podżuchwowe u pacjentek z AT w stanie eutyreozy cechowały się upośledzoną zdolnością do utrzymania równowagi redoks na poziomie obserwowanym w śliniankach kobiet kontrolnych.

2. Ślina pacjentek z AT w eutyreozie wykazywała zmniejszony potencjał antyoksydacyjny. Co więcej, istotny wzrost stężenia zmodyfikowanych oksydacyjnie biomolekuł w NWS i SWS sugeruje niewydolność bariery antyoksydacyjnej ślinianek w zwalczaniu nadmiernej produkcji RFT.

3. OS w NWS i SWS kobiet z AT wydaje się być ściśle związane z zapaleniem związanym z autoimmunizacją, a nie ze stężeniem hormonów tarczycy czy TSH.

4. Funkcja wydzielnicza ślinianek podżuchwowych u pacjentek z AT w stanie eutyreozy jest zmniejszona, co objawia się istotnym zmniejszeniem niestymulowanego wydzielania śliny.

Celem publikacji 2 była ocena stopnia występowania zaburzeń funkcjonowania gruczołów ślinowych oraz występowania subiektywnych i obiektywnych objawów dysfunkcji gruczołów ślinowych u pacjentek z AITD w stanie samoistnej eutyrozy, nigdy nie poddanych leczeniu hormonalnemu. Ślinowe poziomy wybranych cytokin, chemokin czy czynników wzrostowych w przebiegu AITD jak dotąd nie były oznaczane, co wydaje się niezbędne dla wyjaśnienia udziału mechanizmów immunologicznych w rozwoju dysfunkcji gruczołów ślinowych w przebiegu tej choroby. Wyniki badań zawarte w publikacji 2 mają ponadto ocenić, czy uzyskane stężenia wybranych cytokin, chemokin i czynników wzrostowych w ślinie mogą mieć związek z tempem wydzielania śliny niestymulowanej i objawami kserostomii.

Grupę badaną stanowiło 25 pacjentek z rozpoznaną chorobą Hashimoto. Rozpoznanie choroby oparte było na pozytywnym wyniku badania USG i stwierdzeniu we krwi stężenia przeciwciał TPO-Ab, TG-Ab powyżej normy laboratoryjnej. Wyodrębnione pacjentki były to kobiety z AT w stanie eutyrozy, co ważne nigdy nie leczone za pomocą syntetycznych i naturalnych hormonów tarczycy, nie stosowano u nich żadnych innych terapii. Pacjentki zgłaszały się na okresowe badania kontrolne do Kliniki Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Grupę kontrolną stanowiło 25 ogólnie zdrowych kobiet dopasowanych pod względem wieku oraz BMI, które zgłaszały się na stomatologiczne wizyty kontrolne do Zakładu Stomatologii Zachowawczej. Uczestniczki grupy kontrolnej miały prawidłowy wynik badania USG tarczycy, jak również stężenie TPO-Ab, TG-Ab, fT4 i TSH we krwi w normie dla osób zdrowych. Kryteria włączenia i wyłączenia do badań i dokładna metodyka badawcza zostały przedstawione w publikacji 2 będącej podstawą obecnej dysertacji.

U ponad połowy badanych pacjentek odnotowałam wydzielanie UWS poniżej 0,2 mL/min wskazujące na osłabioną funkcję wydzielniczą ślinianek. Dodatkowo dowiodłam, że kliniczne objawy niewydolności gruczołów ślinowych pogłębiają się z czasem trwania choroby, niemniej jednak zachodzące w nich zmiany zapalne są niezależne od zmian zapalnych towarzyszących AT. Uzyskane wyniki wskazują na występowanie zaburzeń w profilu cytokin, chemokin i czynników wzrostowych w UWS and osoczu pacjentek z AT w eutyrozie, a stężenia IL-6 i IL-1 oraz INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 mogą być potencjalnymi biomarkerami dysfunkcji gruczołów ślinowych w przebiegu AT. Dokładny opis wyników znajduje się w publikacji 2 będącej podstawą mojej dysertacji.

#### Wnioski:

1. Redukcja wydzielania NWS przez pacjentki AT w stanie eutyrozy w porównaniu do kontroli jest wyrazem osłabionej funkcji gruczołów ślinowych. Co więcej obserwowane u 60% badanych pacjentek z AT, UWS poniżej 0,2 mL/min, jest klinicznym dowodem dysfunkcji sekrecyjnej gruczołów ślinowych.
2. Nasilenie dysfunkcji wydzielniczej gruczołów ślinowych jest ściśle ze stężeniem przeciwciał.
3. Kliniczne objawy niewydolności gruczołów ślinowych pogłębiają się z czasem trwania choroby.
4. Ocena stężeń badanych cytokin w ślinie i osoczu pacjentek z HT w stanie eutyrozy nie wskazuje na dominację żadnej z odnóg odpowiedzi immunologicznej.
5. IL-6 i IL-1 oraz INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , a także IL-12 mogą być potencjalnymi biomarkerami dysfunkcji gruczołów ślinowych w przebiegu AT.
6. Zmiany zapalne i związana z nimi dysfunkcja gruczołów ślinowych nie jest związana ze ogólnoustrojowym stanem zapalnym.

7. Ślinowa IL-12 (p40) może być pomocna w ocenie progresji autoimmunologicznego zapalenia tarczycy.

## 7. Summary

The cause of the dysfunction of the salivary glands in the course of AITD has not been elucidated. The presence of salivary gland dysfunction in euthyroid patients is noteworthy. Former research have shown disorders in the antioxidant barrier of saliva and the contribution of OS in the development and progression of salivary gland dysfunction in the course of other autoimmune diseases: psoriasis vulgaris, systemic sclerosis, rheumatoid arthritis, type 1 diabetes, multiple sclerosis, Sjögren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. The genetic and immunopathological similarity between Sjögren's syndrome (SS) and AITD (98-100) suggests that disorders of the secretory function of the salivary glands, by analogy with SS, may be immunologically related and result from disturbances in the secretion of cytokines, chemokines and growth factors. A fortiori there is a reduction in the size and increases the inflammatory infiltration in the salivary glands of mice (without the gene encoding tyrosulprotein sulfotransferase) with hypothyroidism due to autoimmune inflammation (101).

The research was approved by the Bioethics Committee in Białystok (R-I-002/386/2016). Each of the patients and control group participants was informed about the objectives and methodology of the present experiment and gave their written consent to participate in the study.

The aim of publication 1 was to evaluate the parameters of antioxidant defense and the measurable effects of oxidative stress in unstimulated and stimulated saliva and plasma / erythrocytes of patients with euthyroid AITD, and to compare the obtained results with the results of the control group.

The study group consisted of 45 women diagnosed with AITD. The disease was confirmed when serum levels of anti-TG and / or anti-TPO were above the norm in the plasma and occurred with parenchymal heterogeneity on ultrasound of the thyroid gland. The study group included patients only with euthyroid AITD [free thyroxine (fT4) and normal thyroid stimulating hormone (TSH)], including 24 patients treated with Eutyrox (doses from 50 to 150 mg; the last tablet taken 24 hours before the hormone level test) ) and 21 untreated. Patients reported for follow-up appointments to the Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok. We decided to create only one group due to the fact that the results of the individual redox balance tests did not differ between patients undergoing hormone therapy and those who did not require it.

The reference group consisted of 45 generally healthy women, matched to the study group in terms of age and BMI, selected from those who reported for follow-up visits to the Department of Conservative Dentistry of the Medical University of Białystok. The participants of the control group had normal thyroid ultrasound examination results, as well as blood levels of TPO-Ab, TG-Ab, fT4 and TSH were normal for healthy people. The inclusion and exclusion criteria for research and the exact research methodology are presented in publication 1, which is the basis for this dissertation.



The secretion of unstimulated saliva (NWS) was significantly lower in patients with AITD compared to healthy controls, as was the activity of salivary amylase in NWS and stimulated saliva (SNS). The activity of CAT and Px was significantly higher in the NWS and SWS of patients with AITD, while the concentrations of GSH and UA were significantly lower compared to healthy subjects. Total antioxidant potential was significantly lower, while the total oxidative status and levels of protein oxidation products (advanced glycation end products, advanced protein oxidation products) and lipids (MDA, lipid hydroperoxides) were significantly higher in NWS, SWS and plasma of AITD patients compared to the control group. A detailed description of the results can be found in publication 1, which is the basis of the present dissertation.

### Conclusions

1. The parotid and submandibular glands in patients with euthyroid AITD showed an impaired ability to maintain the redox balance at the level observed in the salivary glands of control women.
2. The saliva of patients with AITD in euthyroidism showed a reduced antioxidant potential. Moreover, a significant increase in the concentration of oxidatively modified biomolecules in NWS and SWS suggests the failure of the antioxidant barrier of the salivary glands in combating the excessive production of ROS.
3. OS in NWS and SWS in women with AITD appears to be closely related to autoimmunity-related inflammation rather than thyroid hormone or TSH levels.
4. The secretory function of the submandibular glands is reduced in patients with euthyroid AITD, which is manifested by a significant reduction in unstimulated saliva secretion.

The aim of publication 2 was to assess the degree of disturbances in the functioning of the salivary glands and the occurrence of subjective and objective symptoms of salivary gland dysfunction in patients with AITD in the state of spontaneous euthyroidism, never undergoing hormonal treatment. Salivary levels of selected cytokines, chemokines or growth factors in the course of AITD have not been determined so far, which seems necessary to explain the role of immunological mechanisms in the development of salivary gland dysfunction in the course of this disease. The results of the research included in publication 2 are also intended to assess whether the obtained concentrations of selected cytokines, chemokines and growth factors in saliva may be related to the rate of unstimulated saliva secretion and the symptoms of xerostomia.

The study group consisted of 25 female patients diagnosed with Hashimoto's disease. The diagnosis of the disease was based on a positive ultrasound examination and the presence of TPO-Ab and TG-Ab antibodies in the blood above the laboratory norm. The selected patients were women with euthyroid AITD, which, importantly, had never been treated with synthetic and natural thyroid

hormones, and had not received any other therapies. The patients reported periodic check-ups at the Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok. The control group consisted of 25 generally healthy women matched in terms of age and BMI, who reported for dental follow-up visits to the Department of Conservative Dentistry. The participants of the control group had normal thyroid ultrasound examination results, as well as blood levels of TPO-Ab, TG-Ab, fT4 and TSH were normal for healthy people. The inclusion and exclusion criteria for research and the exact research methodology are presented in publication 2, which is the basis for the present dissertation.

In more than half of the examined patients, I noted UWS secretion below 0.2 mL / min, indicating a weakened secretory function of the salivary glands. Additionally, I proved that the clinical symptoms of salivary gland insufficiency deepen with the duration of the disease, however, the inflammatory changes occurring in them are independent of the inflammatory changes accompanying AITD. The obtained results indicate the occurrence of disturbances in the profile of cytokines, chemokines and growth factors in UWS and plasma of patients with AITD in euthyrosis, and the concentrations of IL-6 and IL-1 as well as INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 may be potential biomarkers of dysfunction. salivary glands in the course of AITD. A detailed description of the results can be found in publication 2, which is the basis of my dissertation.

#### Conclusions:

1. The reduction of NWS secretion by euthyroid AITD patients compared to control is an expression of impaired function of the salivary glands. Moreover, observed in 60% of the studied patients with AITD, UWS below 0.2 mL / min, is a clinical evidence of secretory dysfunction of the salivary glands.
2. The severity of the secretory dysfunction of the salivary glands is closely related to the concentration of antibodies.
3. Clinical symptoms of salivary gland insufficiency deepen with the duration of the disease.
4. The evaluation of the concentrations of the tested cytokines in the saliva and plasma of euthyroid HT patients does not indicate the dominance of any of the branches of the immune response.
5. IL-6 and IL-1 as well as INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and also IL-12 may be potential biomarkers of salivary gland dysfunction in the course of AITD.
6. Inflammatory changes and the related dysfunction of the salivary glands is not related to systemic inflammation.
7. Salivary IL-12 (p40) may be helpful in assessing the progression of autoimmune thyroiditis.

## 8. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską

Article

# Enhanced salivary and general oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis women in euthyrosis

Katarzyna Morawska <sup>1</sup>, Mateusz Maciejczyk <sup>2,\*</sup>, Łukasz Popławski <sup>3</sup>, Anna Popławska-Kita <sup>4</sup>, Adam Krętowski <sup>4</sup> and Anna Zalewska <sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup> 1 Department of Restorative Dentistry, Medical University of Białystok, 24A M. Skłodowskiej-Curie Street, 15-276 Białystok, Poland; kmorawska1009@gmail.com

<sup>2</sup> 2 Department of Hygiene, Epidemiology and Ergonomics, Medical University of Białystok, 2c Mickiewicza Street, 15-022 Białystok, Poland

<sup>3</sup> 3 Department of Radiology, Medical University of Białystok, Poland; gajki91@o2.pl

<sup>4</sup> 4 Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Białystok, Poland; annapoplawsakita@op.pl, adamkretowski@wp.pl

<sup>5</sup> 5 Independent Laboratory of Experimental Dentistry, Medical University of Białystok, 24A M. Skłodowskiej-Curie Street, 15-276 Białystok, Poland; azalewska426@gmail.com

\* Correspondence: mat.maciejczyk@gmail.com (M.M.); azalewska426@gmail.com (Z.A.); Tel.: +xx-xxxx-xxx-xxxx

Received: date; Accepted: date; Published: date

**Abstract:** Hashimoto's thyroiditis (HT) is one of the most common autoimmune diseases. Although HT is inextricably linked to oxidative stress, there have been no studies assessing salivary redox homeostasis or salivary gland function in patients with HT. This study is the first to compare antioxidant defense and oxidative stress biomarkers in non-stimulated (NWS) and stimulated (SWS) whole saliva and plasma/erythrocytes of HT patients compared to the controls. The study included 45 women with HT in the euthyrosis period as well as an age- and gender-matched control group. We showed that NWS secretion was significantly lower in HT patients compared to healthy controls, similar to salivary amylase activity in NWS and SWS. Catalase and peroxidase activities were considerably higher in NWS and SWS of HT patients, while the concentrations of reduced glutathione and uric acid were significantly lower in comparison with healthy subjects. Total antioxidant potential was notably lower, while total oxidant status and the level of oxidation products of proteins (advanced glycation end products, advanced oxidation protein products) and lipids (malondialdehyde, lipid hydroperoxides) were significantly higher in NWS, SWS and plasma of HT patients. In conclusion, in both salivary glands of women with HT in euthyrosis the ability to maintain redox homeostasis was hindered. In HT patients we observed oxidative damage to salivary proteins and lipids; thus, some biomarkers of oxidative stress may present a potential diagnostic value.

Keywords: Hashimoto's disease; oxidative stress; saliva

---

## 1. Introduction

Hashimoto's disease (HT) is one of the most widespread autoimmune thyroid diseases (AITD) [1,2]. HT is known as chronic lymphocytic thyroiditis. It is an autoimmune-mediated disease characterized by dense infiltrations of the thyroid gland by plasma cells, macrophages and, particularly, lymphocytes. The T and B lymphocytes are stimulated against thyroglobulin and thyroid peroxidase, and induce a number of biochemical processes that lead to progressive destruction of thyrocytes, fibrosis, reduction of the thyroid gland size and its hypofunction [3]. Growing evidence indicates that HT is linked to lowered cellular antioxidant potential and enhanced oxidative stress (OS) [1,3-5].

OS is a situation in which balance between reactive oxygen species (ROS) and the body's ability to neutralize them is shifted in favor of oxidants [6]. This leads to a temporary or chronic elevation of ROS concentration as well as disturbed cell metabolism and degradation of cell components [6].

Evidence showed enhanced OS in plasma of HT patients. Lassoued et al. [7] demonstrated increased plasma malondialdehyde (MDA) concentration as well as the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)

compared to the controls. Rostami et al. [1] observed decreased GSH concentration in the plasma of newly diagnosed hypothyroid HT patients. This study proved that the interrelationship between GSH level and anti-TPO antibodies confirms that GSH depletion indicates processes leading to OS initiation and development of immunological intolerance in the course of HT. Ates et al. [3] argued that higher OS level in patients progressing to overt hypothyroidism may be evidence of redox balance shift towards oxidative reactions and thus serve as a significant factor in the initiation and progression of this disease. Interestingly, in the study performed by Nanda et al. [8], OS level was higher in thyroid antibody-positive hypothyroid group than in the thyroid antibody-negative hypothyroid group. The authors concluded that the presence of autoimmune antibodies is a key factor for enhanced ROS production and increased concentrations of oxidative biomolecular modifications, while thyroid hormone levels are of secondary importance.

Systemic inflammation, elevated levels of thyroid antibodies, disturbed concentrations of thyroid hormones and chronically raised ROS levels in the course of HT lead to numerous systemic complications, including cardiological diseases, insulin resistance, mood disorders and salivary gland diseases [1,3,9].

Agha-Hosseini et al. [9] demonstrated significantly reduced unstimulated saliva flow rate and xerostomia among HT women in euthyrosis vs. healthy controls. The cause of salivary gland dysfunction in the course of HT has not been explained yet. It is noteworthy that we observed salivary gland dysfunction in patients in euthyrosis, i.e. normal thyroid function. Abnormalities in both the composition and amount of the secreted saliva negatively affect oral health and the condition of the entire body. Saliva plays a key role in maintaining balance of the oral cavity environment. It is responsible for tissue integrity, initial digestion and food processing, taste recognition, moisturization, dilution, buffering, tooth remineralization and functions related to protective and antibacterial activities and speech. Saliva participates in maintaining redox balance of the oral cavity as well as further parts of the digestive tract. Therefore, it is important to understand the mechanisms leading to salivary gland dysfunction in the course of the described disease. Our previous studies showed the contribution of OS in the development and progression of salivary gland dysfunction in the course of numerous systemic diseases, including autoimmune diseases [10-19]. In the light of the above, it appears necessary to assess the role of OS in the development of salivary gland dysfunction in the course of HT.

Saliva is not only gingiva fluid and the secretion of large salivary glands. It also contains all the elements present in the blood that penetrate spaces between cells by way of intra- and paracellular transport. Therefore, saliva is considered a potential source of biomarkers, starting with DNA, RNA, proteins, lipids and bacteria. This material is collected painlessly, safely and with a low risk of infection; moreover, it more and more often replaces blood and urine in the diagnosis of general diseases. Serum oxidative stress biomarkers are proposed to be used in diagnosing patients with HT. However, there are still no studies to evaluate salivary redox markers and their usefulness in the diagnosis of HT patients.

The aim of this study was to evaluate antioxidative defense parameters and measurable oxidative stress effects in unstimulated and stimulated saliva and plasma/erythrocytes of patients with HT in euthyrosis and to compare the obtained results with those in the control group. The goal of our experiment was also to search for salivary biomarkers that could enable the diagnosis of Hashimoto's disease already at its euthyrosis stage.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Patients*

The study was approved by the Local Ethics Committee, permission number: R-I-002/386/2016. Each patient was informed about the purpose and detailed procedure of the study and consented in writing to join the research project.

The study group consisted of 45 women diagnosed with HT. The disease was confirmed when anti-TG and/or anti-TPO level in serum was above the normal range and occurred with the presence of parenchymal heterogeneity on thyroid ultrasonography (USG). Our experiment included patients with HT in euthyrosis [free thyroxine (fT4) and thyroid stimulating hormones (TSH) within normal ranges], 24 treated with Eutyrox (doses from 50 to 150 mg; the last tablet taken 24 hours before the hormone level test) and 21 untreated, who enrolled in the control studies in the Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine of the Medical University of Białystok.

The reference group consisted of 45 generally healthy women, matched to the study group in terms of age and BMI, selected from those who reported for dental check-ups to the Department of Restorative Dentistry, MUB. All the subjects in the control group had normal serum TSH, fT4, anti-TG and anti-TPO levels as well as thyroid imaging (homogenous parenchyma without nodules) on USG.

Blood collection for the determination of hormones, antibodies and other clinical and oxidative stress parameters as well as ultrasound examination took place a day before saliva collection and dental examination, and included 70 patients and 70 control subjects. Based on the results of thyroid hormone and TSH assays, the patients and the control group were qualified for further examinations (over 60 patients and 59 control group participants were positively qualified for the experiment).

10 mL of venous blood samples were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. The blood was then centrifuged 1500 x g at 4°C for 10 minutes. The acquired plasma was placed in Eppendorf tubes. The obtained erythrocyte mass was centrifuged three times in cold saline (0.9% NaCl) and then underwent osmotic lysis by adding a cold phosphate buffer (1:9, 50 mM, pH 7.4). In order to prevent sample oxidation and proteolysis, 10 µL 0.5 M BHT (butylated hydroxytoluene, BHT, Sigma-Aldrich, Germany) in acetonitrile was added per 1 mL of plasma and erythrocytes, and stored at -80°C until assayed, but not longer than 6 months.

Clinical details of patients and control subjects are presented in Table 1.

**Table 1.** Clinical characteristics of the patients and control group.

	<b>Control, n=45 M (min-max)</b>	<b>HT, n=45 M (min-max)</b>	<b>P</b>
Age (years)	35 (29-43)	35 (29-43)	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	19.25 (18.3-24.52)	23.15 (18.19-25.89)	NS
TSH (µU/mL)	1,99 (0.35-2.85)	2.85 (0.35-4.94)	NS
Free T4 (ng/mL)	1.2 (0.91-1.4)	1.1 (0.7-1.42)	NS
Free T3 (pg/mL)	2.56 (1.9-3.45)	2.4 (1.7-3.65)	NS
Anty TPO (IU/mL)	0.35 (0- 2.1)	321.2 (108.25-652.1)	<0.0001
Anty TG (IU/mL)	0.32 (0- 2.1)	153.8 (99.9-333.1)	<0.0001
PTH (pg/mL)	39.45 (10-62.2)	35.02 (15.51-63.56)	NS
Glucose (mg/dL)	86.37 (76.96-95.49)	84.11 (73.90-98.65)	NS
Leptin (ng/dL)	9.712 (0.76-17.72)	10.66 (0.82-17.03)	NS

Abbreviation: HT- Hashimoto thyroiditis, C- control, BMI- body mass index, TSH- thyrotropic hormone, anty TPO- thyroid peroxidase antibody, antyTG- thyroid peroxidase antibody, PTH- parathyroid hormone.

Patients with HT did not suffer from any associated diseases, including other autoimmune diseases (type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, scleroderma, psoriasis, lupus, Sjögren’s syndrome, etc.) or depression. Participants from both the study and control group were qualified for further examinations only if they did not have periodontitis, gingivitis or active foci of odontogenic infections. Participants had  $18.5 \leq \text{BMI} \leq 25$ . The subjects had not taken any drugs that could affect saliva secretion (mainly antidepressants or drugs for hypertension) or its redox status (vitamins, antioxidants) within 3 months prior to saliva collection, nor were they on any reducing diet. Patients and the controls who smoked tobacco or consumed any amount of alcohol or other stimulants were not included in the study.

