UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA

FACULTATEA DE MEDICINĂ
DISCIPLINA MICROBIOLOGIE

TÎRZIU ANDREEA-TALIDA

REZUMAT - TEZĂ DE DOCTORAT

INFLUENȚA MICROBIOMULUI INTESTINAL ASUPRA PATOLOGIEI RETINIENE ȘI IMPACTUL INTERVENȚIILOR ANTISEPTICE ASUPRA SUPRAFEȚEI OCULARE

Conducător științific:

PROF. UNIV. DR. HABIL. HORHAT FLORIN-GEORGE

T i m i ș o a r a
2 0 2 6

1. Contextul științific al cercetării

Teza de doctorat analizează rolul microbiomului în patologia oculară dintr-o perspectivă integrativă, reunind două direcții complementare: influența microbiotei intestinale asupra bolilor retiniene și impactul intervențiilor antiseptice asupra microbiotei suprafeței oculare. Alegerea acestei teme a pornit de la necesitatea de a depăși interpretarea strict locală a bolilor oftalmologice și de a evalua ochiul în contextul interacțiunilor sistemice dintre gazdă, microbiom, inflamație, metabolism și imunitate. În ultimele decenii, microbiomul uman a fost redefinit ca un sistem biologic activ, capabil să influențeze homeostazia prin metaboliți, semnale imunologice, menținerea barierei epiteliale și reglarea răspunsului inflamator.

În oftalmologie, interesul pentru axele microbiom-organ a condus la formularea conceptului de axă intestin-ochi. Aceasta descrie comunicarea indirectă dintre microbiota intestinală și țesuturile oculare, în special retina, prin intermediul mediatorilor inflamatori, al metaboliților microbieni și al căilor imune sistemice. Retina, deși protejată prin mecanisme de privilegiu imun și prin bariera hemato-retiniană, rămâne sensibilă la dezechilibre inflamatorii și metabolice sistemice. În paralel, suprafața oculară reprezintă o interfață deschisă către mediul extern, unde comunitățile microbiene locale, lacrimile și imunitatea epitelială contribuie la apărarea oculară și la menținerea stabilității locale.

Prin urmare, lucrarea propune o abordare integrativă, care conectează două niveluri complementare ale patologiei oculare: pe de o parte, nivelul sistemic, reprezentat de microbiomul intestinal și de posibila sa implicare în mecanismele inflamatorii, metabolice și imunologice asociate degenerescenței maculare legate de vârstă, iar pe de altă parte, nivelul local, reprezentat de microbiota suprafeței oculare și de posibilitatea modulării acesteia prin intervenții antiseptice non-antibiotice. Această perspectivă permite depășirea unei interpretări strict locale a bolilor oculare și susține ideea că afecțiunile retiniene și cele ale suprafeței oculare pot fi influențate de dezechilibre microbiene diferite, dar interconectate prin răspunsuri inflamatorii, modificări ale imunității și alterări ale homeostaziei tisulare. În acest context, microbiomul nu este analizat doar ca un element pasiv asociat bolii, ci ca un posibil factor biologic implicat în susceptibilitatea, evoluția și modularea patologiei oculare. Astfel, teza urmărește să evidențieze relevanța microbiotei intestinale în patologia retiniană, cu accent pe degenerescența maculară legată de vârstă, dar și importanța controlului microbiologic local la nivelul suprafeței oculare, în special prin strategii antiseptice cu potențial de reducere a încărcăturii bacteriene fără utilizarea antibioticelor.

2. Obiectivele generale

Motivația cercetării derivă din interesul tot mai mare pentru rolul disbiozei microbiene în bolile cronice, inflamatorii și degenerative. În acest context, microbiomul intestinal este privit ca un sistem biologic capabil să influențeze procese aflate la distanță de tractul digestiv, prin mecanisme inflamatorii, metabolice și imunologice. Degenerescența maculară legată de vârstă reprezintă una dintre principalele cauze de afectare ireversibilă a vederii la persoanele vârstnice, iar patogeneza sa rămâne multifactorială și incomplet elucidată. Inflamația cronică de grad redus, stresul oxidativ, activarea complementului, disfuncția vasculară și modificările metabolice sunt mecanisme centrale în această boală, iar microbiomul intestinal poate interfera cu aceste căi prin metaboliți microbieni și prin modularea răspunsului imun.