The women in both groups were asked to complete a questionnaire containing a list of symptoms associated with xerostomia and xerophthalmia listed in the American-European classification criteria for Sjögren’s syndrome [18,20].

Tear secretion was assessed by the Schirmer I test from both eyes for over 5 minutes with no anesthesia used [21].

## 2.2. Saliva collection

The studied material was non-stimulated (NWS) and stimulated (SWS) whole saliva collected via the spitting method. Participants were advised to refrain from consuming meals and drinks other than clean water, performing oral hygiene procedures for 2 hours and taking any medications for 8 hours before saliva collection. Saliva was collected between 8 a.m. and 10 a.m. to minimize the effect of daily changes on its secretion. The material was taken in a separate room so that patients did not feel uncomfortable or nervous. Participants had their saliva collected in a sitting position, with the head slightly inclined downwards, with minimized face and lip movements, upon a 5-minute adaptation period. After that time, every patient rinsed their mouth three times with water at room temperature. The saliva collected during the first minute was discarded. Subsequent batches of saliva (the patient actively spat out the saliva accumulated in the bottom of the oral cavity) were collected into plastic centrifuge tubes placed in ice containers. The time of NWS collection was 15 minutes [18,19]. SWS was collected after a 5-minute break, for 5 minutes. Its stimulation was triggered by dripping 100 µl 2% citric acid under the tongue every 20 seconds [12]. To avoid sample oxidation, 0.5 M BHT was added to the saliva (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA; 10 µl/ml saliva) [33]. The volume of each sample was measured with a pipette calibrated to 0.1 mL. Saliva secretion was calculated by dividing the volume of the obtained saliva by the number of minutes of its collection. Then saliva was centrifuged (20 minutes, 4°C, 10000 x g). Further tests were performed using the preserved supernatant fluid which was frozen at -80°C until assayed. Frozen samples were stored for no longer than 6 months.

Dental examination was performed on the day of and immediately after saliva collection using a mirror, an explorer and a periodontal probe according to WHO, in artificial light, by one calibrated dentist (K. M.). The study included dental evaluation, caries severity index (DMFT) as well as Approximal Plaque Index (API), periodontal probing depth (PPD) and gingival index (GI). DMFT is an index that evaluates the condition of teeth, which consists in counting teeth with caries,

removed due to caries or filled because of caries. GI is the assessment of the gingiva for possible inflammation. API is an index used to assess plaque located in interdental spaces. Finally, PPD is an index of the depth of probed gingival pockets.

After the dental examination, 15 patients and 5 control subjects were eliminated from the experiment due to the coexisting periodontal/gingival inflammation, and 9 additional participants were excluded from the control group as they did not match the other subjects in terms of BMI.

In 20 participants the study was conducted by another experienced dentist (A. Z.) and the results were compared with those obtained by the head doctor (K. M.). The interrater reliability for DMFT was  $r = 0.92$ , for GI  $r = 0.94$ , for API  $r = 0.98$  and for PPD  $r = 100$ .

The salivary amylase activity (EC 3.2.1.1) was assessed spectrophotometrically using an alkaline solution of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). The absorbance of samples was measured at 540 nm accompanying the increased concentration of reducing sugars released during the hydrolysis of starch catalyzed by salivary amylase. Salivary amylase activity was determined in duplicate samples and expressed in  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein [22].

Salivary interleukin  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) concentration was determined by ELISA using a commercially available kit from EIAab Science Inc. Wuhan (Wuhan, China) in accordance with the manufacturer's instructions provided in the package.

### 2.3. Redox assay

All analyses were performed in duplicate samples. Absorbance and fluorescence were measured with Infinite M200 PRO Multimode Tecan microplate reader. The results were standardized to 1 mg of total protein. The content of protein was evaluated by the bicinchoninic method (BCA) using a ready-made reagent kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Rockford, IL, USA) and a bovine serum albumin standard (BSA).

### 2.4. Enzymatic antioxidants

Enzymatic antioxidant barrier was evaluated in saliva and erythrocyte samples by measuring the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), salivary peroxidase (Px) and glutathione peroxidase (GPx).

Spectrophotometric evaluation of SOD activity (SOD, E.C. 1.15.1.1) was performed according to Misra and Fridovich [23] based on the adrenaline to adrenochrome oxidation rate. Absorbance measurements were taken at 480 nm wavelength.

Colorimetric measurement of CAT activity (CAT, E.C. 1.11.1.6) was based on the hydrogen peroxide degradation rate [24]. The unit of CAT activity (1 U) was determined as the amount of the enzyme decomposing 1 mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  per minute. The measurements were performed at 240 nm wavelength.

The activity of Px (Px, E.C. 1.11.1.7) was determined colorimetrically according to the method by Mansson-Rahemtulla et al. [25] based on the reduction of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to thionitrobenzoic acid at 412 nm wavelength.

The activity of GPx (GPx, E.C. 1.11.1.9) was measured spectrophotometrically using the Paglia and Valentine method [26] based on the reduction of organic peroxides in the presence of NADPH at 340 nm.

### 2.5. Non-enzymatic antioxidants

The non-enzymatic antioxidant barrier was assessed by measuring reduced glutathione (GSH) and uric acid (UA) concentrations in NWS, SWS and plasma.

GSH concentration was determined colorimetrically based on the reaction with DTNB. Absorbance of the samples was measured at 412 nm wavelength [27].

UA concentration was determined spectrophotometrically at 490 nm using the ability of 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine to form a blue complex with iron ions in the presence of UA. We used a commercial set of reagents (QuantiChrom™ Uric Acid Assay Kit DIUA-250; BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

TAC level in plasma was determined spectrophotometrically at 660 nm wavelength using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ATBS). The intensity of the color resulting from the reaction of ABTS radical cation was proportional to the content of antioxidants in the tested samples [28].

### 2.6. Total oxidant status (TOS) and oxidative stress index (OSI)

TOS and OSI levels were determined in NWS, SWS and plasma.

TOS level was assayed bichromatically (560/800 nm) based on the oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  to  $\text{Fe}^{3+}$  in the sample. TOS level was calculated from the standard curve for  $\text{H}_2\text{O}_2$  [29].

OSI was calculated based on the formula  $\text{OSI} = (\text{TOS}/\text{TAC}) \times 100$  [30].

### 2.7. Oxidative damage to proteins and lipids

Oxidative damage to proteins and lipids was assessed by measuring the concentration of advanced glycation end products (AGE) of proteins, advanced oxidation protein products (AOPP), lipid hydroperoxides (LOOH) and malondialdehyde (MDA) in saliva and plasma samples.

AGE content was assessed by measuring AGE-specific fluorescence at 350/440 nm wavelength, as described by Kalousová et al. [31].

The colorimetric measurement of AOPP content was determined fluorimetrically as described by Kalousová et al. [31] based on the oxidative capacity of iodine ions at 340 nm wavelength.

To measure AGE and AOPP concentrations, NWS, SWS and plasma samples were diluted with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) at a ratio of 1:5 (v/v).

The concentration of LOOH was evaluated spectrophotometrically from the reaction of iron ions (3+) with xylenol orange (XO). The absorbance of Fe-XO complex was measured at 560 nm wavelength [32].

MDA concentration was assessed colorimetrically based on the reaction with thiobarbituric acid (TBA) at 535 nm wavelength. 1,1,3,3-Tetraethoxypropane was used as a standard [33].

## 2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.3.0 for MacOS (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA). The distribution of the obtained results was assessed using the Shapiro-Wilk test. Due to the lack of normal distribution, the Mann-Whitney U test was used for quantitative comparisons. Chi-square test with Yates's modification was used to analyze the differences in the prevalence of qualitative variables. Correlations of the results were assessed using the Spearman rank correlation coefficient. The diagnostic value of redox biomarkers and the optimum cut-off values were determined based on the analysis of receiver operating characteristics (ROC). The statistical significance level was set at  $p < 0.05$ .

The number of subjects was determined based on our previous experiment, assuming that the power of the test would be equal to 0.9 (ClinCalc sample size calculator).

## 3. Results

### 3.1. Clinical data

Saliva secretion in the group of HT patients was 32% lower than in the control group ( $p = 0.02$ ). None of the patients had the rate of unstimulated saliva secretion below 0.1 mL/min. Moreover, stimulated saliva secretion did not differ between the groups. The concentration of total protein in unstimulated and stimulated saliva of HT patients was significantly higher than in the control group ( $\uparrow 46\%$ ,  $p = 0.00002$  and  $\uparrow 16\%$ ,  $p = 0.0003$ , respectively). Salivary amylase activity was considerably lower in NWS ( $\downarrow 50\%$ ,  $p = 0.00001$ ) and SWS ( $\downarrow 114\%$ ,  $p = 0.00001$ ) of HT patients compared to the controls (Table 2).

**Table 2.** Salivary gland function and dental indices of the patients and the control group.

	Control			HT			p
	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	
NWS mL/min	0.51	0.27	0.96	0.32	0.07	0.77	0.02
SWS mL/min	1.01	0.9	2	0.9	0.2	2	ns
TP NWS (mg/mL)	704.2	556.5	924.5	1293	979.4	1707	<0.0001
TP SWS (mg/mL)	1545	371.3	1672	1834	266.6	3861	<0.0001
Salivary amylase NWS ( $\mu\text{mol/mg protein}$ )	0.22	0.18	0.28	0.11	0.09	0.15	<0.0001
Salivary amylase SWS	0.3	0.19	0.38	0.14	0.1	0.16	<0.0001

(μmol/mg protein)							
Salivary IL-1β NWS (pg/mg protein)	0.91	0.27	2	2	0.4	3	<0.0001
Salivary IL-1β SWS (pg/mg)	5.1	2.7	6.8	7.8	4	12	<0.0001
Schirmer- I test (mm/5 min)							
Left eye	21	10	28	19	12	23	ns
Right eye	25	11	30	20	9	30	
Subjective dryness n (%)							
Xerostomia	1(2.22)			26(57.7)			0.003
xerophthalmia	3(6.67)			3(6.67)			ns
DMFT	15	0	25	16	3	28	ns
API	41.85	0	100	54.5	8.3	100	ns
GI	1	0	2	1	0	2	ns
PPD (mm)	1.898	1.14	2.55	1.99	1.33	3.64	ns

**NWS** – unstimulated saliva, **SWS** – stimulated saliva, **TP** -total protein, **DMFT**-decay, missing, filling teeth, **API**- Approximal Plaque Index, **GI**-gingival index, **PPD** – periodontal pocket depth, **ns**- non statistically important.

IL-1β concentration in NWS and SWS of patients with HT was significantly higher compared to the controls (↑119%,  $p = 0.00001$  and, ↑52%,  $p = 0.00002$ , respectively).

Oral dryness was more prevalent in HT women than in healthy controls ( $p = 0.003$ ). The prevalence of eye dryness was similar in both examined groups.

The median value of Schirmer I test for the left and right eye did not differ between the groups.

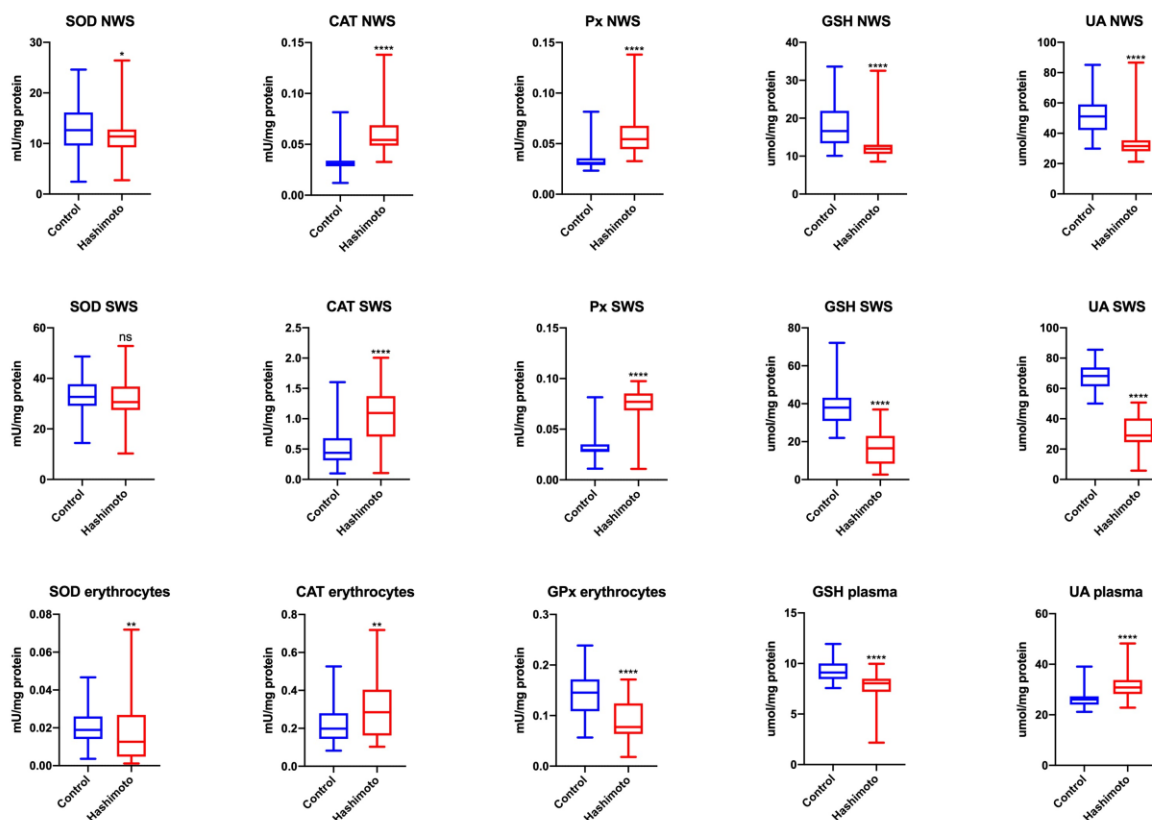
The analysis of dental data showed no differences in DMFT, API, GI and PPD between the study and control group (Table 2).

### 3.2. Antioxidant defense parameters

#### 3.2.1. NWS

SOD activity as well as the levels of GSH, UA and TAC (Figure 2) in NWS of HT patients were significantly lower than those in NWS of control patients (↓10%,  $p = 0.03$ ; ↓28%,  $p = 0.00003$ ; ↓38%,  $p = 0.00003$ ; ↓34%,  $p = 0.00005$ , respectively). CAT and Px activities in NWS of HT patients were notably higher compared to these parameters found in NWS of the control group (↑66%,  $p = 0.00002$ ; ↑66%,  $p = 0.00003$ , respectively) (Figure 1).





**Figure 1.** Enzymatic and nonenzymatic antioxidants in NWS, SWS, and blood plasma/erythrocytes of the patients and control group. Data are shown as median (minimum-maximum). CAT—catalase; GPx—glutathione peroxidase; GSH—reduced glutathione; NWS—non-stimulated whole saliva; Px—salivary peroxidase; SOD—superoxide dismutase-1; SWS—stimulated whole saliva; UA—uric acid. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 3.2.2. SWS

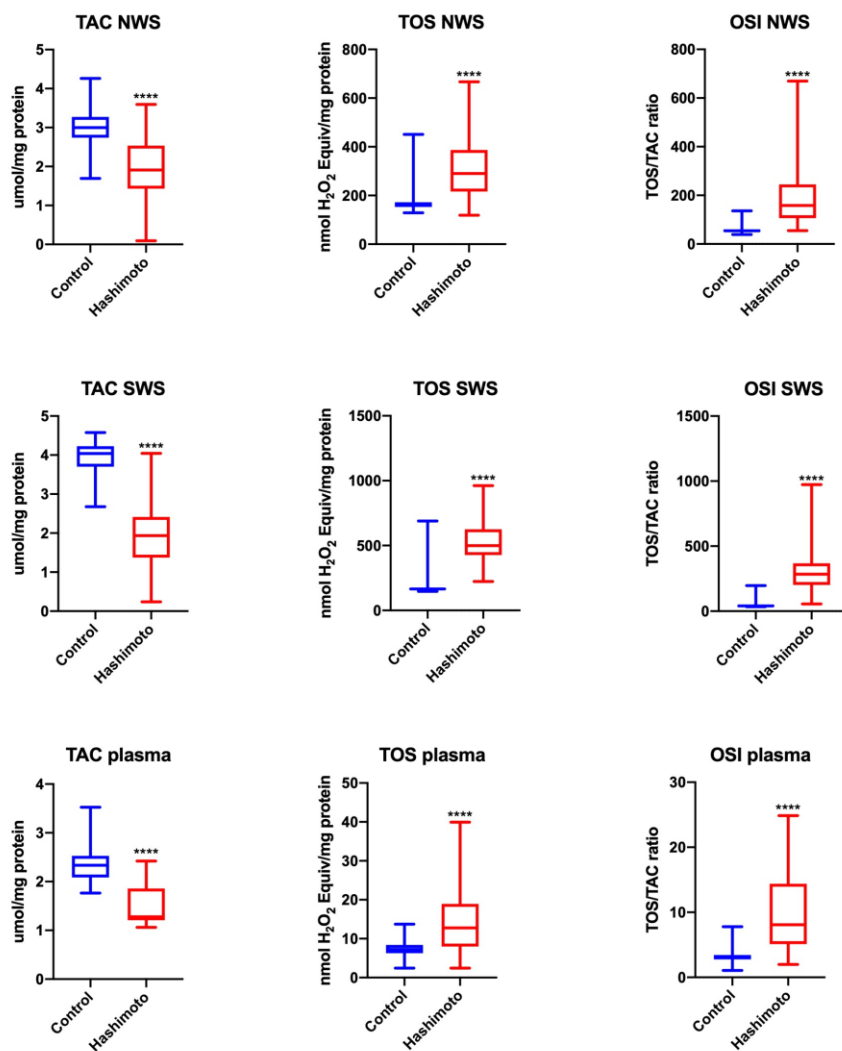
GSH, UA and TAC (Figure 2) concentrations in NWS of HT patients were significantly lower than in NWS of healthy controls ( $\downarrow 57\%$ ,  $p = 0.000003$ ;  $\downarrow 58\%$ ,  $p = 0.00001$ ;  $\downarrow 53\%$ ,  $p = 0.00001$ , respectively). CAT and Px activities in NWS of HT patients were considerably higher than in NWS of the control group ( $\uparrow 147\%$ ,  $p = 0.00002$ ;  $\uparrow 166\%$ ,  $p = 0.00003$ , respectively) (Figure 1).

### 3.2.3. Erythrocytes, plasma

SOD and GPx activities in blood erythrocytes as well as GSH and TAC plasma concentrations (Figure 2) in HT patients were significantly lower than the discussed parameters in the erythrocytes and plasma of the control group ( $\downarrow 50\%$ ,  $p = 0.009$ ;  $\downarrow 45\%$ ,  $p = 0.00001$ ;  $\downarrow 13\%$ ,  $p = 0.001$ ;  $\downarrow 82\%$ ,  $p = 0.00001$ , respectively) (Figure 1).

### 3.2.4. TOS and OSI

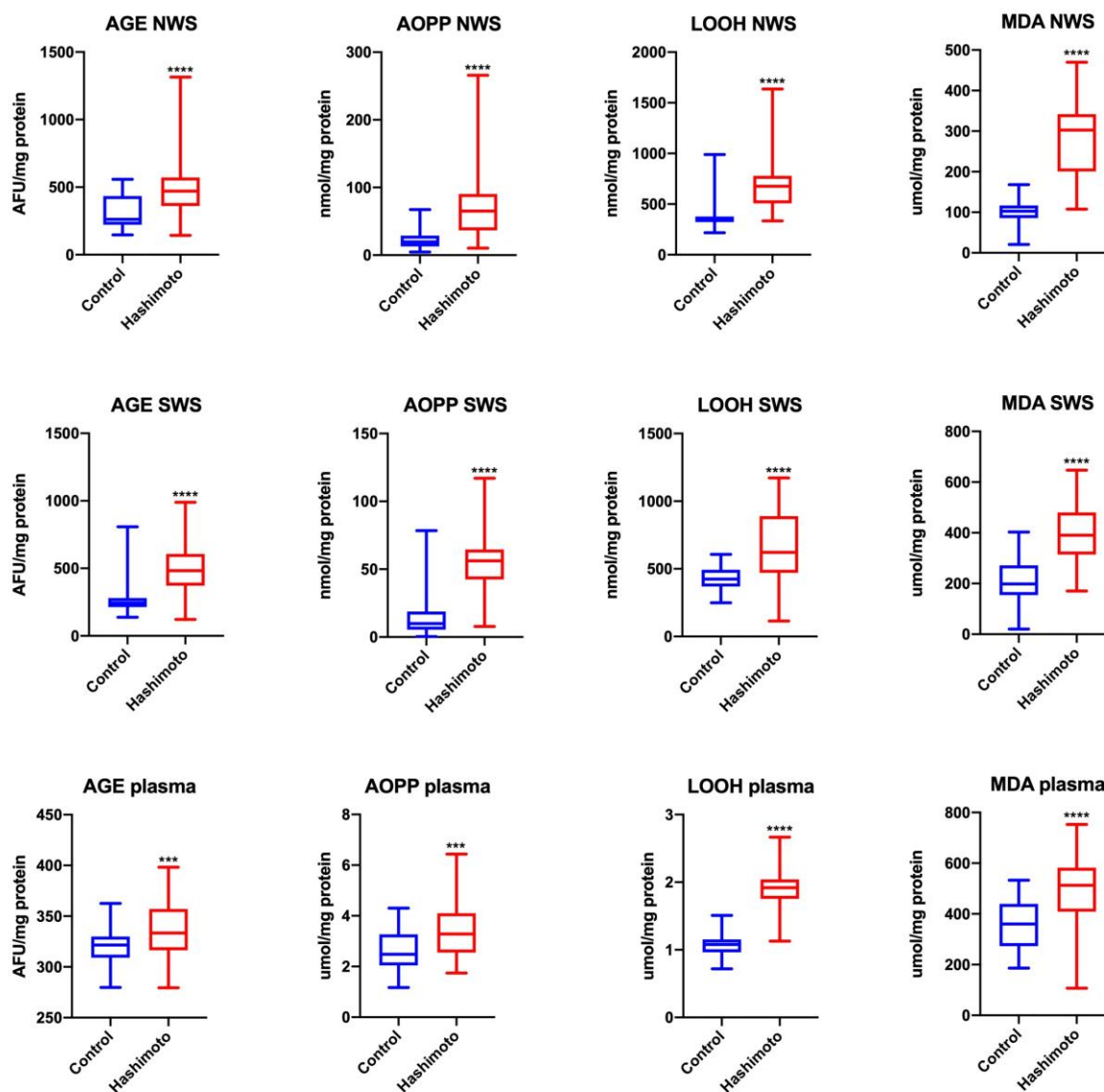
We observed significantly increased values of TOS and OSI in NWS ( $\uparrow 81\%$ ,  $p = 0.00001$ ;  $\uparrow 191\%$ ,  $p = 0.000001$ , respectively), SWS ( $\uparrow 201\%$ ,  $p = 0.00001$ ;  $\uparrow 588\%$ ,  $p = 0.000001$ , respectively) and plasma ( $\uparrow 76\%$ ,  $p = 0.00001$ ;  $\uparrow 158\%$ ,  $p = 0.000001$ , respectively) of HT patients compared to the control group (Figure 2).



**Figure 2. Redox status in NWS, SWS, and plasma of the patients and control group.** Data are shown as median (minimum-maximum). OSI—oxidative stress index; NWS—non-stimulated whole saliva; SWS—stimulated whole saliva; TAC—total antioxidant capacity; TOS— total oxidant status. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 3.2.5. Products of oxidative modifications

The concentrations of all the evaluated products of oxidative modifications: AGE, AOPP, LOOH and MDA were considerably higher in NWS ( $\uparrow 80\%$ ,  $p = 0.00001$ ;  $\uparrow 232\%$ ,  $p = 0.00002$ ;  $\uparrow 91\%$ ,  $p = 0.00001$ ;  $\uparrow 194\%$ ,  $p = 0.00001$ , respectively), SWS ( $\uparrow 97\%$ ,  $p = 0.00001$ ;  $\uparrow 476\%$ ,  $p = 0.00001$ ;  $\uparrow 46\%$ ,  $p = 0.00001$ ;  $\uparrow 96\%$ ,  $p = 0.00001$ , respectively) and plasma ( $\uparrow 13\%$ ,  $p = 0.0007$ ;  $\uparrow 31\%$ ,  $p = 0.0003$ ;  $\uparrow 77\%$ ,  $p = 0.00001$ ;  $\uparrow 42\%$ ,  $p = 0.00001$ , respectively) of HT patients compared to the values of these parameters obtained in the control group (Figure 3).



**Figure 3. Oxidative damage in NWS, SWS, and plasma of the patients and control group.** Data are shown as median (minimum-maximum). AGE—advanced glycation end products; AOPP—advanced oxidation protein products; LOOH—lipid hydroperoxides; MDA—malondialdehyde; NWS—non-stimulated whole saliva; SWS—stimulated whole saliva. \*\*\*  $p < 0.001$ , and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 3.2.6. ROC analysis

The assessment of diagnostic usefulness of the analyzed redox biomarkers is presented in Table 3. Many of the assessed parameters clearly differentiated HT patients in euthyrosis from healthy controls. Particularly noteworthy are the assays of CAT, TOS, OSI, LOOH, MDA in NWS as well as GSH, UA, TAC, TOS, OSI in SWS and TAC, OSI and LOOH in plasma of HT patients (Table 3)

**Table 3.** Receiver operating characteristic (ROC) analysis of oxidative stress biomarkers in NWS, SWS as well as plasma/erythrocytes of the patients and control group.

Parameter	NWS						SWS						Plasma					
	AUC	95% confidence interval	P value	Cut-off	Sensitivity (%)	Specificity (%)	AUC	95% confidence interval	P value	Cut-off	Sensitivity (%)	Specificity (%)	AUC	95% confidence interval	P value	Cut-off	Sensitivity (%)	Specificity (%)
SOD (mU/	0.6	0.52 to	0.02	<	60	60	0.5	0.46 to	0.19	<	56	56	0.6	0.54 to	0.0	<	66	66

mg protein)	3	0.74	69	11.53			7	0.69	73	31.71			5	0.76	101	0.02		
CAT (mU/mg protein)	0.93	0.87 to 0.98	<0.001	> 0.04	88	88	0.80	0.71 to 0.89	<0.001	> 0.69	78	78	0.67	0.56 to 0.78	0.04	> 0.24	64	64
Px (mU/mg protein)	0.88	0.81 to 0.96	<0.001	> 0.04	84	84	0.83	0.74 to 0.93	<0.001	> 0.04	86	86	0.57	0.45 to 0.68	0.233	< 0.14	54	54
GSH (umol/mg protein)	0.84	0.76 to 0.92	<0.001	< 13.15	78	78	0.96	0.93 to 0.99	<0.001	< 27.21	88	88	0.84	0.76 to 0.91	<0.001	< 8.48	74	74
UA (umol/mg protein)	0.85	0.77 to 0.94	<0.001	< 40.52	84	84	0.99	0.997 to 1.00	<0.001	< 47.88	98	100	0.82	0.74 to 0.91	<0.001	> 27.73	80	80
TAC (umol/mg protein)	0.89	0.82 to 0.95	<0.001	< 2.726	80	80	0.98	0.95 to 1.00	<0.001	< 3.31	94	94	0.93	0.89 to 0.98	<0.001	< 2.04	84	84
TOS (nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv/mg protein)	0.92	0.86 to 0.98	<0.001	> 186.9	90	90	0.95	0.90 to 1.00	<0.001	> 348.7	90	90	0.78	0.68 to 0.88	<0.001	> 8.24	74	74
OSI (TOS/TAC ratio)	0.97	0.94 to 0.998	<0.001	> 74.95	91.84	92	0.99	0.98 to 1.00	<0.001	> 129.63	95.83	96	0.93	0.88 to 0.99	<0.001	> 4.22	88	88
AGE (AFU/mg protein)	0.796	0.71 to 0.88	<0.001	> 375.1	70	70	0.82	0.72 to 0.91	<0.001	> 331.0	82	82	0.66	0.56 to 0.77	0.0046	> 324.9	62	62
AOPP (nmol/mg protein)	0.87	0.79 to 0.94	<0.001	> 30.30	80	80	0.93	0.87 to 0.98	<0.001	> 25.44	88	89.8	0.70	0.60 to 0.81	0.0004	> 2.92	60	60
LOOH (nmol/mg protein)	0.94	0.89 to 0.998	<0.001	> 414.0	92	92	0.81	0.71 to 0.90	<0.001	> 486.0	74	74	0.99	0.98 to 1.00	<0.001	> 1.39	96	98
MDA (umol/mg protein)	0.99	0.97 to 1.00	<0.001	> 153.1	94	96	0.91	0.86 to 0.97	<0.001	> 287.5	84	82	0.82	0.73 to 0.899	<0.001	> 433.2	72	74

AGE—advanced glycation end products; AOPP—advanced oxidation protein products; AUC—area under the curve; CAT—catalase; GPx—glutathione peroxidase; GSH—reduced glutathione; LOOH—lipid hydroperoxides; MDA—malondialdehyde; NWS—non-stimulated whole saliva; OSI—oxidative stress index; Px—salivary peroxidase; ROS—reactive oxygen species; SOD—superoxide dismutase; SWS—stimulated whole saliva; TAC—total antioxidant capacity; TOS—total oxidant status; UA—uric acid.

### 3.2.7. Correlations

In the study group we demonstrated a negative correlation between the plasma concentrations of anti-TPO antibodies and GSH ( $r = -0.854$ ,  $p < 0.0001$ ). We also observed a negative correlation between TAC in NWS ( $r = -0.704$ ,  $p < 0.0001$ ) and SWS ( $r = -0.759$ ,  $p < 0.0001$ ) and serum concentration of anti-TPO.

We also found a positive correlation between MDA in NWS and thyroglobulin antibodies ( $r = 0.851$ ,  $p < 0.0001$ ) as well as between LOOH in SWS and anti-TG ( $r = 0.839$ ,  $p < 0.0001$ ).

We showed a negative correlation between SOD activity in SWS and plasma glucose concentration ( $r = -0.851$ ,  $p < 0.0001$ ) in HT group.

In the study group we found a negative correlation between GSH and AOPP concentrations in SWS ( $r = -0.730$ ,  $p < 0.0001$ ). Moreover, IL-1 $\beta$  correlated positively with LOOH concentration ( $r = 0.886$ ,  $p < 0.0001$ ), and negatively with GSH level in SWS ( $r = -0.849$ ,  $p < 0.0001$ ).

The minute flow of unstimulated saliva correlated negatively with IL-1 $\beta$  concentration in NWS ( $r = -0.891$ ,  $p < 0.0001$ ). We also observed a negative correlation between salivary  $\alpha$ -amylase activity and TOS in NWS ( $r = -0.8$ ,  $p < 0.0001$ ).

## 4. Discussion

In the presented experiment we employed a wide range of biochemical assays to search for a link between OS expressed as antioxidant activity/concentration and oxidative damage products and salivary gland function in patients with HT in euthyrosis. We also sought salivary biomarkers enabling the diagnosis of patients with HT at an early stage of this autoimmune disease. To the best of our knowledge, this study is the first to assess the function of salivary glands and their redox balance in patients with HT in euthyrosis.

Patients were qualified to the study group based on their results of TSH, T4 and T3 levels as well as the presence of antibodies and USG images. The study group included HT patients in euthyrosis, both treated hormonally and not requiring such treatment. It is noteworthy that patients undergoing a hormone therapy never revealed a state of overt hypothyroidism or hyperthyroidism, and the decision to start treatment was made by a doctor. We decided to create only one group, because the results of particular redox balance assays did not differ between patients in the course of a hormone therapy and those not requiring it.

OS is the result of an imbalance between ROS production and neutralization, which leads to oxidative damage to tissues. In the case of autoimmune thyroiditis, OS is considered to be the result of a deficiency of thyroid hormones as well as autoimmunity and the associated inflammation. During the synthesis of thyroid hormones, iodine is oxidized by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX). Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) formed in this reaction is used for the production of thyroid hormones [34]. Excess of  $H_2O_2$ , e.g. due to excessive iodine substitution or deficiency of glutathione peroxidase (GPx, an enzyme involved in the neutralization of hydrogen peroxide and protecting thyroid tissue from oxidative damage), leads to apoptosis and necrosis of thyrocytes. Interestingly, in the presented study we demonstrated a 45% decrease of GPx activity in blood erythrocytes of HT patients, which, in our opinion, largely contributes to the observed increase in the generation of oxygen free radicals ( $\uparrow 76\%$  TOS in serum). In the situation of increased concentration of ROS, particularly  $H_2O_2$ , increased immunogenicity of thyroid specific antigens (thyroglobulin and thyroid peroxidase) and intensified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression are observed, which results in increased generation of antibodies and autoimmune response as well as raises inflammation [35]. The latter, in turn, directly increases  $H_2O_2$  in thyroid epithelial cells and activates NOX in T and B lymphocytes, which further boosts ROS production [5].

The existence and extent of OS can be assessed based on the behavior of numerous biomarkers, including the measurement of the concentration/activity of antioxidants as well as the evaluation of the concentrations of oxidative modification products [36]. The parameters helpful in the assessment of OS are also total antioxidant capacity (TAC), total oxidative status (TOS) and oxidative stress index (OSI) [13]. It has been evidenced that TAC expresses the efficiency of both enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanisms, whereas TOS is the sum of all oxidants present in the sample. OSI illustrates the relationship between antioxidant mechanisms and oxidative molecules [37].

Our results showed a decrease in antioxidant potential (82% ↓TAC) and increased production of free radicals as well as all products of oxidative modifications in the serum of patients with HT in euthyrosis compared to the controls, which confirms a shift in the redox balance towards oxidation and the existence of general OS. Decreased concentration of GSH deserves special attention as the reduction of GSH concentration is considered a causative factor in the development of autoimmune diseases by inhibition of IL-1 and T-cell receptor-mediated transduction signaling [1]. Increased concentration of GSH has been evidenced to be the result of GSH use through oxidation, conjugation or extrusion from the cell, and indicates highly raised OS [38]. Interestingly, we demonstrated a negative correlation between anti-TPO antibody and GSH concentrations, which is consistent with the results of Rostami et al. [1]. According to these authors, their findings prove that the presence of antibodies is a causative factor for excessive ROS production and that GSH is capable of inhibiting complement-mediated damage in HT. They also presume that GSH deficiency may indicate the occurrence of processes leading to oxidative stress activation and the development of immune intolerance.

Interestingly, changes in the salivary redox balance seem to reflect those observed in the blood, but it should be noted that the changes in saliva are more intense. Moreover, the performed analyses did not reveal any correlation between the redox balance parameters in blood and saliva. The lack of correlation proves that oxidative stress in the salivary glands is independent of general oxidative stress in the course of HT.

The large salivary glands together produce about 90% of the total saliva volume. The largest of them – the parotid gland – produces saliva mainly in response to the applied stimulation, hence any changes in stimulated saliva composition and amount are considered to reflect the function of the parotid gland. At rest, 2/3 of the total saliva amount is produced by the submandibular glands. Therefore, any variations in the composition and amount of NWS reflect the functioning of the latter glands [19,39].

The oral cavity is exposed to numerous oxidizing agents capable of generating large amounts of ROS. Evidence showed that salivary and, to some extent, plasma antioxidants constitute an important part of the antioxidant barrier in both oral cavity and the entire body. Px together with CAT neutralizes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed in a dismutation reaction catalyzed by SOD. GSH is the most important low molecular weight salivary antioxidant responsible for maintaining thiol groups of salivary proteins at a reduced level. 40% of total salivary antioxidant barrier is provided by bloodborne UA [6].

Our study demonstrated a reduction in the antioxidant potential of both salivary glands, confirmed by a 34% decrease in TAC in NWS and a 53% decrease in TAC in SWS, which manifests the inefficiency of antioxidant systems of these glands to eradicate ROS. Although we observed significantly increased CAT and Px activities in NWS and SWS, which may – to some extent – prove an adaptive mechanism of the salivary glands in response to excessive ROS production and be of great importance to oral health. The aim of salivary Px and plasma-borne CAT is to maintain salivary H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration at 8 to 14 μM [40]. At higher concentrations, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is highly toxic to oral fibroblasts [41] and epithelial cells [42] isolated from oral mucosal and gingival tissue.

In the euthyrosis status in the course of HT, the causes of reduced antioxidant response should be seen as a result of depletion of the resources in the process of ROS neutralization or of the oxidative modification of polypeptide chains rather than as a result of decreased synthesis caused by reduced production of thyroid hormones. The impaired antioxidant defense may also be caused by non-enzymatic glycation of these enzymes, which explains the negative correlation between SOD activity in SWS and plasma glucose concentration in HT group [43], despite the fact that diabetes as well as insulin resistance were excluded in HT patients. Moreover, the negative correlation between TAC in NWS and SWS and the serum concentration of anti-TPO as well as between GSH and IL-1β concentrations in SWS confirm that the exhaustion of antioxidant sources in salivary glands is related to an elevated oxidative stress level due to autoimmunity-related inflammation and that increased concentration of autoimmune antibodies is a key factor for the enhancement of ROS production.

The results of our study revealed a greater percentage increase in the concentration of TOS and OSI in SWS (↑201% and ↑588%, respectively) compared to NWS (↑81% and ↑191%, respectively) in HT female patients. A greater reduction of GSH concentration in SWS (↓57%) vs. NWS (↓23%) in HT women as well as a negative correlation between AOPP and GSH levels in SWS may be helpful in understanding the intensification of oxidative modifications to proteins in the parotid vs. submandibular salivary glands. It has been evidenced that the main role of GSH is maintaining thiol groups of proteins at a reduced level, i.e. protecting proteins against oxidation. We also found a positive correlation between MDA in NWS and anti-TG, LOOH in SWS as well as between anti-TG and LOOH in SWS and IL-1β concentration in SWS, which proves that oxidative damage to the lipids contained in salivary glands is boosted with an increase in autoimmunity-related inflammation in the course of HT.

The main physiological difference between the parotid and submandibular saliva is the fact that the former type of saliva is secreted mainly during eating, whereas the latter type is produced continuously and is responsible for maintaining the integrity of oral structures [44]. Maintaining the appropriate rate of both types of secretion is therefore equally important for the functioning of the body. Despite a higher intensity of OS and a more pronounced decrease in antioxidant defense in

the parotid glands, the rate of stimulated saliva secretion did not differ significantly between the groups. However, our study demonstrated that HT patients lose the unstimulated salivary gland function. The median values of NWS and SWS secretion were within the standard limits assumed for proper saliva secretion. It is noteworthy that in 15 patients NWS secretion was lower than 0.2 mL/min (but higher than 0.1 mL/min) and 5 HT group patients secreted stimulated saliva at a level lower than 0.7 mL/min, which proves the developed salivary gland failure in these patients, referred to as hyposalivation, and explains the significant intensification of subjective symptoms of reduced saliva secretion reported when completing the survey on dry mouth. The performed analyses excluded Sjögren's syndrome, but, to be 100% certain, a biopsy of the salivary glands would be advisable. However, we were not granted permission for its performance from the Bioethics Committee. Evidence showed that proinflammatory cytokines, including the evaluated IL-1 $\beta$ , induce the activity of metalloproteinases, which leads to changes in the basement membrane of the salivary glands and the structure of receptors for neurotransmitters associated with saliva secretion [45]. A higher increase in IL-1 $\beta$  concentration in NWS ( $\uparrow$ 119%) vs. SWS ( $\uparrow$ 52%) as well as the observed relationship between NWS and IL-1 $\beta$  concentration may confirm the destruction of acinar cell-basement membrane interaction by excessive production of MMPs followed by decreased number of secretory units (acini and ducts) [46,47]. It has also been demonstrated that the presence of IL-1 $\beta$  in the inflamed environment may inhibit the release of acetylcholine from the residual nerves, resulting in reduced saliva secretion [48-50]. The described phenomenon of extracellular matrix remodeling has been demonstrated as a cause of reduced saliva secretion in Sjögren's syndrome patients [51] and reduced activity of muscarinic neurotransmitters/receptors in the submandibular glands of diabetic patients [50].

Changes in salivary amylase activity are considered a determinant of sympathetic nervous system (SNS) activity. The stimulation of  $\beta$ -adrenergic receptor activity results in increased production/secretion and activity of salivary  $\alpha$ -amylase and other salivary proteins [52]. In our study, we observed decreased salivary  $\alpha$ -amylase activity with a simultaneous increase in protein concentration in both SWS and NWS, which could suggest a higher activity of this branch of autonomic nervous system, and not decreased functioning of SNS, even despite decreased salivary  $\alpha$ -amylase activity. The negative correlation between salivary  $\alpha$ -amylase activity and TOS in NWS may suggest that lowered activity of salivary  $\alpha$ -amylase results from the use of this enzyme in the elimination of excessive amounts of ROS ( $\uparrow$  TOS) or, more likely, from the oxidative modification of its polypeptide chain, leading to a loss of / significant reduction in enzymatic activity.

Salivary redox biomarkers are more and more often used in the biomedical diagnosis of systemic diseases. Their clinical usefulness has been demonstrated in patients with hypertension, chronic kidney disease, psoriasis, obesity, dementia, and periodontitis [10,12,15,16,22,48,49,53,54]. The collection of saliva as a diagnostic material is cheap, non-invasive and painless, and saliva can be taken at home without the involvement of medical personnel. In this study we were the first to evaluate the diagnostic utility of salivary redox biomarkers in HT. ROC analysis showed that numerous of the evaluated parameters significantly differentiate Hashimoto patients from the healthy controls matched by age and gender. Special attention should be paid to salivary MDA which, with sensitivity = 94% and specificity = 96%, distinguishes the study group from the control (AUC = 0.99). Furthermore, this parameter correlates positively with the serum level of anti-TG. UA evaluated in SWS is also of a very high diagnostic value as, with sensitivity = 98% and specificity = 100%, it enables to distinguish the studied groups (AUC = 1.0). However, despite the promising results of ROC analysis, further studies are necessary to assess the clinical usefulness of redox biomarkers in more patients.

## 5. Conclusions

Both salivary glands of HT female patients in euthyrosis had impaired ability to maintain the redox status at the level observed in the salivary glands of the control women.

The saliva of patients with HT in euthyrosis demonstrated a reduced antioxidant potential. Moreover, a significant increase in oxidatively modified molecules in NWS and SWS suggests the failure of the salivary gland antioxidant barrier to combat excess ROS production.

OS in NWS and SWS of HT women appears to be closely connected with autoimmunity-related inflammation, and not with the level of thyroid hormones or TSH.

The secretory function of the submandibular glands of HT female patients in euthyrosis is lost, which is manifested as a significant reduction of unstimulated saliva secretion.

Salivary UA and MDA may be potential HT biomarkers. However, further research is required on a larger population of patients.

**Authors contributions:** Conceptualization, A.Z., M.M. K.M., Data curation, A.Z. and M.M.; K.M., Formal analysis, A.Z. and M.M. K.M.; Funding acquisition, A.Z.; M.M. Investigation, K.M., A.Z. and M.M.; Methodology, A.Z., M.M., K.M. Material collection: K.M., Ł.P., A.P-K., Supervision, A.Z., A.P-K., A.K.; Validation, A.Z. and M.M.; Visualization, A.Z. and M.M.; Writing—original draft, K.M., A.Z. and M.M.; Writing—review and editing, K.M., A.Z. and M.M.

**Funding:** This work was supported by the Medical University of Bialystok, Poland (grant number: SUB/1/DN/20/002/1209). Mateusz Maciejczyk, PhD was supported by the Foundation for Polish Science (FNP).