Scopul principal al tezei a fost evaluarea contribuției microbiomului la patologia oculară, printr-o analiză integrată a mediului microbian sistemic și local. Lucrarea a urmărit clarificarea relevanței axei intestin-ochi, evaluarea modificărilor microbiotei intestinale la pacienții cu degenerescență maculară legată de vârstă și analiza efectului unei intervenții antiseptice topice asupra încărcăturii bacteriene de la nivelul suprafeței oculare. Astfel, cercetarea conectează două direcții complementare: rolul microbiomului intestinal în patologia retiniană și importanța controlului microbiologic local la nivelul suprafeței oculare.

Obiectivele specifice ale tezei au inclus sintetizarea literaturii privind relația dintre disbioză, axa intestin-ochi și bolile oculare; evaluarea efectului tratamentului cu picături oftalmice pe bază de ulei ozonat lipozomal asupra culturilor conjunctivale; caracterizarea microbiomului intestinal prin metode metagenomice la pacienții cu degenerescență maculară legată de vârstă; compararea profilurilor microbiene dintre pacienți și martori; explorarea diferențelor dintre formele uscată și umedă ale bolii; și identificarea limitărilor metodologice relevante pentru studiile viitoare.

3. Structura generală a tezei și ipoteza de lucru

Teza este organizată în două părți principale. Partea generală prezintă cadrul conceptual al microbiomului uman, rolul microbiotei intestinale în reglarea imunității, metabolismului și inflamației, precum și mecanismele prin care aceasta poate influența organe aflate la distanță, inclusiv retina. De asemenea, sunt abordate particularitățile axei intestin-ochi, microbiota suprafeței oculare și relevanța intervențiilor antiseptice non-antibiotice în oftalmologie.

Partea experimentală include trei contribuții științifice complementare. Primul studiu este o analiză narativă privind relația dintre dezechilibrul microbiomului și bolile oculare. Al doilea studiu este o cercetare clinică prospectivă, de tip pre-post, care evaluează efectul unui tratament scurt cu picături pe bază de ulei ozonat lipozomal asupra pozitivității culturilor de pe suprafața oculară. Al treilea studiu este un studiu pilot observațional, caz-martor, care investighează profilul metagenomic al microbiomului intestinal la pacienți cu degenerescență maculară legată de vârstă.

Ipoteza de lucru a fost că patologia oculară poate fi influențată atât de dezechilibre microbiene sistemice, prin axa intestin-retină, cât și de modificări locale ale ecosistemului microbian ocular. Astfel, microbiomul a fost analizat ca posibil factor modulator al inflamației, susceptibilității la boală și răspunsului la intervenții terapeutice non-antibiotice.

4. Microbiomul intestinal și axa intestin-ochi

Microbiomul intestinal reprezintă un ecosistem complex, implicat în menținerea barierei intestinale, educarea sistemului imun și producerea de metaboliți cu efecte sistemice. În condiții de eubioză, acesta contribuie la homeostazia organismului, în timp ce disbioza poate favoriza creșterea permeabilității intestinale, translocarea produselor microbiene și menținerea unei inflamații cronice de grad redus. Aceste mecanisme pot influența țesuturi aflate la distanță de tractul digestiv, inclusiv structurile retiniene.

Axa intestin-ochi descrie comunicarea indirectă dintre microbiota intestinală și țesuturile oculare, fără a presupune colonizarea directă a ochiului de către microorganisme intestinale. Această comunicare este mediată prin metaboliți microbieni, molecule asociate microorganismelor, citokine, activarea imunității înnăscute și modificări ale căilor inflamatorii și ale complementului. Retina, având o activitate metabolică intensă și o sensibilitate crescută la stres oxidativ, poate fi vulnerabilă la astfel de dezechilibre sistemice, mai ales în contextul îmbătrânirii.