**Conflicts of interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Rostami, R.; Aghasi, M.R.; Mohammadi, A.; Nourooz-Zadeh, J. Enhanced oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis: inter-relationships to biomarkers of thyroid function. *Clin Biochem* **2013**, *46*, 308-312, doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.11.021.
2. Rose, N.R.; Bonita, R.; Burek, C.L. Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmun Rev* **2002**, *1*, 97-103, doi:10.1016/s1568-9972(01)00016-7.
3. Ates, I.; Arikan, M.F.; Altay, M.; Yilmaz, F.M.; Yilmaz, N.; Berker, D.; Guler, S. The effect of oxidative stress on the progression of Hashimoto's thyroiditis. *Arch Physiol Biochem* **2018**, *124*, 351-356, doi:10.1080/13813455.2017.1408660.
4. Asayama, K.; Kato, K. Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism. *Free Radic Biol Med* **1990**, *8*, 293-303, doi:10.1016/0891-5849(90)90077-v.
5. Ates, I.; Yilmaz, F.M.; Altay, M.; Yilmaz, N.; Berker, D.; Guler, S. The relationship between oxidative stress and autoimmunity in Hashimoto's thyroiditis. *Eur J Endocrinol* **2015**, *173*, 791-799, doi:10.1530/eje-15-0617.
6. Knaś, M.; Maciejczyk, M.; Waszkiel, D.; Zalewska, A. Oxidative stress and salivary antioxidants. *Dent Med Problem* **2013**, *50*, 461-466.
7. Lassoued, S.; Mseddi, M.; Mnif, F.; Abid, M.; Guermazi, F.; Masmoudi, H.; El Feki, A.; Attia, H. A comparative study of the oxidative profile in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, and papillary thyroid cancer. *Biol Trace Elem Res* **2010**, *138*, 107-115, doi:10.1007/s12011-010-8625-1.
8. Nanda, N.; Bobby, Z.; Hamide, A. Oxidative stress in anti thyroperoxidase antibody positive hypothyroid patients. *Asian J Biochem* **2012**, *7*, 54-58.
9. Agha-Hosseini, F.; Shirzad, N.; Moosavi, M.S. Evaluation of Xerostomia and salivary flow rate in Hashimoto's Thyroiditis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **2016**, *21*, e1-5, doi:10.4317/medoral.20559.
10. Choromańska, M.; Klimiuk, A.; Kostecka-Sochoń, P.; Wilczyńska, K.; Kwiatkowski, M.; Okuniewska, N.; Waszkiewicz, N.; Zalewska, A.; Maciejczyk, M. Antioxidant defence, oxidative stress and oxidative damage in saliva, plasma and erythrocytes of dementia patients. Can salivary AGE be a marker of dementia? *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18102205.
11. Fejfer, K.; P., B.; Niczyporuk, M.; Ładny, J.R.; Hady, R.H.; Knaś, M.; Waszkiel, D.; Klimiuk, A.; Zalewska, A.; Maciejczyk, M. Oxidative Modification of biomolecules in the nonstimulated and stimulated saliva of patients with morbid obesity treated with bariatric surgery. *BioMed Res Int* **2017**, 10.1155/2017/4923769, doi:10.1155/2017/4923769.
12. Klimiuk, A.; Maciejczyk, M.; Choromanska, M.; Fejfer, K.; Waszkiewicz, N.; Zalewska, A. Salivary Redox Biomarkers in Different Stages of Dementia Severity. *J Clin Med* **2019**, *8*, doi:10.3390/jcm8060840.
13. Knaś, M.; Maciejczyk, M.; Sawicka, K.; Hady Razak, H.; Niczyporuk, M.; Ładny, J.R.; Matczuk, J.; Waszkiel, D.; Żendzian-Piotrowska, M.; Zalewska, A. Impact of morbid obesity and bariatric surgery on antioxidant/oxidant balance of the unstimulated and stimulated saliva. *J Oral Pathol Med* **2016**, *45*, 455-464.
14. Knaś, M.; A., Z.; Waszkiewicz, N.; Szulimowska, J.; J., D.; Sierakowski, S.; Waszkiel, D. Salivary: flow and proteins of the innate and adaptive immunity in the limited and diffused systemic sclerosis. *J Oral Pathol Med* **2014**, *43*, 521-529.
15. Maciejczyk, M.; Szulimowska, J.; Taranta-Janusz, K.; Werbel, K.; Wasilewska, A.; Zalewska, A. Salivary FRAP as A Marker of Chronic Kidney Disease Progression in Children. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2019**, *8*, doi:10.3390/antiox8090409.
16. Maciejczyk, M.; Szulimowska, J.; Skutnik, A.; Taranta-Janusz, K.; Wasilewska, A.; Wisniewska, N.; Zalewska, A. Salivary Biomarkers of Oxidative Stress in Children with Chronic Kidney Disease. *J Clin Med* **2018**, *7*, doi:10.3390/jcm7080209.
17. Maciejczyk, M.; Mikołuc, B.; Pietrucha, B.; Heropolitańska-Pliszka, E.; Pac, M.; Motkowski, R.; Car, H. Oxidative stress, mitochondrial abnormalities and antioxidant defense in Ataxia-teleangiectasia, Bloom syndrome and Nijmegen breakage syndrome. *Redox Biol* **2017**, *11*, 375-383.
18. Zalewska, A.; Knaś, M.; Waszkiewicz, N.; Waszkiel, D.; Sierakowski, S.; Zwierz, K. Rheumatoid arthritis patients with xerostomia have reduced production of key salivary constituents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **2013**, *115*, 483-490.
19. Zalewska, A.; Knaś, M.; Waszkiewicz, N.; Klimiuk, A.; Litwin, K.; Sierakowski, S.; Waszkiel, D. Salivary antioxidants in patients with systemic sclerosis. *J Oral Pathol Med* **2014**, *43*, 61-68.
20. Vitali, C.; Bombardieri, S.; Jonsson, R.; Moutsopoulos, H.M.; Alexander, E.L.; Carsons, S.E.; Daniels, T.E.; Fox, R.I.; Kason, S.S.; Pillemer, S.R., et al. Classification Criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by American-European Consensus Group *AnnRheum Dis* **2002**, *61*, 554-558.
21. Schirmer, O. Studien zur physiologie der tranenabsonderung und tranenabfuhr. *Arch Ophthalmol* **1903**, *56*, 197-221.
22. Klimiuk, A.; Zalewska, A.; Sawicki, R.; Knapp, M.; Maciejczyk, M. Salivary Oxidative Stress Increases With the Progression of Chronic Heart Failure. *J Clin Med* **2020**, *9*, doi:10.3390/jcm9030769.



23. Misra, H.P.; Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **1972**, *247*, 3170-3175.
24. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymol* **1984**, *105*, 121-126.
25. Mansson- Rahemtulla, B.; Baldone, D.C.; Pruitt, K.M.; Rahemtulla, F. Specific assays for peroxidases in human saliva. *Arch Oral Biol* **1986**, *31*, 661-668.
26. Paglia, D.E.; Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* **1967**, *70*, 158-169.
27. Griffith, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* **1980**, *106*, 207-212.
28. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* **2004**, *37*, 227-285.
29. Erel, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* **2005**, *38*, 1103-1111.
30. Kołodziej, U.; Maciejczyk, M.; Niklińska, W.; Waszkiel, D.; Żendzian-Piotrowska, M.; Żukowski, P.; Zalewska, A. Chronic high-protein diet induces oxidative stress and alters the salivary gland function in rats. *Arch Oral Biol* **2017**, *84*, 6-12, doi:<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.09.006>.
31. Kalousová, M.; Skrha, J.; Zima, T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Research* **2002**, *51*, 597-604.
32. Grintzalis, K.; Zisimopoulos, D.; Grune, T.; Weber, D.; Georgiou, C.D. Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. *Free Radic Biol Med* **2013**, *59*, 27-35, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.038.
33. Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **1978**, *52*, 302-310.
34. Duthoit, C.; Estienne, V.; Giraud, A.; Durand-Gorde, J.M.; Rasmussen, A.K.; Feldt-Rasmussen, U.; Carayon, P.; Ruf, J. Hydrogen peroxide-induced production of a 40 kDa immunoreactive thyroglobulin fragment in human thyroid cells: the onset of thyroid autoimmunity? *Biochem J* **2001**, *360*, 557-562, doi:10.1042/0264-6021:3600557.
35. Burek, C.L.; Rose, N.R. Autoimmune thyroiditis and ROS. *Autoimmun Rev* **2008**, *7*, 530-537, doi:10.1016/j.autrev.2008.04.006.
36. Lushchak, V.L. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* **2014**, *224*, 164-175.
37. Knaś, M.; Maciejczyk, M.; Daniszewska, I.; Klimiuk, A.; Matczuk, J.; Kołodziej, U.; Waszkiel, D.; Ładny, J.R.; Żendzian-Piotrowska, M.; Zalewska, A. Oxidative Damage to the Salivary Glands of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes-Temporal Study: Oxidative Stress and Diabetic Salivary Glands. *J Diab Res* **2016**, *10.1155/2016/4583742*, doi:10.1155/2016/4583742.
38. Lushchak, V.L. Classification of oxidative stress based on its intensity. *Exp Clin Sci* **2014**, *13*, 922-937.
39. Matczuk, J.; Żendzian-Piotrowska, M.; Maciejczyk, M.; Kurek, K. Salivary lipids: A review. *Adv Clin Exp Med* **2017**, *26*, 1021-1029, doi:10.17219/acem/63030.
40. Pruitt, K.M.; Tenovuo, J.; Mansson-Rahemtulla, B.; Harrington, P.; Baldone, D.C. Is thiocyanate peroxidation at equilibrium in vivo? *Biochim Biophys Acta* **1986**, *870*, 385-391, doi:10.1016/0167-4838(86)90245-1.
41. Tenovuo, J.; Larjava, H. The protective effect of peroxidase and thiocyanate against hydrogen peroxide toxicity assessed by the uptake of [3H]-thymidine by human gingival fibroblasts cultured in vitro. *Arch Oral Biol* **1984**, *29*, 445-451, doi:10.1016/0003-9969(84)90025-6.
42. Hanstrom, L.; Johansson, A.; Carlsson, J. Lactoperoxidase and thiocyanate protect cultured mammalian cells against hydrogen peroxide toxicity. *Med Biol* **1983**, *61*, 268-274.
43. Erejuwa, O.O.; Gurtu, S.; Sulaiman, S.A.; Ab Wahab, M.S.; Sirajudeen, K.N.; Salleh, M.S. Hypoglycemic and antioxidant effects of honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Vitam Nutr Res* **2010**, *80*, 74-82.
44. Nagler, R.M.; Klein, I.; Zazhevsky, N.; Drigues, N.; Reznick, A.Z. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med* **2002**, *32*, 268-277.
45. Azuma, M.; Aota, K.; Tamatani, T.; Motegi, K.; Yamashita, T.; Ashida, Y.; Hayashi, Y.; Sato, M. Suppression of tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase 9 production in human salivary gland acinar cells by cepharanthine occurs via down-regulation of nuclear factor kappaB: a possible therapeutic agent for preventing the destruction of the acinar structure in the salivary glands of Sjogren's syndrome patients. *Arthritis Rheum* **2002**, *46*, 1585-1594, doi:10.1002/art.10315.
46. Bozzato, A.; Burger, P.; Zenk, J.; Ulter, W.; Iro, H. Salivary gland biometry in female patients with eating disorders. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **2008**, *265*, 1095-1102.
47. Heo, M.S.; Lee, S.C.; Lee, S.S.; Choi, H.M.; Choi, S.C.; Park, T.W. Quantitative analysis of normal major salivary glands using computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2001**, *92*, 240-244, doi:10.1067/moe.2001.114756.
48. Skutnik-Radziszewska, A.; Maciejczyk, M.; Flisiak, I.; Kołodziej, J.K.U.; Kotowska-Rodziewicz, A.; Klimiuk, A.; Zalewska, A. Enhanced Inflammation and Nitrosative Stress in the Saliva and Plasma of Patients with Plaque Psoriasis. *J Clin Med* **2020**, *9*, doi:10.3390/jcm9030745.

49. Skutnik-Radziszewska, A.; Maciejczyk, M.; Fejfer, K.; Krahel, J.; Flisiak, I.; Kolodziej, U.; Zalewska, A. Salivary antioxidants and oxidative stress in psoriatic patients: Can salivary total oxidant status and oxidative stress index be a plaque psoriasis biomarker? *Oxid Med Cell Longev* **2020**, 10.1155/2020/9086024, doi:10.1155/2020/9086024.
50. Watanabe, M.; Yamagishi-Wang, H.; Kawaguchi, M. Lowered susceptibility of muscarinic receptor involved in salivary secretion of streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* **2001**, *87*, 117-124.
51. Hanemaaijer, R.; Visser, H.; Kontinen, Y.T.; Koolwijk, P.; Verheijen, J.H. A novel and simple immunocapture assay for determination of gelatinase-B (MMP-9) activities in biological fluids: saliva from patients with Sjögren's syndrome contain increased latent and active gelatinase-B levels. *Matrix Biol* **1998**, *17*, 657-665, doi:10.1016/s0945-053x(98)90116-0.
52. Skov Olsen, P.; Kirkegaard, P.; Rasmussen, T.; Magid, E.; Poulsen, S.S.; Nexø, E. Adrenergic effects on secretion of amylase from the rat salivary glands. *Digestion* **1988**, *41*, 34-38, doi:10.1159/000199729.
53. Toczewska, J.; Konopka, T.; Zalewska, A.; Maciejczyk, M. Nitrosative Stress Biomarkers in the Non-Stimulated and Stimulated Saliva, as well as Gingival Crevicular Fluid of Patients with Periodontitis: Review and Clinical Study. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2020**, *9*, doi:10.3390/antiox9030259.
54. Toczewska, J.; Konopka, T. Activity of enzymatic antioxidants in periodontitis: A systematic overview of the literature. *Dent Med Probl* **2019**, *56*, 419-426, doi:10.17219/dmp/112151.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Research Article

# Cytokine/Chemokine/Growth Factor Profiles Contribute to Understanding the Pathogenesis of the Salivary Gland Dysfunction in Euthyroid Hashimoto's Thyroiditis Patients

K. Morawska,<sup>1</sup> M. Maciejczyk<sup>2</sup>, S. Zięba,<sup>3</sup> Ł. Popławski,<sup>4</sup> A. Kita-Popławska,<sup>5</sup> J. Krętowski,<sup>5</sup> and A. Zalewska<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Restorative Dentistry, Medical University of Białystok, 24A M. Skłodowskiej-Curie Street, 15-276 Białystok, Poland

<sup>2</sup>Department of Hygiene, Epidemiology and Ergonomics, Medical University of Białystok, 2c Mickiewicza Street,

15-022 Białystok, Poland

<sup>3</sup>Doctoral Studies, Medical University of Białystok, 24A M. Skłodowskiej-Curie Street, 15-276 Białystok, Poland

<sup>4</sup>Department of Radiology, Medical University of Białystok, Poland

<sup>5</sup>Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

<sup>6</sup>Department of Restorative Dentistry and Independent Laboratory of Experimental Dentistry, Medical University of Białystok, 24A M. Skłodowskiej-Curie Street, 15-276 Białystok, Poland

Correspondence should be addressed to M. Maciejczyk; [mat.maciejczyk@gmail.com](mailto:mat.maciejczyk@gmail.com) and A. Zalewska; [azalewska426@gmail.com](mailto:azalewska426@gmail.com)

Received 16 April 2021; Revised 15 June 2021; Accepted 24 June 2021; Published 12 July 2021

Academic Editor: Juliana Schussel

Copyright © 2021 K. Morawska et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Hashimoto's thyroiditis (HT) is one of the most common autoimmune diseases. It is suggested that, in addition to thyroid gland dysfunction, HT is responsible for impaired secretion from the salivary glands. The aim of this study was to evaluate the extent of symptoms of salivary gland dysfunction. We also assessed the relationship between the levels of selected cytokines, chemokines, and growth factors in unstimulated whole saliva (UWS) and the rate of UWS secretion and symptoms of xerostomia in HT patients. The study group consisted of 25 female patients diagnosed with Hashimoto's disease in its spontaneous euthyroid state who had never received hormonal treatment. In more than half of the examined patients, we observed the level of UWS secretion below 0.2 mL/min, indicating impaired secretory function of the salivary glands. Moreover, we demonstrated that the clinical symptoms of salivary gland dysfunction worsen with disease duration. Nevertheless, the inflammatory changes occurring in these glands are independent of general inflammation in the course of HT. Our results clearly indicate an abnormal profile of cytokines, chemokines, and growth factors in the UWS of HT euthyroid women as well as the fact that concentrations of IL-6 and IL-1 as well as INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12 may be potential biomarkers for salivary gland dysfunction in the course of HT. Furthermore, salivary IL-12 (p40) may be helpful in assessing the progression of autoimmunity-related inflammation in the course of HT. In conclusion, secretory dysfunction of the salivary glands is closely related to autoimmunity-related inflammation in the course of HT, which leads to objective and subjective symptoms of dry mouth.

## 1. Introduction

Hashimoto's disease (HT) is classified as T cell mediated and concerns the thyroid gland. It is considered as one of the most frequent autoimmune diseases [1]. It affects approximately 2% of the population and is 5 to 10 times more common in women than men [2]. HT is characterized by the presence of

thyroid autoantibodies, such as thyroid peroxidase antibodies (TPO-Ab) and thyroglobulin antibodies (TG-Ab), which leads to the destruction of THE thyroid tissue. Untreated HT may result in the development of papillary thyroid cancer and thyroid carcinoma [3]. HT is also one of the factors leading to the development of hypertension, cardiovascular diseases, dyslipidemia, obesity, insulin resistance, and depression [4–6].

Moreover, salivary gland involvement in patients with HT has been described in numerous studies. Considering the role of saliva in maintaining oral health, this observation is of utmost importance for both patients and dentists [3, 7, 8]. The quantitative and qualitative deficiency of saliva is a serious problem for the patient, even more so when accompanied by other symptoms of the underlying disease. Commonly observed symptoms associated with salivary gland dysfunction include a fissured, reddened, and sore tongue, atrophic and dry oral mucosa, and increased caries incidence, mainly in the cervical region of the teeth [9, 10]. Patients report difficulty swallowing food bites and eating foods with distinct flavors as well as problems with phonation [11]. The results by Agha-Hosseini et al. [4] as well as our own research [3] demonstrated that the secretory function of the submandibular glands in HT women is impaired. This submandibular gland disturbance of function manifested significantly reduced rate of unstimulated saliva secretion (UWS). By means of objective and quantitative salivary gland scintigraphy, the secretory function of the salivary glands was found to be significantly worsened in HT patients with xerostomia (subjective sensation of dryness) compared to HT patients without xerostomia and healthy subjects with or without xerostomia [7, 12]. Syed et al. [13] argue that clinical suspicion of thyroid disease should be considered in case of a chronic reduction in salivary secretion. Therefore, these authors suggest performing a thyroid function test (hormones, antibodies) if other causes of hyposalivation have been excluded. Our own study also confirmed that both the parotid and submandibular glands of women with euthyroid HT have an impaired ability to maintain redox balance, resulting in increased oxidative modification of salivary proteins, lipids, and genetic material [3]. We associated salivary gland antioxidant dysfunction with autoimmunity-related inflammation, not with levels of thyroid hormones and TSH. Oxidative stress was not the reason for reduced salivary secretion in the course of euthyroid HT [3]. The similarity in genetic and immunopathological background between Sjögren's syndrome (SS) and HT [14–16] suggests that, by analogy with SS, the secretory function of the salivary glands in HT may have an immunological basis. It could be a consequence of impaired secretion of cytokines, chemokines, and growth factors. A decrease in the salivary gland size and increase in the inflammatory infiltrate in the salivary glands were observed in hypothyroid HT tyrosylprotein sulfotransferase knockout mice [17]. Our previous papers showed that salivary gland immunological imbalance leads to secretory dysfunction of these glands not only in the course of SS but also other autoimmune diseases, such as psoriasis [18], rheumatoid arthritis [11], and systemic sclerosis [19]. Salivary levels of selected cytokines, chemokines, or growth factors in the course of HT have not yet been determined. In the light of the aforementioned facts, such determination seems necessary in order to understand the involvement of immunological mechanisms in the development of salivary gland dysfunction in this disease. One of the aims of the presented publication was to assess the degree of salivary gland dysfunction and the occurrence of subjective and objective symptoms of salivary gland dysfunction in spontaneously euthyroid HT patients never subjected to hormonal treatment.

The study described below was further designed to assess whether or not the obtained salivary concentrations of selected cytokines, chemokines, and growth factors may be connected with the rate of UWS and symptoms of xerostomia. Furthermore, given that salivary biomarkers are used in the diagnosis of numerous systemic diseases, the secondary objective of this study was to determine whether salivary levels of cytokines, chemokines, and growth factors may present any diagnostic value when comparing the saliva of euthyroid HT female patients to that of women in the control group.

## 2. Materials and Methods

The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Białystok (permission number: R-I-002/386/2016). Each patient and control group participant had been informed about the aims and methodology of the presented experiment and gave written consent to participate in the study.

The study group consisted of 25 female patients diagnosed with Hashimoto's thyroiditis. The diagnosis of the disease was based on a positive result of an ultrasound examination (confirming the presence of parenchymal heterogeneity) and finding blood levels of TPO-Ab and TG-Ab antibodies above the laboratory norm. The selected patients were women with euthyroid HT (free thyroxine, fT4 and thyroid stimulating hormones, TSH within the laboratory norm levels) who, importantly, had never been treated with synthetic or natural thyroid hormones or had any other treatments applied. Patients were referred for periodic check-ups to the Department of Endocrinology, Diabetology, and Internal Medicine at the Medical University of Białystok. The control group consisted of 25 generally healthy women, matched to the study group in terms of age and BMI, who attended dental check-ups at the Department of Restorative Dentistry at the Medical University of Białystok. The participants from the control group had normal results of thyroid ultrasound as well as blood levels of TPO-Ab, TG-Ab, fT4, and TSH in normal range for healthy individuals.

Eligibility for the study was preceded by the collection of whole blood from an ulnar vein (for hormone and antibody as well as biochemical determinations), ultrasound examination, and dental examination. Participants of the study had 10 mL samples of venous blood collected into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. Blood for biochemical determinations was centrifuged ( $1500 \times g$ , 4 C, 10 minutes), and the obtained plasma was stored at  $-84$  C for no longer than 4 months, until assayed. A total of 82 female HT patients and 82 control patients were studied. 10 patients had hypothyroid HT, 25 had euthyroid HT treated with hormones, and 15 had BMI > 25. Therefore, 34 patients with HT in the state not requiring hormonal treatment and 34 control subjects of corresponding age and BMI were qualified for the study.

Serum/plasma TSH, free T4 and T3, TPO-Ab, TG-Ab, SSA/Ro-Ab, SSB/La-Ab, glucose, insulin, HOMA-IR, vitamin 25 (OH)D3, TG, and CRP were quantified by using an Abbott analyzer (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany).

On the same day, a dental examination was performed, including the measurements of DMFT (Decay, Missing,

Filled Teeth) index, API (Approximal Plaque Index) index of oral hygiene, pocket probing depth (PPD), and gingival sulcus bleeding index (SBI) (Table 1). The examination was performed by one dentist (K. M.) who had obtained a suitable training beforehand, and an interrater examination was conducted in 15 randomly selected study participants with another dentist (A. Z.). The interrater reliability for DMFT was  $r = 0.97$ , for SBI  $r = 0.93$ , for API  $r = 0.96$ , and for PPD  $r = 0.95$ .

Based on the dental measurements, 9 HT patients were excluded from the study group due to the presence of periodontal disease and 8 from the control group because of poor oral hygiene and presence of multiple dental deposits. HT patients had no other diseases, including autoimmune diseases, and—as noted above—their BMI was within the range indicating normal body weight (18.5–25). Both the patients and control group members were individuals with healthy periodontium and had no candidiasis and inflammation in the oral mucosa. HT patients and control subjects did not take medications on a permanent basis, including those affecting saliva secretion. The examination was performed in the second phase of the menstrual cycle, precisely between the 18th and 25th day. During 6 months preceding the research, they had not been on a weight-loss diet and had not significantly changed their lifestyle (in terms of diet, physical activity, and place of work or residence). The subjects were nonsmokers, consumed alcohol only occasionally (a glass of wine or a pint of beer at the weekend), and were not addicted to other stimulants. The clinical characteristics of patients and participants from the control group are presented in Table 2.

**2.1. Collection of UWS.** Saliva was collected one day after blood collection and dental examination, i.e., only from participants qualified for the study. UWS was collected between 7 a.m. and 9 a.m. The subjects had the collection performed on an empty stomach (last meal at least 10 hours before) and did not perform any oral hygiene procedures on this day other than rinsing the mouth with water. Saliva collection took place in a separate surgery. Upon arrival, each participant rested for 5 minutes and rinsed the mouth 5 times with water at room temperature. In a sitting position, the participant spat out saliva accumulated at the bottom of the mouth into a centrifuge tube placed in a container with ice. The saliva collection time was 15 minutes. Prior to centrifugation, the volume of obtained saliva was measured (with a calibrated pipette). This measurement allowed the rate of saliva secretion to be determined, by dividing the volume of collected saliva by the time taken to obtain it. The saliva was centrifuged for 20 minutes at 4 °C, 10000 × g. Next, the supernatant was collected and frozen at -84 °C for no longer than 4 months, until assayed.

To assess the prevalence of xerostomia, participants were asked to complete a questionnaire regarding the presence of dry mouth symptoms listed in the American-European classification criteria for Sjögren's syndrome [11, 20], and the Clinical Oral Dryness Score (CODS) was measured (K. M.) according to Osailan et al. [10] (Table 1). An interrater examination with another dentist (A. Z.) was conducted in 15 ran-

domly selected study participants. The interrater reliability for CODS was  $r = 0.96$ .

**2.2. Biochemical Methods.** Salivary and plasma cytokines, chemokines, and growth factors were analyzed using the Bio-Plex® Multiplex System according to the manufacturer's instructions. Bio-Plex Pro Human Cytokine Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) is a multiplex assay based on magnetic beads whose performance can be compared to a typical ELISA. Captured antibodies directed against a specific biomarker are covalently bound to magnetic beads. The coupled beads then react with the sample containing the selected biomarker. A series of rinses is performed in order to remove the unbound protein, and then a biotinylated detection antibody is added to create a sandwich complex. The final complex is formed by adding streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) conjugate. Data from the reactions are acquired using a dedicated plate reader (Bio-Plex 200) and high-speed digital signal processor.

The concentration of total nitric oxide (NO) in saliva and plasma was determined indirectly using sulfanilamide and NEDA·2HCl (N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride). In this assay, stable degradation products of  $\text{NO}_3^-$  were measured. Absorbance was analyzed at 490 nm [21, 22]. Total protein concentration was determined colorimetrically (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

**2.3. Statistical Analysis.** GraphPad Prism 8.3.0 for MacOS (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA) was used for statistical analysis. The normality of the distribution was assessed using the Shapiro–Wilk test. For comparison of the quantitative variables, Mann–Whitney  $U$  test was used. The statistical significance level was established at  $p < 0.05$ . The relationship between the assessed parameters was evaluated using the Spearman rank correlation coefficient. In order to determine the diagnostic utility of salivary/plasma cytokines, receiver operating characteristic (ROC) curves were drawn, and the area under the curve (AUC) was calculated. Multivariate analysis of the simultaneous impacts of many independent variables on one quantitative dependent variable was made by the means of linear regression. HT duration, TPO-Ab, TPO-AB, UWS flow, and CODS were included as independent variables. The number of subjects in the groups was determined based on our previous experiment, assuming that the power of the test was 0.9 and  $\alpha = 0.05$ . The ClinCalc online calculator was used, and the minimum number of participants per group was 21.

### 3. Results

**3.1. Stomatological Findings.** The secretion of UWS by female patients with Hashimoto's disease was significantly (66%) lower than in the control group ( $p = 0.009$ ). Moreover, 15 women from the study group had UWS level below 0.2 mL/min, which means that hyposalivation, i.e., secretory dysfunction of the salivary glands, could be confirmed in 60% of the study participants (Table 1).

Table 1: Stomatological characteristics of patients and control group participants (UWS: unstimulated saliva; TP: total protein; CODS: Clinical Oral Dryness Score; DMFT: Decayed, Missing, Filled Teeth; API: approximal plaque index; SBI: sulcus bleeding index, PPD: periodontal pocket depth; NS: statistically insignificant).

	Control, <i>n</i> = 25	HT, <i>n</i> = 25	<i>p</i>
UWS mL/min	0.67 (0.46–0.89)	0.27 (0.1–0.61)	<0.0001
No. of women (%) with hyposalivation (UWS < 0.2 mL/min)	0 (0)	15 (60)	<0.00001
TP NWS (mg/mL)	895 (658.23–1250.1)	1400 (1002.1–1600.56)	<0.0001
CODS (1–10)	0	6 (1–10)	<0.0001
No. of women with CODS ≥ 5	0	13	<0.0001
No. of women with CODS ≥ 1 ≤ 4	0	8	<0.001
Subjective oral dryness, <i>n</i> (%)	0 (0)	20 (80)	<0.0001
DMFT	18 (15–25)	16 (14–25)	NS
API	24.56 (0–30)	21.54 (0–32)	NS
SBI	0.45 (0–1)	0.33 (0–1)	NS
PPD (mm)	2.0 (0.5–2.5)	2.0 (0.5–2.5)	NS

Table 2: Clinical characteristics of the participants of the study (HT: Hashimoto patients; BMI: body mass index; TSH: thyroid-stimulating hormone; TPO-Ab: thyroid peroxidase antibody; TG-Ab: thyroid peroxidase antibody; SSA/Ro-Ab: anti-Sjögren's syndrome type A antibody; SSB/La-Ab: anti-Sjögren's syndrome type B antibody; HOMA-IR: homeostatic model assessment index; TG: triglyceride; NO: nitric oxide; UWS: unstimulated whole saliva; ND: not detectable; NS: statistically insignificant).

	Control, <i>n</i> = 25 M (min-max)	HT, <i>n</i> = 25 M (min-max)	<i>p</i>
Age (years)	34.3 (27.2–42)	34.5 (27.8–41.5)	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.5 (19.35–23.96)	21.7 (19.2–24.61)	NS
TSH (μU/mL)	1.23 (0.48–2.3)	1.56 (0.7–2.99)	NS
Free T4 (ng/mL)	1.36 (1.1–1.39)	1.26 (0.76–1.62)	NS
Free T3 (pg/mL)	2.26 (1.75–3.96)	2.86 (2.63–4.51)	NS
TPO-Ab (IU/mL)	0.5 (0.36–2.51)	625.6 (132.4–768)	<0.0001
TG-Ab (IU/mL)	0.4 (0.23–1.91)	318.3 (145.8–437)	<0.0001
SSA/Ro-Ab	ND	ND	
SSB/La-Ab	ND	ND	
Glucose (mg/dL)	79.56 (72.35–85.01)	83.01 (73.56–88.05)	NS
Insulin (mU/mL)	4.25 (3–11.2)	3.89 (3–10.9)	NS
HOMA-IR	0.89 (0.53–2.41)	0.8 (0.51–2.39)	NS
Witamin 25-OH D3 (ng/mL)	47 (32–51.1)	42.98 (30–50)	NS
TG (mg/dL)	52 (39–79.56)	49 (36–85.21)	NS
CRP mg/L	0.4 (0.2–0.8)	0.63 (0.23–0.92)	NS
HT duration (years)	0	5.8 (3.8–8.3)	<0.0001
Thyroid gland's nodules	ND	ND	
NO UWS (μmol/mg protein)	0.15 (0.01–0.08)	0.26 (0.02–0.56)	0.0011
NO plasma (μmol/mg protein)	0.09 (0.014–0.19)	0.08 (0.016–0.24)	0.9082

Protein concentration in UWS of HT patients was significantly (56%) higher than in the control group ( $p = 0.008$ ) (Table 1).

CODS demonstrated a significantly higher intensity of objective dry mouth symptoms in HT patients compared to the control group ( $p = 0.001$ ). Subjective sensation of dry mouth was reported only in the group of patients with Hashimoto's disease and affected 80% of the subjects ( $p = 0.001$ ) (Table 1).

The analysis of the results obtained during the dental examination revealed no significant differences in the DMFT, API, SBI, and PPD indices (Table 1, Table S7).

### 3.2. Saliva

3.2.1. Cytokines. Significantly elevated levels of cytokines associated with Th1 lymphocyte activation (IL-3, IFN-γ) were found in UWS of HT patients compared to the control

group ( $\uparrow 35\%$ ,  $p = 0.0074$ ,  $\uparrow 85\%$   $p \leq 0.0001$ , respectively). The study group achieved considerably higher levels of interleukins connected with Th2 lymphocyte activation (IL-5, IL-6) compared to healthy controls ( $\uparrow 40\%$ ,  $p = 0.015$ ,  $\uparrow 54\%$ ,  $p = 0.0187$ , respectively). Similarly, significantly increased levels of TNF- $\alpha$  (which is a cytokine associated with Th17 lymphocyte stimulation) were observed in UWS of HT patients compared to the control group ( $\uparrow 93\%$ ,  $p = 0.0003$ ). In addition, significantly higher levels of IL-12 (p40), HGF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-1RA were found in UWS of study group patients compared to the control group ( $\uparrow 57\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $\uparrow 38\%$ ,  $p = 0.0012$ ,  $\uparrow 38\%$ ,  $p = 0.0223$ ,  $\uparrow 54\%$ ,  $p = 0.0223$ ,  $\uparrow 34\%$ ,  $p = 0.0071$ , respectively). Of all cytokines tested, only salivary IL-8 and IL-10 levels reached significantly lower values in UWS of HT patients compared to healthy controls ( $\downarrow 21\%$ ,  $p = 0.0429$ ,  $\downarrow 69\%$ ,  $p = 0.0049$ , respectively). Concentrations of the other cytokines measured in UWS: IL-2, IL-2RA, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN- $\alpha 2$ , MIF, and TNF- $\beta$  did not differ significantly between the two groups (Table 3). The levels of IL-18, IFN- $\alpha 2$ , MIF, and TNF- $\beta$  were not significantly different between both groups (Table 3).

**3.2.2. Chemokines.** Concentrations of both CCL27/CTACK and CXCL1/Gro- $\alpha$  were significantly higher in UWS of HT patients compared to the controls ( $\uparrow 19\%$ ,  $p = 0.0195$ ,  $\uparrow 74\%$ ,  $p = 0.0005$ , respectively). Salivary levels of CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ ,  $\beta$ -NGF, CCL5/RANTES, SCF, SCGF- $\beta$ , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, LIF, and CXCL12/SDF-1 $\alpha$  reached similar values in both study groups (Table 4).

**3.2.3. Growth Factors.** Concentrations of G-CSF and M-CSF in plasma of HT patients were significantly higher compared to the controls ( $\uparrow 29\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $\uparrow 30\%$ ,  $p = 0.0223$ , respectively). The levels of the other growth factors assayed: FGF, GM-CSF, PDGF-BB, VEGF, and TRIAL reached similar values in both study groups (Table 5).

### 3.3. Plasma

**3.3.1. Cytokines.** Plasma concentrations of cytokines responsible for Th1 lymphocyte activation (IL-3, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ ) in HT patients were significantly elevated compared to healthy controls ( $\uparrow 36\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $\uparrow 43\%$ ,  $p = 0.0001$ ,  $\uparrow 46\%$ ,  $p = 0.0028$ , respectively). Plasma levels of IL-5, IL-6, and IL-13 (responsible for activating Th2 lymphocytes) in the study group were considerably higher compared to the control group ( $\uparrow 36\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $\uparrow 51\%$ ,  $p = 0.003$ ,  $\uparrow 26\%$ ,  $p = 0.0161$ , respectively). Significantly higher plasma levels of TNF- $\alpha$  (which participated in the activation of Th17 lymphocytes) were observed in HT patients compared to the controls ( $\uparrow 79\%$ ,  $p = 0.0001$ ). Furthermore, plasma levels of IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2RA, IL-12 (p40), IL-12 (p70), and HGF in study group patients were significantly higher compared to the control group ( $\uparrow 39\%$ ,  $p = 0.017$ ,  $\uparrow 43\%$ ,  $p = 0.02$ ,  $\uparrow 9\%$ ,  $p = 0.0389$ ,  $\uparrow 28\%$ ,  $p = 0.0211$ ,  $\uparrow 49\%$ ,  $p = 0.0102$ ,  $\uparrow 28\%$ ,  $p \leq 0.0001$ , respectively). Only IL-8, IL-10, and IL-17 concentrations were significantly lower in plasma of study group patients compared to the controls ( $\downarrow 60\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $\downarrow 31\%$ ,

$p = 0.0004$ ,  $\downarrow 18\%$ ,  $p = 0.0466$ , respectively). The cytokine levels of IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-16, IL-18, IFN- $\alpha 2$ , and MFI reached similar values in the plasma of both HT and control subjects (Table 3).

**3.3.2. Chemokines.** Both CCL2/MCP-1 and SCF levels were significantly higher in the plasma of HT patients compared to the control group ( $\uparrow 75\%$ ,  $p = 0.0189$ ,  $\uparrow 74\%$ ,  $p \leq 0.0001$ , respectively). Similarly, plasma CCL27/CTACK and LIF concentrations in the study group were significantly increased compared to healthy controls ( $\uparrow 101\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $\uparrow 42\%$ ,  $p = 0.0066$ , respectively). Plasma levels of the chemokines CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ ,  $\beta$ -NGF, CCL5/RANTES, SCGF- $\beta$ , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL27/CTACK, CXCL1/Gro- $\alpha$ , CXCL9/MIG, and CXCL10/IP-10 did not differ significantly between the two groups (Table 4).

**3.3.3. Growth Factors.** Concentrations of G-CSF and M-CSF in plasma of HT patients were significantly higher compared to the controls ( $\uparrow 29\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $\uparrow 30\%$ ,  $p = 0.0223$ , respectively). The levels of the other growth factors: FGF, GM-CSF, PDGF-BB, VEGF, and TRIAL reached similar values in both study groups (Table 5).

**3.4. NO.** Concentration of NO in the UWS of HT women was significantly higher compared to the control ( $p = 0.001$ ), whereas in plasma, it did not differ between groups (Table 2).

**3.5. ROC Analysis.** We used ROC analysis to examine the diagnostic utility of the assessed cytokines, chemokines, and growth factors. The data of ROC analysis are presented in the supplementary materials (Table S1-S6). Many biomarkers differentiate Hashimoto's patients from healthy controls with high sensitivity and specificity. However, salivary IFN- $\gamma$ , IL-12 (p40), and TNF- $\alpha$  and plasma CTACK, SCF, G-CSF, HGF, IL-8, TNF- $\alpha$ , and IL-3 deserve special attention. Indeed, IFN- $\gamma$  assessed in UWS with 84% sensitivity and 84% specificity distinguishes study group from healthy controls (AUC = 0.9104).

**3.6. Multifactorial Regression Analysis.** The results of multi-factorial regression analysis of salivary inflammatory bio-markers are presented in Table S12. Interestingly, IL-6 and IL-1 $\beta$  levels significantly depend on HT duration, UWS flow, and CODS, while IFN- $\gamma$  on disease duration and UWS flow. Salivary TNF- $\alpha$  statistically depends on TG-Ab and UWS flow rate, while the IL-12 level only on salivary flow (Table S12).

**3.7. Correlations.** In the group of HT patients, a negative correlation was observed between TPO-Ab levels and the rate of UWS secretion, as well as a negative correlation between salivary concentration of IL-6 and the rate of UWS secretion. Similarly, in this group, the level of salivary IL-1 $\alpha$  negatively correlated with the rate of UWS secretion. Moreover, in the study group, we found a negative correlation between the CODS and the rate of UWS secretion and a positive correlation between the CODS and the disease duration. In patients with euthyroid HT, there was a positive

Table 3: Effect of Hashimoto's disease on cytokine levels in saliva and plasma. IL: 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1RA, 2, 2RA, 3,4, 5,6,7,8,9, 10, 12 (p40), 12 (p70), 13, 15, 16, 17, 18-interleukin; 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1RA, 2, 2RA, 3,4, 5,6,7,8,9, 10, 12 (p40), 12 (p70), 13, 15, 16, 17, 18; IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ ; IFN- $\alpha$ 2: interferon- $\alpha$ 2; TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ,  $\beta$ ; HGF: hepatocyte growth factor; MIF: macrophage migration inhibitory facto,; ND: no detectable.

	Control group		Saliva Study group		$p$ value	Control group		Plasma Study group		$p$ value
	Mean $\pm$ SD	Median (min-max)	Mean $\pm$ SD	Median (min-max)		Mean $\pm$ SD	Median (min-max)	Mean $\pm$ SD	Median (min-max)	
IL-3	35:11 $\pm$ 11:41	38.88 (7-56)	47:33 $\pm$ 17:3	45 (13-80)	0.0074	26:72 $\pm$ 4:009	27.47(19.79-35.24)	36:28 $\pm$ 9:588	36.01 (19.1-58.72)	<0.0001
IFN- $\gamma$	25:12 $\pm$ 8:914	23.57 (12.23-54.5)	46:5 $\pm$ 15:09	43.54(19.11-81.46)	<0.0001	164:4 $\pm$ 50:86	169.5 (43.5-236)	235:9 $\pm$ 69:13	233.2 (123-427.9)	0.0001
IL-5	6:065 $\pm$ 1:85	6.05 (0.6-9.4)	8:49 $\pm$ 3:975	8.6(1.2-15.65)	0.015	106:4 $\pm$ 75:49	94.43(7.968-320.2)	160:3 $\pm$ 67:12	158.5(41.24-301.3)	0.003
IL-6	72:01 $\pm$ 27:06	73.59 (19-136)	110:8 $\pm$ 69:45	103 (17-297)	0.0187	3:065 $\pm$ 0:6913	3.147(1.568-4.517)	5:051 $\pm$ 2:172	5.202(0.7955-9.66)	0.0002
TN- $\alpha$	8:173 $\pm$ 5:213	6.975(0.625-21.68)	15:79 $\pm$ 8:211	15.15 (1.28-37.39)	0.0003	12:5 $\pm$ 5:202	12.63(6.019-27.13)	22:32 $\pm$ 8:808	21.27(6.815-38.84)	<0.0001
IL-12 (p40)	12:45 $\pm$ 4:186	12 (6.614-21.75)	19:5 $\pm$ 5:242	19.5(8.004-29.9)	<0.0001	13:61 $\pm$ 3:629	13.81(8.131-21.28)	17:41 $\pm$ 6:56	17.59(6.718-33.75)	0.0211
HGF	3:908 $\pm$ 0:9919	3.842(1.599-6.273)	5:412 $\pm$ 1:614	5.373(3.063-8.694)	0.0012	60:7 $\pm$ 6:446	60.69(43.81-74.71)	77:82 $\pm$ 9:324	75.83(66.35-103.7)	<0.0001
IL-1 $\alpha$	760:6 $\pm$ 360:9	766.1 (189.2-1375)	1054 $\pm$ 441:2	1148(408.2-2182)	0.0223	328 $\pm$ 227:5	271 (15-970)	458:5 $\pm$ 346	417.5 (39.38-1619)	0.0741
IL-1 $\beta$	99:04 $\pm$ 65:47	74.05(22.53-245.4)	153:2 $\pm$ 86:18	153.3(28.93-343.5)	0.0223	17:54 $\pm$ 9:707	17.28(1.302-33.61)	24:46 $\pm$ 8:32	24.38(8.663-48.13)	0.017
IL-1RA	5170 $\pm$ 1847	5071 (917-7936)	6951 $\pm$ 2239	6707 (3196-10575)	0.0071	13:49 $\pm$ 7:875	12.01 (0.7689-31.98)	19:32 $\pm$ 8:643	17.87(4.071-40.51)	0.02
IL-8	1564 $\pm$ 913:3	1479(87.75-3855)	1230 $\pm$ 1167	882 (21-5426)	0.0429	24:43 $\pm$ 8:201	25.36(6.595-38.56)	9:871 $\pm$ 7:801	7.724 (-5.24-27.19)	<0.0001
IL-10	28:49 $\pm$ 10:39	26.5 (10.22-47)	19:69 $\pm$ 9:166	19 (2.235-40.22)	0.0049	34:42 $\pm$ 9:252	35.14(13.04-49.94)	23:61 $\pm$ 11:09	21.76(4.953-47.42)	0.0004
IL-2	27:58 $\pm$ 10:46	30 (4-46)	30:23 $\pm$ 12:54	29(9.218-58)	0.6685	116:7 $\pm$ 48:75	129.7(18.51-189.3)	140:9 $\pm$ 64:07	144.7(25.42-298.6)	0.1213
IL-2RA	39:98 $\pm$ 20:56	37.13(3.823-86.66)	40:09 $\pm$ 20:86	39(2.598-87)	0.9578	28:35 $\pm$ 3:504	27.91(22.57-34.75)	30:79 $\pm$ 5:045	32.49(19.24-37.89)	0.0389
IL-4	16:22 $\pm$ 7:095	15 (2-33.5)	19:85 $\pm$ 7:338	18 (9-36)	0.0625	23:97 $\pm$ 4:79	24.39(15.87-31.69)	26:25 $\pm$ 11:21	26.8 (1.017-47.67)	0.3067
IL-7	17:91 $\pm$ 4:275	18(9.391-25)	17:8 $\pm$ 8:887	16.5 (4.807-42)	0.455	5:099 $\pm$ 2:223	4.495(1.972-10.08)	7:364 $\pm$ 4:663	6.964 (0.6749-17.65)	0.1035
IL-9	45:98 $\pm$ 17:78	47(16.48-82)	53:85 $\pm$ 21:96	55(12.07-99)	0.1806	49:19 $\pm$ 20:28	48.04(21.43-91.61)	55:94 $\pm$ 25:79	58.96(8.061-92.59)	0.2799
IL-12 (p70)	22:59 $\pm$ 8:404	22.79 (3.101-36.6)	25:25 $\pm$ 7:734	24 (9.988-36.5)	0.2907	16:17 $\pm$ 6:58	16.96(3.493-30.17)	24:02 $\pm$ 11:11	20.41(2.664-44.17)	0.0102
IL-13	1:013 $\pm$ 0:4813	1.027 (0.3138-1.833)	1:287 $\pm$ 0:7352	1.137(0.1965-2.41)	0.2022	9:829 $\pm$ 4:507	9 (3.549-21.14)	12:41 $\pm$ 3:768	12 (5.41-22)	0.0161
IL-15	10:72 $\pm$ 5:484	10.2 (0.473-23)	12:35 $\pm$ 9:511	9.6(2.85-35.3)	0.7619	ND	ND	ND	ND	ND
IL-16	981:3 $\pm$ 515:6	941.6 (80.27-2125)	1095 $\pm$ 594:9	1012(235.8-2163)	0.5253	161:6 $\pm$ 127:1	129(11.15-587)	175:3 $\pm$ 165:5	141.5 (5.34-780)	>0.9999
IL-17	ND	ND	ND	ND	ND	33:74 $\pm$ 11:03	29.5 (21.41-58)	27:58 $\pm$ 12:11	26.6(8.334-56.7)	0.0466
IL-18	369:3 $\pm$ 379:1	331.5 (10.73-1999)	399:7 $\pm$ 403:2	280 (4.705-1829)	0.9847	20:7 $\pm$ 9:127	22.17(3.895-33.62)	23:2 $\pm$ 14:99	21.47(2.131-57.12)	0.6581
IFN- $\alpha$ 2	4:61 $\pm$ 0:9551	4.539(2.918-7.328)	5:053 $\pm$ 1:844	5.054(1.601-10.47)	0.3859	22:81 $\pm$ 6:25	22.29(9.482-34.99)	22:71 $\pm$ 7:463	21.31(2.789-39.93)	0.8777
MIF	759:7 $\pm$ 323:3	661 (258.2-1424)	750:5 $\pm$ 538:5	601 (119.5-2221)	0.4185	196:5 $\pm$ 78:99	208 (44.66-340.8)	206:2 $\pm$ 79:61	184.4(81.59-359.2)	0.8929
TNF- $\beta$	5:702 $\pm$ 1:994	5.986 (0.7912-9.791)	7:135 $\pm$ 2:727	7.033(1.758-11.87)	0.0925	6:692 $\pm$ 2:137	6.997 (1.33-10.08)	9:793 $\pm$ 4:96	10.01 (-2.785-17.23)	0.0028



Table 4: Effect of Hashimoto's disease on chemokine levels: CCL27/CTACK: chemokine ligand 3/monocyte chemoattractant protein-1; CCL3/MIP-1- $\alpha$ : chemokine ligands 3/macrophage inflammatory protein1-alpha; CCL4/MIP-1  $\beta$ : chemokine ligands 4/macrophage inflammatory protein1  $\beta$ ;  $\beta$ -NGF:  $\beta$ -nerve growth factor; CCL5/RANTES: chemokine ligand 5/regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; SCF: stem cell factor; SCGF- $\beta$ : stem cell growth factor- $\beta$ ; CCL7/MCP-3: chemokine ligand 7/monocyte-chemotactic protein 3; CCL11/eotaxin: chemokine ligand 11/eotaxin; CCL27/CTACK: chemokine ligand 27/cutaneous T cell-attracting chemokine; CXCL1/GRO- $\alpha$ : chemokine (C-X-C motif) ligand 1/growth-regulated oncogene-alpha; CXCL9/MIG: chemokine (C-X-C motif) ligand 9/monokine induced by gamma interferon; CXCL10/IP-10: chemokine (C-X-C motif) ligand 10/interferon gamma-induced protein 10; LIF: leukemia inhibitory factor; CXCL12/SDF-1  $\alpha$ : chemokine (C-X-C motif) ligand 12/stromal cell-derived factor 1; ND: no detectable.