În degenerescența maculară legată de vârstă, disfuncția epiteliului pigmentar retinian, acumularea de drusen, activarea complementului, inflamația, stresul oxidativ și afectarea microvasculară sunt mecanisme importante. Microbiomul intestinal poate interfera cu aceste procese prin modularea răspunsului imun, a metabolismului și a inflamației sistemice. Deși dovezile actuale sunt încă predominant asociative, ele susțin investigarea microbiomului intestinal ca posibil biomarker, factor modulator sau țintă de intervenție în bolile retiniene degenerative.

5. Studiul I: Rolul dezechilibrului microbiomului în bolile oculare

Primul studiu al tezei, publicat în *Journal of Clinical Medicine*, a avut rolul de a fundamenta conceptual direcția doctorală printr-o analiză narativă a relației dintre disbioză, microbiom și patologia oculară. Acest studiu a reprezentat punctul de plecare al cercetării, deoarece a permis conturarea cadrului teoretic necesar pentru înțelegerea modului în care dezechilibrele microbiene pot influența atât suprafața oculară, cât și structurile intraoculare, în special retina. Prin abordarea sa integrativă, studiul a urmărit reunirea informațiilor provenite din mai multe domenii complementare, precum microbiologia, imunologia, oftalmologia clinică, biologia moleculară și cercetarea metagenomică.

Analiza a inclus literatura referitoare la microbiomul intestinal, microbiota suprafeței oculare, mecanismele imunologice implicate în menținerea homeostaziei oculare, rolul metaboliților microbieni și posibila contribuție a disbiozei la apariția sau agravarea unor boli oculare. Un accent important a fost pus pe conceptul de axă intestin-ochi, care presupune existența unor mecanisme de comunicare indirectă între microbiomul intestinal și țesuturile oculare, prin intermediul inflamației sistemice, al metaboliților circulanți, al activării imunității înnăscute și adaptative, al alterării barierelor epiteliale și al modificărilor metabolice. Această perspectivă este relevantă mai ales în bolile retiniene cronice, unde procesele inflamatorii și degenerative nu pot fi explicate exclusiv prin factori locali.

Rezultatele sintezei au arătat că microbiomul poate influența patologia oculară prin mecanisme multiple, diferite în funcție de compartimentul ocular afectat. La nivelul suprafeței oculare, modificările microbiotei locale pot contribui la inflamație cronică, uscăciune oculară, instabilitatea filmului lacrimal, alterarea răspunsului imun local și creșterea susceptibilității la infecții. Suprafața oculară, fiind expusă permanent mediului extern, reprezintă un ecosistem cu biomasa microbiană redusă, dar cu importanță biologică semnificativă. Echilibrul dintre microorganismele locale, filmul lacrimal, epiteliul corneo-conjunctival și mecanismele imune contribuie la menținerea homeostaziei. Atunci când acest echilibru este perturbat, pot apărea condiții favorabile inflamației și colonizării cu germeni potențial patogeni.

În cazul bolilor retiniene, influența microbiomului pare să fie mai degrabă indirectă și sistemică. Retina nu este colonizată în mod fiziologic de microorganisme, însă poate fi afectată de semnale provenite de la nivel intestinal. Disbioza poate favoriza creșterea permeabilității intestinale, pătrunderea în circulație a unor molecule microbiene, activarea receptorilor imunității înnăscute și menținerea unei inflamații

cronice de grad redus. În plus, metaboliții microbieni, precum acizii graşi cu lanț scurt, derivații triptofanului și acizii biliari secundari, pot influența răspunsul imun, stresul oxidativ, funcția vasculară și metabolismul celular. Aceste mecanisme sunt relevante pentru patologia retiniană degenerativă, inclusiv pentru degenerescența maculară legată de vârstă, în care inflamația, activarea complementului, disfuncția epiteliului pigmentar retinian și stresul oxidativ au un rol important.