	Control group		Saliva Study group		<i>p</i> value	Control group		Plasma Study group		<i>p</i> value
	Mean $\pm$ SD	Median (min-max)	Mean $\pm$ SD	Median (min-max)		Mean $\pm$ SD	Median (min-max)	Mean $\pm$ SD	Median (min-max)	
CCL27/CTACK	17.80 $\pm$ 5.689	18.08(8.970-33.69)	21.23 $\pm$ 6.034	20.27 (11.53-36.62)	0.0195	70.22 $\pm$ 15:1	72.93(39.18-111.6)	141.2 $\pm$ 71:73	128.3 (60-375.5)	<0.0001
CXCL1/Gro- $\alpha$	8545 $\pm$ 3904	8235 (1768 -15622)	14898 $\pm$ 6761	15456 (3393-30180)	0.0005	17772 $\pm$ 7093	18731 (3763-33741)	19882 $\pm$ 7155	21785 (4134-29760)	0.2092
CCL2/MCP-1	703 $\pm$ 360:5	707.8 (198-1490)	727:7 $\pm$ 618:5	677(24.52-2896)	0.7583	4:51 $\pm$ 2:51	4.557 (0.2395-9.026)	7:915 $\pm$ 4:844	5.865(1.748-19.22)	0.0189
CCL3/MIP-1 $\alpha$	33:89 $\pm$ 22:89	28 (5.895-118.5)	44:79 $\pm$ 67:19	28(7.238-354)	0.7914	123:6 $\pm$ 71:94	120.1(11.45-268.1)	141.2 $\pm$ 92:17	141.4(5.762-375.2)	0.5768
CCL4/MIP-1 $\beta$	63:07 $\pm$ 26:34	54.5 (27.5-138)	61:73 $\pm$ 31:01	63 (2.401-129.5)	0.8362	124 $\pm$ 79:66	117 (16.15-276.7)	136:5 $\pm$ 87:9	140.4(16.26-332.6)	0.6721
$\beta$ -NGF	62:03 $\pm$ 23:58	66 (8.513-116.3)	70:33 $\pm$ 36:36	61 (8.457-143.3)	0.4973	84:27 $\pm$ 48:49	82.24(6.667-179.1)	103:6 $\pm$ 52:8	99.81(33.11-275.2)	0.263
CCL5/RANTES	2:94 $\pm$ 1:038	2.927(0.394-4.531)	3:48 $\pm$ 1:46	3.201 (1.084-6.698)	0.2218	1550 $\pm$ 620:2	1470(519.6-2704)	1978 $\pm$ 915:4	1740(465.3-4047)	0.0916
SCF	77:67 $\pm$ 39:69	72(5.96-150)	89:36 $\pm$ 79:58	76(6.221-314)	0.7914	32:98 $\pm$ 9:754	33.06(17.22-50.29)	57:39 $\pm$ 19:22	55.61(27.62-89.57)	<0.0001
SCGF- $\beta$	63:07 $\pm$ 26:34	54.5 (27.5-138)	61:73 $\pm$ 31:01	63 (2.401-129.5)	0.8362	539:4 $\pm$ 316:7	560.9 (43.81-1213)	660:2 $\pm$ 270:4	658.4 (150.4-1260)	0.2467
CCL7/MCP-3	18:04 $\pm$ 5:184	18(9.874-30)	20:1 $\pm$ 5:504	19.5 (10.93-30.9)	0.1931	639:5 $\pm$ 136:9	619.5(275.5-879.5)	697:3 $\pm$ 195:3	731.6(206.5-952.3)	0.1077
CCL11/Eotaxin	20:05 $\pm$ 6:526	19.99(8.792-37.74)	21:89 $\pm$ 9:195	18.03 (9.54-43.23)	0.8475	72:15 $\pm$ 22:91	68.86(15.32-120.1)	82:09 $\pm$ 32:24	75.98 (39.9-159.7)	0.441
CXCL9/MIG	608:7 $\pm$ 655:1	333.5 (17.5-3001)	1090 $\pm$ 1552	542.5 (74.97-7798)	0.3254	101:1 $\pm$ 92:73	68.06(4.366-413.3)	133:7 $\pm$ 72:15	144 (18.91-307.8)	0.0568
CXCL10/IP-10	6686 $\pm$ 3147	6608 (1730-12452)	9053 $\pm$ 5665	7868(833.7-23044)	0.1954	566:8 $\pm$ 346:5	542 (12.02-1490)	742:9 $\pm$ 648:9	574. (12.51-2896)	0.444
LIF	20:42 $\pm$ 10:76	19 (2.161-45.5)	25:68 $\pm$ 13:15	23 (8.214-53.5)	0.2329	24:86 $\pm$ 9:771	24.31(9.054-42.78)	35:38 $\pm$ 16:87	35.87 (2.65-71.33)	0.0066
CXCL12/SDF-1 $\alpha$	53:34 $\pm$ 18:2	55 (17.55-91.5)	56:4 $\pm$ 22:92	53.48 (13.95-101)	0.6756	ND	ND	ND	ND	ND

Table 5: Effect of Hashimoto's disease on growth factor levels: FGF: fibroblast growth factor; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; M-CSF: macrophage colony-stimulating factor; PDGF-BB: platelet-derived growth factor–BB; VEGF: vascular endothelial growth factor.

	Control group		Saliva Study group			Control group		Plasma Study group		
	Mean ± SD	Median (min-max)	Mean ± SD	Median (min-max)	<i>p</i> value	Mean ± SD	Median (min-max)	Mean ± SD	Median (min-max)	<i>p</i> value
G-CSF	493.9 ± 72.24	497 (363.1-649.2)	574.1± 115.8	587.8(344.1-894.8)	0.0066	603.7 ± 91.3	590.2(454.4-764.7)	777.1 ± 164	726.8 (455.9-1162)	<0.0001
VEGF	1443 ± 850.1	1221 (53.24-3643)	2631± 1480	2433(634.8-6122)	0.0025	191.1 ± 64.73	179.4 (91.19-331)	271.3 ± 158.2	252.3 (24.03-608.9)	0.0842
TRIAL	519.3 ± 307.7	441.3 (16.85-1154)	1009± 1011	727.1 (24.71-4653)	0.0472	80.32 ± 30.77	78.42(26.96-143.5)	101.6 ± 47.97	101.7 (12.02-191.1)	0.0878
FGF	5:371 ± 1:205	5.412 (3.418-8.347)	5:737± 1:197	5.54(3.717-8.09)	0.3571	34:45 ± 7:104	33.35(19.34-46.92)	33:85 ± 9:314	31.99 (17.48-54.19)	0.6443
GM-CSF	24:12 ± 6:793	22.65 (11.77–37.98)	25:6 ± 10:25	25.17 (5.405 –50.55)	0.5637	98:28 ± 15:9	100.2 (70.8-140.6)	102:9 ± 26:21	103.9 (48.13-146.8)	0.4762
M-CSF	228:5 ± 137:5	206 (13.03-582.5)	309:7± 268:6	238(18.8-1301)	0.2182	65:97 ± 30:89	69.24(4.661-135.7)	85:52 ± 34:76	98.87 (5.619-131.4)	0.0223
PDGF-BB	480:9 ± 165:9	490 (103.6-740)	534 ± 262:3	548.2 (111-1060)	0.5096	1041 ± 337:1	1092(351.6-1689)	976:5 ± 552	1095 (39.4-2135)	0.6305

Table 6: Statistically significant correlations in the study group (TG-Ab: thyroid peroxidase antibody; UWS: unstimulated saliva; IL-1 $\alpha$ : interleukin 1 $\alpha$ ; IL-6: interleukin 6; IL-12: interleukin 12; INF- $\gamma$ : interferon  $\gamma$ ; CODS: Clinical Oral Dryness Score, NO: nitric oxide; IL-12 (p40): interleukin 12 (p40); TG-A: thyroid peroxidase antibody).

Pairs of variables	<i>r</i>	<i>p</i>
TPO-Ab and UWS flow	-0.865	<0.0001
IL-6 and UWS flow	-0.951	<0.0001
IL-1 $\alpha$ and UWS flow	-0.864	<0.0001
CODS and UWS flow	-0.885	<0.0001
CODS and duration of Hashimoto's disease	0.751	<0.0001
INF- $\gamma$ and CODS	0.488	0.013
IL-12 and NO	0.723	<0.0001
INF- $\gamma$ and NO	0.442	0.027
IL-12 (p40) UWS and plasma TG-A	0.557	0.004

correlation between salivary INF- $\gamma$  concentration and the CODS.

We demonstrated that in UWS of HT patients, IL-12 levels were positively correlated with NO concentration. Similarly, a positive correlation was observed between INF- $\gamma$  concentration and an increase in NO level in UWS.

In the study group, we observed a positive correlation between IL-12 (p40) concentration in UWS and plasma TG-Ab concentration (Table 6).

3.8. Immunoassay Method Validation. Representative assay working ranges, assay sensitivity, and precision are presented in Table S13.

#### 4. Discussion

Hashimoto's disease (Hashimoto's thyroiditis, HT) is a chronic autoimmune disease with complex and heterogeneous course, primarily leading to the destruction and dysfunction of the thyroid gland. However, according to available studies on the subject, it also negatively affects the function of the salivary glands, which is manifested by reduced saliva properties as well as rate of its secretion. The reason for the disturbed function of the salivary glands in the course of HT has not yet been determined. Considering the role of saliva in maintaining the health of structures present in the oral cavity as well as general well-being, explaining these pathomechanisms is of the utmost importance for both patients and doctors.

In our experiment, we narrowed down the study group to female patients who had never been treated for HT and whom did not need to include hormonal supplementation in the course of the disease. Detection of HT in most instances was accidental, e.g., during breast ultrasound or so-called periodic examinations. In such cases, it would seem that patients only require observation and prophylactic visits to an endocrinologist. However, problems of HT patients with subjective sensation of dryness in the oral cavity that appeared during dental visits, most frequently manifested by the need to drink water during the night and problems with swallowing dry food, indicated a more serious problem.

These observations encouraged us to perform the present study. One of the objectives of this publication was to assess the severity of salivary gland dysfunction and the presence of subjective and objective symptoms of salivary gland impairment in spontaneously euthyroid HT patients who had never undergone hormonal treatment. Considering the involvement of immunological disturbances in the development of salivary gland disorder in the course of numerous autoimmune diseases, the study is also aimed at assessing whether the severity of salivary gland dysfunction was correlated with the concentration of selected salivary cytokines, chemokines, and growth factors. We attempted to determine whether these salivary parameters could be helpful in determining the progression of HT disease.

Since SS may be one of the causes of salivary gland dysfunction in the course of autoimmune diseases, we performed a number of diagnostic tests (Schirmer's test—data not shown, antibody determination—Table 2, questionnaire on dryness in the eyeball—data not shown—and in the oral cavity), except the labial salivary gland biopsy for which we did not obtain the consent of the Bioethics Committee. The exclusion of SS as well as other general diseases and coexisting oral inflammation led us to the conclusion that all of the observed abnormalities are due to HT.

We confirmed that the median of UWS secretion of HT patients was significantly lower compared to the control group. More importantly, 60% of them had the rate of UWS secretion below 0.2 mL/min, which is clinical evidence of salivary gland secretory insufficiency. The values of UWS < 0.2 mL/min are commonly a cutoff for assessing salivary gland dysfunction [9, 11, 23]. We demonstrated a negative correlation between TPO-Ab levels and UWS flow in the group of HT patients. This result suggests increased salivary gland secretory dysfunction with the progression of this autoimmune thyroid disease, similarly to other autoimmune diseases. In the case of SS, it was observed that increased autoimmunity, expressed by increased levels of in SSA/Lo and SSB/Ra antibodies, led to lower sensitivity or density of muscarinic receptors responsible for saliva secretion [24]. In the course of SS and another autoimmune thyroid disease—Graves' disease, elevated concentration of antimuscarinic antibodies was confirmed parallel to the progression of the disease [25, 26]. These antibodies directly inhibit the carbachol-evoked increase of intracellular calcium ions, which suggests a possible direct role of these antibodies in reducing saliva secretion [27]. Women with low UWS flow rate (below 0.2 mL/min) demonstrated the highest CODS ( $\geq 5$ , data not shown). The CODS is a semi-quantitative clinical dry mouth score that enables the assessment of the severity and progression of oral dryness. All the female patients with a secretion rate lower than 0.2 mL/min also responded positively to all 3 questions concerning subjective symptoms of dry mouth; only 5 patients with a secretion rate of more than 0.2 mL/min responded positively to just one of the questions regarding their subjective perception of dry mouth. However, CODS values within the range of 1–4 in HT patients with UWS flow > 0.2 mL/min suggest that oral dryness symptoms may also result from changes in the coating properties of saliva, e.g., from salivary content of glycoproteins, particularly mucins, as evidenced by a positive

correlation between salivary INF- $\gamma$  concentration and the CODS in the group of HT patients. It was proven that high expression of INF- $\gamma$  strongly correlates with reduced mucin production in acinar cells of SS patients [28]. It should undoubtedly be remembered that HT patients with UWS within the normal range and with a positive CODS test had experienced over a 50% reduction in their personal baseline UWS flow. Indeed, it is known that  $\geq 50\%$  reduction from personal baseline UWS flow can result in the perception of dry mouth [10]. Furthermore, we demonstrated a negative correlation between the CODS and the rate of UWS secretion in the entire group of HT patients. A negative correlation was also observed between the CODS and the disease duration, which is not surprising since objective symptoms of dry mouth result from its poor hydration or lack of cleaning effect provided by normal flow of saliva. The duration of HT in the subgroup of patients with hyposalivation was significantly longer than in the group of patients with HT with normal saliva flow (Table S8). The severity of dry mouth increases with time, as confirmed by the results of Zalewska et al. [23]. Participants from the control group reported no subjective symptoms of reduced saliva secretion, with zero values of objective dryness symptom scores (CODS = 0), which was also confirmed by the results of Osailan et al. [9].

We did not obtain similar relationships (as we described above) in the subgroup of patients with hyposalivation/normosalivation; although given the small size of this subgroup, these relationship deficiencies should be confirmed in a larger number of patients. As the ClinCalc online calculator test showed, the minimum size of the group should be 21 women.

Although it is commonly believed that HT is Th1 mediated [29], the obtained results do not indicate a dominance of either branch of the immune response. Indeed, both in plasma and UWS, a significant increase was observed in the concentrations of interleukins connected with the activation of Th1 lymphocytes (IFN- $\gamma$   $\uparrow 88\%$  in saliva and  $\uparrow 43\%$  in plasma; IL-2RA  $\uparrow 9\%$  and TNF- $\beta$   $\uparrow 46\%$  in plasma), Th2 (IL-5 and IL-6  $\uparrow 40\%$  and  $\uparrow 54\%$ , respectively, in saliva and  $\uparrow 51\%$  and  $\uparrow 65\%$ , respectively, in plasma; IL-13  $\uparrow 26\%$  in plasma), or Th17 (IL-6 and TNF- $\alpha$   $\uparrow 54\%$  and  $\uparrow 93\%$ , respectively, in saliva and  $\uparrow 65\%$  and  $\uparrow 79\%$ , respectively, in plasma) with reduced secretion of Th2 cytokines (IL-10  $\downarrow 69\%$  in saliva and  $\downarrow 17\%$  in plasma) [30]. We further observed increased salivary and plasma concentrations of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-3, IL-12 (p40), and plasma IL-12 (p70). Many of the tested cytokines did not differ between the study and control groups, both in saliva and plasma. Taking into account the subgroups of HT patients, we observed significantly higher levels of IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12 (p40), IL1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-4, IL-7, and lower IL-10 concentration in the UWS of HT patients with hyposalivation compared to normal salivation HT patients (Table S9). However, we would like to emphasize that these results should be interpreted very carefully due to the insufficient number of cases in the subgroups.

We noted a significant increase in the concentration only of some salivary chemokines (CCL27/CTACK, CXCL1/Gro- $\alpha$ ) and found no correlation between the concentrations of the assayed chemokines and interleukins. When analyzing the con-

centration of chemokines in the subgroups of HT patients, we did not find significant differences (Table S10). As leukocyte migration is the dominant biological process regulated by chemokines, the obtained results are highly likely to demonstrate enhanced migration of white blood cells from blood vessels into the salivary gland parenchyma [31]. It was shown that enlargement of the thyroid gland in the course of HT is accompanied by significantly increased blood flow, vascularization of this gland, and vascular permeability due to boosted expression of VEGF [32]. VEGF is a recognized angiogenic factor and enhancer of vascular permeability [33]. It is not known whether similar morphological changes occur in the salivary glands as in the thyroid gland. The significant increase of salivary VEGF levels may prove increased permeability of salivary gland blood vessels. Interesting but not surprising overall, higher VEGF concentrations were noted in the UWS of patients with hyposalivation compared to patients with HT and without objective salivary gland dysfunction (Table S11). As mentioned above, we observed increased salivary concentrations of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, and IL-12, which can be derived from inflammatory cells infiltrating the salivary glands. It is well known that these cytokines are released by incoming stimulated monocytes, activated macrophages, and vascular endothelial cells. Previous studies demonstrated that elevated level of salivary IL-6 also correlates significantly with the degree of lymphocytic infiltration in the labial salivary glands of SS patients [34, 35], implicating the role of this cytokine in SS progression [35]. In the presented experiment, we did not perform labial gland biopsy. Spearman rank correlation coefficient showed the positive correlations between salivary IL-6 and UWS flow, IL-1 $\alpha$ , and UWS flow as well as INF- $\gamma$  and the CODS. Multifactorial regression analysis of salivary inflammatory biomarkers revealed that IL-6 and IL-1 $\beta$  level significantly depend on HT duration, UWS flow, and CODS, while IFN- $\gamma$  on disease duration and UWS flow. Salivary TNF- $\alpha$  statistically depends on TG-Ab and UWS flow rate, while the IL-12 level only on salivary flow. Hypothesizing, these results suggest that increased levels of IL-6, IL-1 $\alpha$ , and INF- $\gamma$  in UWS may be related to the level of salivary gland degeneration, leading to reduced saliva secretion. It has been evidenced that IL-6 and IL-1 as well as INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12 play an important role in the destruction of salivary gland tissue [36–38]. INF- $\gamma$  not only enhances remodeling of the extracellular space of salivary glands through upregulation the production of metalloproteinases [39] but, similar to TNF- $\alpha$  and IL-12, activates intrinsic apoptosis pathways [37, 38, 40], and IL-6 and IL-1 boost apoptotic damage by exposing cytosolic autoantigen present in HT [41]. IL-6 also significantly intensifies the local inflammatory process by inducing T cell proliferation and B-lymphocyte differentiation and decreasing the number of Treg cells [42, 43]. Moreover, it has been proven that increased secretion and concentration of IL-1, TNF- $\alpha$ , or INF- $\gamma$  in the inflamed salivary gland microenvironment may inhibit acetylcholine release, resulting in an attenuated acinar cell response and reduced saliva secretion [44]. Furthermore, it is well established that NO controls the secretion of saliva. NO has been demonstrated to exert a stimulatory effect on salivation in normal male rats [45], whereas excess NO is detrimental to numerous cells,

including acinar cells and cells of ducts within the salivary glands, causing apoptosis of these cells and acute impairment of salivary gland function [37]. In the presented study, we observed that increased salivary IL-12 and INF- $\gamma$  levels correlated positively with elevated salivary NO concentration, indicating that IL-12 and INF- $\gamma$  may participate in the inhibition of saliva secretion by the NO-mediated pathway. The obtained results were not reported in previous studies, and their interpretation is a far-reaching assumption; therefore, further studies are necessary to assess the utility of IL-6 and IL-1 as well as INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12 as biomarkers for salivary gland dysfunction in the course of HT.

The limitation of the current publication is the small number of women with HT; however, as the ClinCalc online calculator shows, the number of 25 is sufficient for the analysis. However, these are selected patients: without a history of hormone therapy, with a healthy periodontium, no other inflammatory diseases of the oral cavity, and no other diseases, including autoimmune diseases. The composition of saliva depends on the local condition in the oral cavity and the general health of the patient. Therefore, in order to assess the function of the salivary glands due to HT, patients should be very critically selected, which could result in a small group size.

In the current publication, we evaluated the utility of the assayed parameters for the diagnosis of HT. ROC analysis showed that some of the studied parameters can be helpful in differential diagnosis of female patients with HT in an untreated euthyroid state from healthy women matched by age and BMI (Table S1, S2, S3). Special attention should be paid to salivary INF- $\gamma$  and IL-12 (p40) levels that distinguish the study group from the controls (AUC = 0.91,  $p < 0.0001$ , AUC = 0.86,  $p < 0.0001$ , respectively). Moreover, salivary IL-12 (p40) concentration correlated positively with plasma TG-Ab, which may suggest that changes in salivary IL-12 (p40) concentrations reflect the progression of Hashimoto's disease. Changes in the levels of the studied parameters do not reflect the changes observed in plasma. Moreover, we observed no correlation between the concentrations of the examined parameters in UWS and plasma. The lack of such correlations proves that inflammatory changes and the related salivary gland dysfunction are independent of general inflammation in the course of HT. Similarly, ROC analysis revealed that plasma proteins, different from those present in UWS, could be helpful in the diagnosis of HT (CTACK:

AUC = 0.9,  $p < 0.0001$ , IL-3: AUC = 0.82,  $p < 0.0001$ , G-CSF: AUC = 0.87,  $p < 0.0001$ , HGF: AUC = 0.97,  $p < 0.0001$ , IL-8: AUC = 0.89,  $p < 0.0001$ , TNF- $\alpha$ : AUC = 0.84,  $p < 0.0001$ ). However, despite the promising results of ROC analysis and given the low number of female HT patients participating in the experiment, this analysis should be tested on a wider population of euthyroid HT patients.

## 5. Conclusions

- (1) The reduction of UWS secretion in female patients with euthyroid HT compared to the controls is a manifestation of impaired function of the salivary glands. Moreover, UWS flow values below 0.2 mL/min,

observed in 60% of the HT patients participating in the experiment, are clinical evidence of secretory dysfunction of the salivary glands

- (2) The severity of salivary gland secretory dysfunction is closely associated with autoimmunity-related inflammation in the course of HT
- (3) Clinical symptoms of salivary gland dysfunction worsen with disease duration
- (4) We demonstrated impaired profiles of cytokines, chemokines, and growth factors in the UWS and plasma of euthyroid HT women
- (5) The evaluation of the levels of assayed cytokines in the saliva and plasma of patients with untreated euthyroid HT does not indicate the dominance of any of the branches of the immune response
- (6) IL-6 and IL-1 as well as INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12 may be potential biomarkers for salivary gland dysfunction in the course of HT
- (7) Inflammatory changes and the associated dysfunction of the salivary glands are independent of general inflammation in the course of HT
- (8) Salivary IL-12 (p40) may be helpful in assessing the progression of autoimmunity-related inflammation in the course of HT

## Data Availability

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

## Ethical Approval

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Białystok (code of permission: R-I-002/386/2016).

## Consent

Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Authors' Contributions

A. Z., M. M., and K. M. performed the conceptualization. A. Z., M. M., K. M., and S. Z. performed the data curation. A. Z., M. M., and S. Z. performed the formal analysis. A. Z. performed the funding acquisition. K. M., A. Z., and M. M. performed the investigation. A. Z., M. M., K. M. performed the methodology. K. M., Ł. P., and A. P-K. performed the material collection. A. Z., A. P-K., A. K. performed the supervision. A. Z. performed the validation. A. Z. and M. M. performed the

visualization. K. M. and A. Z. performed the writing—original draft. K. M., A. Z., and M. M performed the writing—review and editing.

## Acknowledgments

This work was supported by the Medical University of Białystok, Poland (grant numbers: SUB/1/DN/21/002/3330 and SUB/1/DN/21/002/1209). Mateusz Maciejczyk, Ph.D., was supported by the Foundation for Polish Science (FNP).

## Supplementary Materials

Table S1: receiver operating characteristic (ROS) analysis of salivary cytokines in patients with Hashimoto's disease and healthy controls. Table S2: receiver operating characteristic (ROS) analysis of plasma cytokines in patients with Hashimoto's disease and healthy controls. Table S3: receiver operating characteristic (ROS) analysis of salivary chemokines in patients with Hashimoto's disease and healthy controls. Table S4: receiver operating characteristic (ROS) analysis of plasma chemokines in patients with Hashimoto's disease and healthy controls. Table S5: receiver operating characteristic (ROS) analysis of salivary growth factors in patients with Hashimoto's disease and healthy controls. Table S6: receiver operating characteristic (ROS) analysis of plasma growth factors in patients with Hashimoto's disease and healthy controls. Table S7: stomatological characteristics of the HT subgroups. Table S8: clinical characteristics of the participants of the HT subgroups. Table S9: differences in salivary inflammatory pro-file in HT subjects with hyposalivation compared to normal salivary secretion. Table S10: differences in salivary chemokine profile in HT subjects with hyposalivation compared to normal salivary secretion. Table S11: differences in salivary growth factor profile in HT subjects with hyposalivation compared to normal salivary secretion. Table S12: multifactorial regression of selected salivary biomarkers in all enrolled patients. Table S13: LLOQ, ULOQ, LOD, and intra- and inter-assay precision %CV. (Supplementary Materials)

## References

- [1] M. A. Farhangi, P. Dehghan, S. Tajmiri, and M. M. Abbasi, "The effects of *Nigella sativa* on thyroid function, serum vascular endothelial growth factor (VEGF) -1, Nesfatin-1 and anthropometric features in patients with Hashimoto's thyroiditis: a randomized controlled trial," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 16, no. 1, p. 471, 2016.
- [2] W. M. Tunbridge and M. P. Vanderpump, "Population screening for autoimmune thyroid disease," *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 29, no. 2, pp. 239–253, 2000.
- [3] K. Morawska, M. Maciejczyk, Ł. Popławski, A. Popławska-Kita, A. Kretowski, and A. Zalewska, "Enhanced salivary and general oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis women in euthyrosis," *Journal of Clinical Medicine*, vol. 9, no. 7, p. 2102, 2020.
- [4] F. Agha-Hosseini, N. Shirzad, and M. S. Moosavi, "Evaluation of xerostomia and salivary flow rate in Hashimoto's thyroiditis," *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, vol. 21, no. 1, pp. e1–e5, 2016.
- [5] I. Ates, F. M. Yilmaz, M. Altay, N. Yilmaz, D. Berker, and S. Guler, "The relationship between oxidative stress and autoimmunity in Hashimoto's thyroiditis," *European Journal of Endocrinology*, vol. 173, no. 6, pp. 791–799, 2015.
- [6] R. Rostami, M. R. Aghasi, A. Mohammadi, and J. Nourooz-Zadeh, "Enhanced oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis: inter-relationships to biomarkers of thyroid function," *Clinical Biochemistry*, vol. 46, no. 4-5, pp. 308–312, 2013.
- [7] S. P. Changlai, W. K. Chen, C. Chung, and S. M. Chiou, "Objective evidence of decreased salivary function in patients with autoimmune thyroiditis (chronic thyroiditis, Hashimoto's thyroiditis)," *Nuclear Medicine Communications*, vol. 23, no. 10, pp. 1029–1033, 2002.
- [8] G. Warfvinge, A. Larsson, V. Henricsson, U. B. Ericsson, B. Hansen, and R. Manthorpe, "Salivary gland involvement in autoimmune thyroiditis, with special reference to the degree of association with Sjögren's syndrome," *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, vol. 74, no. 3, pp. 288–293, 1992.
- [9] S. M. Osailan, R. Pramanik, P. Shirlaw, G. B. Proctor, and S. J. Challacombe, "Clinical assessment of oral dryness: development of a scoring system related to salivary flow and mucosal wetness," *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, vol. 114, no. 5, pp. 597–603, 2012.
- [10] S. Osailan, R. Pramanik, S. Shirodaria, S. J. Challacombe, and G. B. Proctor, "Investigating the relationship between hyposalivation and mucosal wetness," *Oral Diseases*, vol. 17, no. 1, pp. 109–114, 2011.
- [11] A. Zalewska, M. Knaś, N. Waszkiewicz, D. Waszkiel, S. Sierakowski, and K. Zwierz, "Rheumatoid arthritis patients with xerostomia have reduced production of key salivary constituents," *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, vol. 115, no. 4, pp. 483–490, 2013.
- [12] C. P. Chang, Y. C. Shiau, J. J. Wang, S. T. Ho, and C. H. Kao, "Decreased salivary gland function in patients with autoimmune thyroiditis," *Head & Neck*, vol. 25, no. 2, pp. 132–137, 2003.
- [13] Y. A. Syed, B. S. Reddy, T. K. Ramamurthy et al., "Estimation of salivary parameters among autoimmune thyroiditis patients," *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, vol. 11, no. 7, 2017.
- [14] J. Karsh, N. Pavlidis, B. D. Weintraub, and H. M. Moutsopoulos, "Thyroid disease in Sjögren's syndrome," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 23, no. 11, pp. 1326–1329, 1980.
- [15] R. H. Scofield, "Autoimmune thyroid disease in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome," *Clinical and Experimental Rheumatology*, vol. 14, no. 3, pp. 321–330, 1996.
- [16] L. A. Moreno-Quispe, J. Serrano, L. Virto et al., "Association of salivary inflammatory biomarkers with primary Sjögren's syndrome," *Journal of Oral Pathology & Medicine*, vol. 49, no. 9, pp. 940–947, 2020.
- [17] A. D. Westmuckett, J. C. Siefert, Y. A. Tesiram, D. M. Pinson, and K. L. Moore, "Salivary gland hypofunction in tyrosylprotein sulfotransferase-2 knockout mice is due to primary hypothyroidism," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, article e71822, 2013.
- [18] A. Skutnik-Radziszewska, M. Maciejczyk, I. Flisiak et al., "Enhanced inflammation and nitrosative stress in the saliva and plasma of patients with plaque psoriasis Enhanced Inflammation and Nitrosative Stress in the Saliva and Plasma of

- Patients with Plaque Psoriasis," *Journal of Clinical Medicine*, vol. 9, no. 3, p. 745, 2020.
- [19] M. Knaś, A. Zalewska, N. Waszkiewicz et al., "Salivary: flow and proteins of the innate and adaptive immunity in the limited and diffused systemic sclerosis," *Journal of Oral Pathology & Medicine*, vol. 43, no. 7, pp. 521–529, 2014.
- [20] C. Vitali, S. Bombardieri, R. Jonsson et al., "Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European consensus group," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 61, no. 6, pp. 554–558, 2002.
- [21] J. Borys, M. Maciejczyk, B. Antonowicz et al., "Glutathione metabolism, mitochondria activity, and nitrosative stress in patients treated for mandible fractures," *Journal of Clinical Medicine*, vol. 8, no. 1, p. 127, 2019.
- [22] M. B. Grisham, G. G. Johnson, and J. R. Lancaster, "Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids," *Methods in Enzymology*, vol. 268, pp. 237–246, 1996.
- [23] A. Zalewska, M. Knaś, E. Gifrdzieńska-Sieškiewicz et al., "Salivary antioxidants in patients with systemic sclerosis," *Journal of Oral Pathology & Medicine*, vol. 43, no. 1, pp. 61–68, 2014.
- [24] L. J. Dawson, E. A. Field, A. R. Harmer, and P. M. Smith, "Acetylcholine-evoked calcium mobilization and ion channel activation in human labial gland acinar cells from patients with primary Sjögren's syndrome," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 124, no. 3, pp. 480–485, 2001.
- [25] A. P. Weetman, "Graves' disease," *The New England Journal of Medicine*, vol. 343, no. 17, pp. 1236–1248, 2000.
- [26] C. R. Chen, K. Tanaka, G. D. Chazenbalk, S. M. McLachlan, and B. Rapoport, "A full biological response to autoantibodies in graves' disease requires a disulfide-bonded loop in the thyrotropin receptor N terminus homologous to a laminin epidermal growth factor-like domain," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 18, pp. 14767–14772, 2001.
- [27] L. J. Dawson, J. Stanbury, N. Venn, B. Hasdimir, S. N. Rogers, and P. M. Smith, "Antimuscarinic antibodies in primary Sjögren's syndrome reversibly inhibit the mechanism of fluid secretion by human submandibular salivary acinar cells," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 54, no. 4, pp. 1165–1173, 2006.
- [28] S. C. Pflugfelder, C. S. de Paiva, Q. L. Moore et al., "Aqueous tear deficiency increases conjunctival interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) expression and goblet cell loss," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 56, no. 12, pp. 7545–7550, 2015.
- [29] C. Phenekos, A. Vryonidou, A. D. Gritzapis, C. N. Baxevanis, M. Goula, and M. Papamichail, "Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2)," *Neuroimmunomodulation*, vol. 11, no. 4, pp. 209–213, 2004.
- [30] T. Hayashi, N. Shimoyama, and T. Mizuno, "Destruction of salivary and lacrimal glands by Th1-polarized reaction in a model of secondary Sjögren's syndrome in lupus-prone female NZB  $\times$  NZWF (1) mice," *Inflammation*, vol. 35, no. 2, pp. 638–646, 2012.
- [31] C. E. Hughes and R. J. B. Nibbs, "A guide to chemokines and their receptors," *The FEBS Journal*, vol. 285, no. 16, pp. 2944–2971, 2018.
- [32] K. Westermark, F. A. Karlsson, and B. Westermark, "Epidermal growth factor modulates thyroid growth and function in culture," *Endocrinology*, vol. 112, no. 5, pp. 1680–1686, 1983.
- [33] Ç. Yılmaz Şaştım, M. Gürsoy, E. Könenen et al., "Salivary and serum markers of angiogenesis in periodontitis in relation to smoking," *Clinical Oral Investigations*, vol. 25, no. 3, pp. 1117–1126, 2021.
- [34] M. Moriyama, J. N. Hayashida, T. Toyoshima et al., "Cytokine/chemokine profiles contribute to understanding the pathogenesis and diagnosis of primary Sjögren's syndrome," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 169, no. 1, pp. 17–26, 2012.
- [35] S. Benchabane, A. Boudjelida, R. Toumi, H. Belguendouz, P. Youinou, and C. Touil-Boukoffa, "A case for IL-6, IL-17A, and nitric oxide in the pathophysiology of Sjögren's syndrome," *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, vol. 29, no. 3, pp. 386–397, 2016.
- [36] A. Solomon, D. Dursun, Z. Liu, Y. Xie, A. Macri, and S. C. Pflugfelder, "Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 42, no. 10, pp. 2283–2292, 2001.
- [37] A. Kimura-Shimmyo, S. I. Kashiwamura, H. Ueda et al., "Cytokine-induced injury of the lacrimal and salivary glands," *Journal of Immunotherapy*, vol. 25, pp. S42–S51, 2002.
- [38] M. Sekiguchi, T. Iwasaki, M. Kitano et al., "Role of sphingosine 1-phosphate in the pathogenesis of Sjögren's syndrome," *The Journal of Immunology*, vol. 180, no. 3, pp. 1921–1928, 2008.
- [39] A. J. Wu, R. M. Lafrenie, C. Park et al., "Modulation of MMP-2 (gelatinase a) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 171, no. 2, pp. 117–124, 1997.
- [40] X. Zhang, W. Chen, C. S. de Paiva et al., "Desiccating stress induces CD4<sup>+</sup> T-cell-mediated Sjögren's syndrome-like corneal epithelial apoptosis via activation of the extrinsic apoptotic pathway by interferon- $\gamma$ ," *The American Journal of Pathology*, vol. 179, no. 4, pp. 1807–1814, 2011.
- [41] C. Salmaso, M. Bagnasco, G. Pesce et al., "Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 966, no. 1, pp. 496–501, 2002.
- [42] J. E. Fonseca, M. J. Santos, H. Canhão, and E. Choy, "Interleukin-6 as a key player in systemic

- inflammation and joint destruction," *Autoimmunity Reviews*, vol. 8, no. 7, pp. 538–542, 2009.
- [43] M. J. McGeachy, K. S. Bak-Jensen, Y. Chen et al., "TGF- $\beta$  and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T<sub>H</sub>-17 cell-mediated pathology," *Nature Immunology*, vol. 8, no. 12, pp. 1390–1397, 2007.
- [44] A. G. Tzioufas, J. Tsonis, and H. M. Moutsopoulos, "Neuroendocrine dysfunction in Sjögren's syndrome," *Neuroimmuno-modulation*, vol. 15, no. 1, pp. 37–45, 2008.
- [45] V. Rettori, A. Lomniczi, J. C. Elverdin et al., "Control of salivary secretion by nitric oxide and its role in neuroimmunomodulation," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 917, pp. 258–267, 2000.



## 9. Piśmiennictwo

1. Farhangi MA, Dehghan P, Tajmiri S, Abbasi MM. The effects of *Nigella sativa* on thyroid function, serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - 1, Nesfatin-1 and anthropometric features in patients with Hashimoto's thyroiditis: a randomized controlled trial. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16(1):471.
2. Tunbridge WM, Vanderpump MP. Population screening for autoimmune thyroid disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000;29(2):239-53, v.
3. Burek CL, Rose NR. Autoimmune thyroiditis and ROS. *Autoimmun Rev.* 2008;7(7):530-7.
4. Morawska K, Maciejczyk M, Popławski Ł, Popławska-Kita A, Kretowski A, Zalewska A. Enhanced Salivary and General Oxidative Stress in Hashimoto's Thyroiditis Women in Euthyrosis. *J Clin Med.* 2020;9(7). doi: 10.3390/jcm9072102.
5. Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev.* 1994;15(6):788-830.
6. Rose NR, Mackay IR. *The autoimmune diseases.* 4th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2006.
7. Ścibór D, Czczot H. Catalase: structure, properties, function. *Postępy Hig Med Dosw.* 2006;60:170-80.
8. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc.* 1998;75:199-212.
9. Lushchak V. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem-Biol Interact.* 2014;224:164-75.
10. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:44-84.
11. Maciejczyk M, Mikoluc B, Pietrucha B, Heropolitanska - Pliszka E, Pac M, Motkowski R, Car H. Oxidative stress, mitochondrial abnormalities and antioxidant defense in Ataxia-telangiectasia, Bloom syndrome and Nijmegen breakage syndrome. *Redox Biol.* 2017;11:375-83.
12. Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H, Mann GE, Radi R, Roberts LJ, Vina J, Davies KJ. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic Biol Med.* 2015;78:233-5.

13. Zalewska A, Knaś M, Maciejczyk M, Waszkiewicz N, Klimiuk A, Choromańska M, Matczuk J, Waszkiel D, Car H. Antioxidant profile, carbonyl and lipid oxidation marker in the parotid and submandibular glands of rats in different periods of streptozotocin induced diabetes. *Arch Oral Biol.* 2015 60:1375-86.
14. Zalewska A, Knaś M, Waszkiewicz N, Klimiuk A, Litwin K, Sierakowski S, Waszkiel D. Salivary antioxidants in patients with systemic sclerosis. *J Oral Pathol Med.* 2014 Jan;43(1)(1):61-8.
15. Zalewska A, Knaś M, Żendzian-Piotrowska M, Waszkiewicz N, Szulimowska J, Prokopiuk S, Waszkiel D, Car H. Antioxidant profile of salivary glands in high fat diet-induced insulin resistance rats. *Oral Dis.* 2014 Sep;20(6):560-6.
16. Kołodziej U, Maciejczyk M, Niklinska W, Waszkiel D, Żendzian-Piotrowska M, Żukowski P, Zalewska A. Chronic high-protein diet induces oxidative stress and alters the salivary gland function in rats. *Arch Oral Biol.* 2017 Dec;84:6-12.
17. Kołodziej U, Maciejczyk M, Miasko A, Matczuk J, Knas M, Żukowski P, Żendzian-Piotrowska M, Borys J, Zalewska A. Oxidative Modification in the Salivary Glands of High Fat-Diet Induced Insulin Resistant Rats. *Front Physiol.* 2017;8:20. doi: 10.3389/fphys.2017.00020
18. Knaś M, Maciejczyk M, Daniszewska I, Klimiuk A, Matczuk J, Kołodziej U, Waszkiel D, Ładny JR, Żendzian-Piotrowska M, Zalewska A. Oxidative Damage to the Salivary Glands of Rats -Induced Diabetes-Temporal Study: Oxidative Stress and Diabetic Salivary Glands. *J Diabetes Res.* 2016. 2016:4583742. doi: 10.1155/2016/4583742.
19. Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2003.
20. Alfonso-Prieto M BX, Vidossich P, Rovira C. The molecular mechanism of catalase reaction. *J Am Chem Soc.* 2009;131(33):11751-61.
21. Lushchak VL. Classification of oxidative stress based on its intensity. *Exp Clin Sci.* 2014;13:922-37.
22. Lushchak VL. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164-75.
23. Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids.* 2012;2012:736837. doi.org/10.1155/2012/736837.
24. Mancini A, Di Segni C, Raimondo S, Olivieri G, Silvestrini A, Meucci E, Currò D. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:6757154. doi: 10.1155/2016/6757154.

25. Skutnik-Radziszewska A, Maciejczyk M, Flisiak I, Kolodziej U, Kotowska-Rodziewicz A, Klimiuk A, Zalewska A. Enhanced Inflammation and Nitrosative Stress in the Saliva and Plasma of Patients with Plaque Psoriasis. *J Clin Med.* 2020;9(3). doi: 10.3390/jcm9030745.
26. Toczewska J, Konopka T, Zalewska A, Maciejczyk M. Nitrosative Stress Biomarkers in the Non-Stimulated and Stimulated Saliva, as well as Gingival Crevicular Fluid of Patients with Periodontitis: Review and Clinical Study. *Antioxidants (Basel, Switzerland).* 2020;9(3). doi: 10.3390/antiox9030259.
27. Zhang YJ, Xu YF, Liu YH, Yin J, Li HL, Wang Q, Wang JZ. Peroxynitrite induces Alzheimer-like tau modifications and accumulation in rat brain and its underlying mechanisms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2006;20(9):1431-42.
28. Maciejczyk M, Mikołuc B, Pietrucha B, Heropolitańska-Pliszka E, Pac M, Motkowski R, Car H. Oxidative stress, mitochondrial abnormalities and antioxidant defense in Ataxia-teleangiectasia, Bloom syndrome and Nijmegen breakage syndrome. *Redox Biol.* 2017;11:375-83. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.030.
29. Zieniewska I, Maciejczyk M, Zalewska A. The Effect of Selected Dental Materials Used in Conservative Dentistry, Endodontics, Surgery, and Orthodontics as Well as during the Periodontal Treatment on the Redox Balance in the Oral Cavity. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24). doi: 10.3390/ijms21249684.
30. Karpińska A, Gromadzka G. Oxidative stress and natural antioxidant mechanisms: the role in neurodegeneration. From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Postępy Hig Med Dośw.* 2013 Jan;67:43-53.
31. Knaś M, Maciejczyk M, Waszkiel D, Zalewska A. Oxidative Stress and Salivary Antioxidant. *Dent Med Probl.* 2013;50:461-6.
32. Halliwell B. Free radicals and antioxidants-quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32:125-30.
33. Knaś M, Maciejczyk M, Waszkiel D, Zalewska A. Oxidative stress and salivary antioxidants. *Dent Med Problem.* 2013;50:461-6.
34. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol.* 2002;29:189-94.
35. Kanehira T, Shibata K, Kashiwazaki H, Inoue N, Morita M. Comparison of antioxidant enzymes in saliva of elderly smokers and non-smokers. *Gerodontology.* 2006;23:38-42.

36. Zalewska A, Szarmach I, Zendzian-Piotrowska M, Maciejczyk M. The Effect of N-Acetylcysteine on Respiratory Enzymes, ADP/ATP Ratio, Glutathione Metabolism, and Nitrosative Stress in the Salivary Gland Mitochondria of Insulin Resistant Rats. *Nutrients*. 2020;12(2). doi: 10.3390/nu12020458.
37. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol*. 2006;22:39-46.
38. Antunes F, Cadenas E. Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Lett*. 2000;475:121-6.
39. Kulikowska-Karpińska E, Moniuszko-Jakoniuk J. The antioxidant barrier in the organism. *Pol J Environ Stud*. 2004;13:5-13.
40. Safo MK, Musayev FN, Wu SH, Abraham DJ, Ko TP. Structure of tetragonal crystals of human erythrocyte catalase *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2001;57:1-7.
41. Boon EM, Downs A, Marcey D. Catalase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductase. *Reviews on structure and function of catalase*. Marcey D, editor 1997.
42. Carpena X, Wiseman B, Deemagarn T, Singh R, Switala J, Ivancich A, et al. A molecular switch and electronic circuit modulate catalase activity in catalase-peroxidases. *EMBO Rep*. 2005;6:1156-62.
43. Scandalios JG. *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1992.
44. Switala J, Loewen P. Diversity of properties among catalases. *Arch Biochem Biophys*. 2002;401:145-54.
45. Zalewska A, Ziembicka D, Zendzian-Piotrowska M, Maciejczyk M. The Impact of High-Fat Diet on Mitochondrial Function, Free Radical Production, and Nitrosative Stress in the Salivary Glands of Wistar Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:2606120. doi
46. Zalewska A, Zięba S, Kostecka-Sochoń P, Kossakowska A, Zendzian-Piotrowska M, Matczuk J, Maciejczyk M. NAC Supplementation of Hyperglycemic Rats Prevents the Development of Insulin Resistance and Improves Antioxidant Status but Only Alleviates General and Salivary Gland Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:8831855. doi: 10.1155/2020/8831855.
47. Bańkowski E. *Biochemia: podręcznik dla studentów uczelni medycznych*. Wrocław: Elsevier: Urban and Partner; 2009.

48. Maxwell SRJ, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter MA, Thorpe GHG, Jones AF, Barnett AH. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest.* 1997;27:484-90.
49. Bolesta D, Hościowicz PD, Knaś M, Waszkiel D, Zalewska A. Stres oksydacyjny w cukrzycy i jego parametry w ślinie. *Pol Merk Lek.* 2013;35:300-4.
50. Yuan H, Yang X, Shi X, Tian R, Zhao Z. Association of serum uric acid with different levels of glucose and related factors. *Chin Med J.* 2011;124:1443-8.
51. Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA. Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des.* 2005;11:4145-51.
52. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 1991;91:14-22.
53. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanism of malondialdehyde and 4-hydroksy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014. doi: 10.1155/2014/360438.
54. Csala M, Kardon T, Legeza B, Lizak B, Mandl J, Margittai E, Puskás F, Száraz P, Szelényi P, Bánhegyi G. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochimica et biophysica acta.* 2015;1852:826-38.
55. Jaganjac M, Tirosh O, Cohen G, Sasson S, Zarkovic N. Reactive aldehydes-second messengers of free radicals in diabetes mellitus. *Free Radic Res.* 2013;47 39-48.
56. Musiek ES, Yin H, Milne GL, Morrow JD. Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids.* 2005;40:987-94.
57. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanism of malondialdehyde and 4-hydroksy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014. doi: 10.1155/2014/360438.
58. Montuschi P, Barnes P, Jackson Roberts II L. Insights into oxidative stress: the isoprostanes. *Curr Med Chem.* 2007;14:703-17.
59. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:395-418.
60. Ścibior-Bentkowska D, Czczot H. Cancer cells and oxidative stress. *Postępy Hig Med Dosw.* 2009;63:58-72.
61. Tóthová L, Kamodyová N, Červenka T, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015 Oct;5:73. doi: 10.3389/fcimb.2015.00073.
62. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology.* 2006 Jun;141(2):312-22.

63. Michalak A, Krzeszowiak J, Markiewicz-Górka I. The correlations between aging of the human body, oxidative stress and reduced efficiency of repair systems. *Postępy Hig Med Dosw.* 2014 Dec;68:1483-91.
64. Grimsrud PA, Picklo MJ, Griffin TJ, Bernlohr DA. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6:624-37.
65. Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem.* 2008;283:21837-41.
66. Gębicki JM, Bartosz G. Rola białek jako przekaźników uszkodzeń indukowanych przez reaktywne formy tlenu *in vivo*. *Postępy Biochem.* 2010;56(2):115-23.
67. Gresner SM, Liberski P. DNA oxidative damage in Alzheimer's and Creutzfeld-Jakob disease. *Aktualn Neurol.* 2011;11(1):64-7.
68. Guéraud F. 4-Hydroxynonenal metabolites and adducts in pre-carcinogenic conditions and cancer. *Free Radic Biol Med.* 2017;111:196-208.
69. Hanafi R, Anestopoulos I, Voulgaridou GP, Franco R, Georgakilas AG, Ziech D, Malamou-Mitsi V, Pappa A, Panayiotidis MI. Oxidative stress based-biomarkers in oral carcinogenesis: how far have we gone. *Curr Mol Med.* 2012;12:698-703.
70. Halczuk KM, Boguszevska K, Urbaniak SK, Szewczuk M, Karwowski BT. 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a Cause of Autoimmune Thyroid Diseases (AITD) During Pregnancy? *Yale J Biol Med.* 2020;93(4):501-15.
71. Braley-Mullen H, Sharp GC, Medling B, Tang H. Spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice. *J Autoimmun.* 1999;12(3):157-65.
72. Zois C, Stavrou I, Kalogera C, Svarna E, Dimoliatis I, Seferiadis K, Tsatsoulis A. High prevalence of autoimmune thyroiditis in schoolchildren after elimination of iodine deficiency in northwestern Greece. *Thyroid.* 2003;13(5):485-9.
73. Guastamacchia E, Giagulli VA, Licchelli B, Triggiani V. Selenium and Iodine in Autoimmune Thyroiditis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2015;15(4):288-92.
74. Poncin S, Gérard AC, Boucquey M, Senou M, Calderon PB, Knoops B, Lengelé B, Many MC, Colin IM. Oxidative stress in the thyroid gland: from harmlessness to hazard depending on the iodine content. *Endocrinology.* 2008;149(1):424-33.
75. Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol.* 1999;66(6):876-88.

76. Baskol G, Atmaca H, Tanriverdi F, Baskol M, Kocer D, Bayram F. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hypothyroidism before and after treatment. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007;115(8):522-6.
77. Wichman J, Winther KH, Bonnema SJ, Hegedüs L. Selenium Supplementation Significantly Reduces Thyroid Autoantibody Levels in Patients with Chronic Autoimmune Thyroiditis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid*. 2016;26(12):1681-92.
78. Petrović N, Cvijić G, Davidović V. Thyroxine and tri-iodothyronine differently affect uncoupling protein-1 content and antioxidant enzyme activities in rat interscapular brown adipose tissue. *J Endocrinol*. 2003;176(1):31-8.
79. Dobrzyńska MM, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants modulate thyroid hormone- and noradrenaline-induced DNA damage in human sperm. *Mutagenesis*. 2004;19(4):325-30.
80. Wang HC, Dragoo J, Zhou Q, Klein JR. An intrinsic thyrotropin-mediated pathway of TNF-alpha production by bone marrow cells. *Blood*. 2003;101(1):119-23.
81. Antunes TT, Gagnon A, Bell A, Sorisky A. Thyroid-stimulating hormone stimulates interleukin-6 release from 3T3-L1 adipocytes through a cAMP-protein kinase A pathway. *Obes Res*. 2005;13(12):2066-71.
82. Dardano A, Ghiadoni L, Plantinga Y, Caraccio N, Bemi A, Duranti E, Taddei S, Ferrannini E, Salvetti A, Monzani F. Recombinant human thyrotropin reduces endothelium-dependent vasodilation in patients monitored for differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(10):4175-8.
83. Lassoued S, Mseddi M, Mnif F, Abid M, Guermazi F, Masmoudi H, El Feki A, Attia H. A comparative study of the oxidative profile in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, and papillary thyroid cancer. *Biol Trace Elem Res*. 2010;138(1-3):107-15.
84. Rostami R, Aghasi MR, Mohammadi A, Nourooz-Zadeh J. Enhanced oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis: inter-relationships to biomarkers of thyroid function. *Clin Biochem*. 2013;46(4-5):308-12.
85. Ates I, Yilmaz FM, Altay M, Yilmaz N, Berker D, Guler S. The relationship between oxidative stress and autoimmunity in Hashimoto's thyroiditis. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(6):791-9.
86. Nanda N, Bobby Z, Hamide A. Oxidative stress in anti thyroperoxidase antibody positive hypothyroid patients. *Asian J. Biochem*. 2012;7:54-8.

87. Changlai SP, Chen WK, Chung C, Chiou SM. Objective evidence of decreased salivary function in patients with autoimmune thyroiditis (chronic thyroiditis, Hashimoto's thyroiditis). *Nucl Med Commun.* 2002;23(10):1029-33.
88. Warfvinge G, Larsson A, Henricsson V, Ericsson UB, Hansen B, Manthorpe R. Salivary gland involvement in autoimmune thyroiditis, with special reference to the degree of association with Sjögren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;74(3):288-93.
89. Osailan SM, Pramanik R, Shirlaw P, Proctor GB, Challacombe SJ. Clinical assessment of oral dryness development of a scoring system related to salivary flow and mucosal wetness. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114:597-603.
90. Osailan S, Pramanik R, Shirodaria S, Challacombe SJ, Proctor GB. Investigating the relationship between hyposalivation and mucosal wetness. *Oral Dis.* 2011;17:109-14.
91. Zalewska A, Knaś M, Waszkiewicz N, Waszkiel D, Sierakowski S, Zwierz K. Rheumatoid arthritis patients with xerostomia have reduced production of key salivary constituents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2013;115:483-90.
92. Agha-Hosseini F, Shirzad N, Moosavi MS. Evaluation of Xerostomia and salivary flow rate in Hashimoto's Thyroiditis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21(1):e1-5.
93. Chang CP, Shiau YC, Wang JJ, Ho ST, Kao CH. Decreased salivary gland function in patients with autoimmune thyroiditis. *Head Neck.* 2003;25(2):132-7.
94. Syed YA, Reddy BS, Ramamurthy TK, Rajendra K, Nerella NK, Krishnan M, Ramesh MV, Mohammed RB. Estimation of Salivary Parameters among Autoimmune Thyroiditis Patients. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR.* 2017;11(7):Zc01-zc4. doi: 10.7860/JCDR/2017/26444.10128.
95. Skutnik-Radziszewska A, Zalewska A. Salivary redox biomarkers in the course of caries and periodontal disease. *Appl Sci.* 2020. doi: 10.3390/app10186240.
96. Zalewska A, Knaś M, Żendzian-Piotrowska M, Waszkiewicz N, Szulimowska J, Prokopiuk S, Waszkiel D, Car H. Antioxidant profile of salivary glands in high fat diet-induced insulin resistance rats. *Oral Dis.* 2014;20:560-6.
97. Zalewska A, Knaś M, Waszkiewicz N, Klimiuk A, Litwin K, Sierakowski S, Waszkiel D. Salivary antioxidants in patients with systemic sclerosis. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(1):61-8. doi: 10.1111/jop.12084.
98. Karsh J, Pavlidis N, Weintraub BD, Moutsopoulos HM. Thyroid disease in Sjögren's syndrome. *Arth Rheum.* 1980;23(11):1326-9.
99. Scofield RH. Autoimmune thyroid disease in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 1996;14(3):321-30.



100. Moreno-Quispe LA, Serrano J, Virto L, Sanz M, Ramírez L, Fernández-Castro M, Hernández G, López-Pintor RM. Association of salivary inflammatory biomarkers with primary Sjögren's syndrome. *J Oral Pathol Med.* 2020;49(9):940-7.
101. Westmuckett AD, Siefert JC, Tesiram YA, Pinson DM, Moore KL. Salivary gland hypofunction in tyrosylprotein sulfotransferase-2 knockout mice is due to primary hypothyroidism. *PLoS one.* 2013;8(8):e71822. doi: 10.1371/journal.pone.0071822.

**10. Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu każdego z nich oraz oświadczenie o zgodzie na wykorzystanie publikacji w rozprawie doktorskiej**

**Publikacja:**

*Enhanced salivary and general oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis women in euthyreosis*

**Katarzyna Morawska, Mateusz Maciejczyk , Łukasz Popławski, Anna Popławska-Kita, Adam Krętowski, Anna Zalewska**

**Journal of Clinical Medicine, 2020 : 9, 7, 20 pp.,IF 4.241, MNiSW: 140**

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
Lek. dent. Katarzyna Morawska	koncepcja pracy, współwykonanie części laboratoryjnej, napisanie i przygotowanie artykułu do druku	70%
dr n. med. Mateusz Maciejczyk	wykonanie analiz biochemicznych, opracowanie i interpretacja wyników,	10%
Lek. Łukasz Popławski	część kliniczna artykułu	3%
dr hab n.med. Anna Popławska-Kita	opracowanie koncepcji pracy	3%
prof. dr hab.n.med. Adam Krętowski	Akceptacja koncepcji pracy	2%
Prof. dr hab. Anna Zalewska	opracowanie koncepcji pracy, akceptacja ostatecznej wersji artykułu do druku	12%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

Białystok, dn. 30.08.2021

Dr n. med. Mateusz Maciejczyk

Zakład Higieny, Epidemiologii i Ergonomii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczam, że mój udział w powstaniu artykułu **Enhanced salivary and general oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis women in euthyrosis. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, doi:10.3390/jcm9072102, IF 4,241, MNI SW 140** związany był z wykonaniem analiz biochemicznych, opracowaniem i interpretacją wyników. Swój udział oceniam na 10%. Wyrażam zgodę na włączenie w/w publikacji do rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

dr n. med. Mateusz Maciejczyk


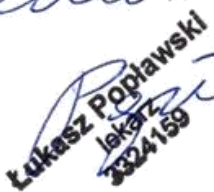


Lek. med. Łukasz Popławski

Zakład Radiologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczam, że mój udział w powstaniu artykułu **Enhanced salivary and general oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis women in euthyreosis. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, doi:10.3390/jcm9072102, IF 4,241, MNiSW 140** związany był z wykonaniem części klinicznej artykułu. Swój udział oceniam na 3%. Wyrażam zgodę na włączenie w/w publikacji do rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

Białystok, dn. 30.08.2021

Dr hab n.med. Anna Popławska-Kita

Klinika Endokrynologii, Diabetologii

I Chorób Wewnętrznych

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczam, że mój udział w powstaniu artykułu **Enhanced salivary and general oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis women in euthyrosis. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, doi:10.3390/jcm9072102, IF 4,241, MNiSW 140** związany był z opracowaniem koncepcji pracy. Swój udział oceniam na 3%. Wyrażam zgodę na włączenie w/w publikacji do rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

dr hab. med. Anna Popławska-Kita  
specjalista chorób wewnętrznych  
endokrynolog, diabetolog  
9473214

Białystok, dn. 30.08.2021

Prof. dr hab.n.med. Adam Krętowski

Klinika Endokrynologii, Diabetologii

I Chorób Wewnętrznych

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczam, że mój udział w powstaniu artykułu **Enhanced salivary and general oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis women in euthyrosis. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, doi:10.3390/jcm9072102, IF 4,241, MNiSW 140** związany był z akceptacją koncepcji pracy. Swój udział oceniam na 2%. Wyrażam zgodę na włączenie w/w publikacji do rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

KIEROWNIK  
Kliniki Endokrynologii, Diabetologii  
i Chorób Wewnętrznych

  
prof. dr hab. n. med. Adam Krętowski

Białystok, dn. 30.08.2021

Prof. dr hab. Anna Zalewska

Zakład Stomatologii Zachowawczej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczam, że mój udział w powstaniu artykułu **Enhanced salivary and general oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis women in euthyrosis. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, doi:10.3390/jcm9072102, IF 4,241, MNiSW 140** związany był z opracowaniem koncepcji pracy, akceptacją ostatecznej wersji artykułu do druku. Swój udział oceniam na 12%. Wyrażam zgodę na włączenie w/w publikacji do rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

  
**KIEROWNIK**  
Zakładu Stomatologii Zachowawczej  
*prof. dr hab. Anna Zalewska*



Publikacja:

Cytokine/chemokine/growth factor profiles contribute to understanding the pathogenesis of the salivary gland dysfunction in euthyroid Hashimotos thyroiditis patients.  
*Morawska Katarzyna Maciejczyk Mateusz, Zięba Sara, Popławski Łukasz, Popławska-Kita Anna, Krętowski Adam, Zalewska Anna.*

**Mediators of Inflammation**, Jul 11;2021: **I F: 4.711 MNiSW : 100**

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
Lek. dent. Katarzyna Morawska	koncepcja pracy, współwykonanie części laboratoryjnej, napisanie i przygotowanie artykułu do druku	67%
dr n. med. Mateusz Maciejczyk	wykonanie analiz biochemicznych, opracowanie i interpretacja wyników,	10%
lek. stom. Sara Zięba	wykonanie analiz biochemicznych,	3%
Lek. Łukasz Popławski	część kliniczna artykułu	3%
dr hab n.med. Anna Popławska-Kita	opracowanie koncepcji pracy	3%
prof. dr hab.n.med. Adam Krętowski	Akceptacja koncepcji pracy	2%
Prof. dr hab. Anna Zalewska	opracowanie koncepcji pracy, akceptacja ostatecznej wersji artykułu do druku	12%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

Białystok, dn. 30.08.2021

Dr n. med. Mateusz Maciejczyk

Zakład Higieny, Epidemiologii i Ergonomii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczam, że mój udział w powstaniu artykułu **Cytokine/chemokine/growth factor profiles contribute to understanding the pathogenesis of the salivary gland dysfunction in euthyroid Hashimotos thyroiditis patients. *Mediators of Inflammation, Jul 11;2021: I F: 4.711 MNiSW : 100*** związany był z wykonaniem analiz biochemicznych, opracowaniem i interpretacją wyników. Swój udział oceniam na 10%. Wyrażam zgodę na włączenie w/w publikacji do rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

dr n. med. Mateusz Maciejczyk



Białystok, dn. 30.08.2021

Lek. stom. Sara Zięba

Samodzielna Pracownia Stomatologii Zachowawczej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczam, że mój udział w powstaniu artykułu **Cytokine/chemokine/growth factor profiles contribute to understanding the pathogenesis of the salivary gland dysfunction in euthyroid Hashimotos thyroiditis patients. *Mediators of Inflammation, Jul 11;2021: I F: 4.711 MNiSW : 100*** związany był z wykonaniem analiz biochemicznych. Swój udział oceniam na 3%. Wyrażam zgodę na włączenie w/w publikacji do rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

Sara Zięba  
lekarz dentysta  
3709015

01.08.21

Sara Zięba

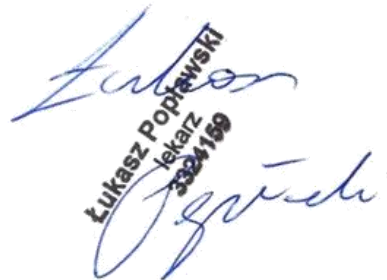
Białystok, dn. 30.08.2021

Lek. med. Łukasz Popławski

Zakład Radiologii

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczam, że mój udział w powstaniu artykułu **Cytokine/chemokine/growth factor profiles contribute to understanding the pathogenesis of the salivary gland dysfunction in euthyroid Hashimotos thyroiditis patients. *Mediators of Inflammation, Jul 11;2021: I F: 4.711 MNiSW : 100*** związany był z wykonaniem części klinicznej artykułu. Swój udział oceniam na 3%. Wyrażam zgodę na włączenie w/w publikacji do rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.



Łukasz Popławski  
lekarz  
3324159

Białystok, dn. 30.08.2021

Dr hab n.med. Anna Popławska-Kita

Klinika Endokrynologii, Diabetologii

I Chorób Wewnętrznych

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczam, że mój udział w powstaniu artykułu **Cytokine/chemokine/growth factor profiles contribute to understanding the pathogenesis of the salivary gland dysfunction in euthyroid Hashimotos thyroiditis patients.***Mediators of Inflammation, Jul 11;2021: I F: 4.711 MNiSW : 100* związany był z opracowaniem koncepcji pracy. Swój udział oceniam na 3%. Wyrażam zgodę na włączenie w/w publikacji do rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

dr hab. med. Anna Popławska-Kita  
specjalista chorób wewnętrznych  
endokrynolog, diabetolog  
9473214

Białystok, dn. 30.08.2021

Prof. dr hab.n.med. Adam Krętowski  
Klinika Endokrynologii, Diabetologii  
I Chorób Wewnętrznych  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczam, że mój udział w powstaniu artykułu **Cytokine/chemokine/growth factor profiles contribute to understanding the pathogenesis of the salivary gland dysfunction in euthyroid Hashimotos thyroiditis patients. *Mediators of Inflammation, Jul 11;2021: I F: 4.711 MNiSW : 100*** związany był z akceptacją koncepcji pracy. Swój udział oceniam na 2%. Wyrażam zgodę na włączenie w/w publikacji do rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

**KIEROWNIK**  
Kliniki Endokrynologii, Diabetologii  
i Chorób Wewnętrznych

prof. dr hab. n. med. Adam Krętowski

Białystok, dn. 30.08.2021

Prof. dr hab. Anna Zalewska

Zakład Stomatologii Zachowawczej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Oświadczam, że mój udział w powstaniu artykułu **Cytokine/chemokine/growth factor profiles contribute to understanding the pathogenesis of the salivary gland dysfunction in euthyroid Hashimotos thyroiditis patients. *Mediators of Inflammation, Jul 11;2021: I F: 4.711 MNI SW : 100*** związany był z opracowaniem koncepcji pracy, akceptacją ostatecznej wersji artykułu do druku. Swój udział oceniam na 12%. Wyrażam zgodę na włączenie w/w publikacji do rozprawy doktorskiej lek. dent. Katarzyny Morawskiej.

**KIEROWNIK**  
Zakładu Stomatologii Zachowawczej

*prof. dr hab. Anna Zalewska*

**KOMISJA BIOETYCZNA  
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO w BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok  
tel. (085) 748 54 07, fax. (085) 748 55 08  
prorektorkl@umb.edu.pl

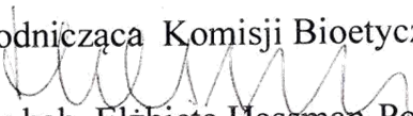
---

Białystok, 24-11-2016

Uchwała nr: R-I-002/386/2016

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Ocena zależności pomiędzy stresem oksydacyjnym w ślinie i surowicy oraz zaburzeniami wydzielania śliny a nasileniem procesów autoimmunizacyjnych u pacjentów z chorobą Hashimoto. Ocena przydatności badania składu i objętości śliny w prognostyce i diagnostyce choroby Hashimoto” przez lek. Katarzynę Morawską wraz z zespołem badawczym z UMB.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej UMB

  
prof. dr hab. Elżbieta Hassman-Poznańska