Studiul a evidențiat, de asemenea, faptul că axa intestin-ochi reprezintă un cadru conceptual promițător, dar încă insuficient demonstrat prin studii longitudinale, intervenționale și prin cercetări cu loturi mari de pacienți. Datele existente susțin existența unor asocieri între disbioză și diferite afecțiuni oculare, însă nu permit încă stabilirea clară a unei relații cauzale. În acest sens, microbiomul trebuie interpretat mai degrabă ca un posibil modulator al susceptibilității și progresiei bolii, nu ca un determinant unic al patologiei oculare. Această concluzie este importantă deoarece plasează microbiomul într-o rețea complexă de factori biologici, alături de vârstă, predispoziție genetică, dietă, comorbidități, status metabolic, medicație și factori de mediu.

O altă concluzie majoră a studiului a fost legată de limitările metodologice ale cercetărilor existente. Studiile analizate prezintă o heterogenitate importantă în ceea ce privește designul, dimensiunea cohortelor, criteriile de includere, metodele de recoltare a probelor, tehnicile de secvențiere, bazele de date utilizate pentru identificarea taxonomică și strategiile bioinformatice. În plus, factori precum dieta, tratamentele antibiotice sau antiinflamatoare, bolile asociate și diferențele geografice pot influența semnificativ compoziția microbiomului și pot limita comparabilitatea rezultatelor. Din acest motiv, studiul a subliniat necesitatea unor cercetări mai bine standardizate, cu fenotipare clinică riguroasă și cu metode moderne de analiză metagenomică.

Prin urmare, Studiul I a avut un rol esențial în structura tezei, deoarece a justificat direcțiile aplicate ale cercetării doctorale. Pe baza concluziilor desprinse din literatura analizată, teza a continuat prin două abordări complementare: una locală, concentrată asupra microbiotei suprafeței oculare și asupra posibilității de reducere a încărcăturii bacteriene printr-o intervenție antiseptică non-antibiotică, și una sistemică, orientată spre caracterizarea microbiomului intestinal la pacienți cu degenerescență maculară legată de vârstă. Astfel, primul studiu a constituit fundamentul teoretic și științific al întregii cercetări doctorale, oferind argumentele necesare pentru investigarea microbiomului ca posibil factor implicat în patologia oculară.

6. Studiul II: Reducerea pozitivității culturilor de pe suprafața oculară după tratament de scurtă durată cu picături oftalmice pe bază de ulei ozonat lipozomal

Al doilea studiu al tezei a avut ca obiectiv evaluarea impactului unui tratament topic de scurtă durată cu picături oftalmice pe bază de ulei ozonat lipozomal asupra pozitivității culturilor bacteriene de la nivelul suprafeței oculare. Studiul s-a înscris în direcția de cercetare privind microbiota oculară locală și posibilitatea modulării acesteia prin intervenții antiseptice non-antibiotice. Importanța acestei abordări derivă din faptul că suprafața oculară reprezintă un compartiment expus permanent mediului extern, colonizat de o microbiotă cu biomasa redusă, dar cu relevanță clinică importantă, mai ales în contextul inflamației, al riscului infecțios și al procedurilor oftalmologice.

Cercetarea a fost realizată ca studiu clinic prospectiv, monocentric, de tip pre-post, în cadrul Clinicii de Oftalmologie din Timișoara. Lotul a inclus 101 pacienți, fiecare participant fiind evaluat printr-o recoltare microbiologică inițială, urmată de administrarea tratamentului topic și de o recoltare de control după un interval scurt de urmărire. Designul de tip pereche a fost important deoarece a permis compararea statusului microbiologic al aceluiași ochi înainte și după intervenție, reducând variabilitatea interindividuală și oferind o imagine mai clară asupra modificărilor apărute în urma tratamentului. Astfel, fiecare pacient a funcționat ca propriul său reper de comparație, ceea ce a consolidat valoarea observațională a rezultatelor obținute.

Intervenția a constat în administrarea de picături oftalmice cu ulei ozonat lipozomal, câte o picătură de patru ori pe zi, timp de patru zile. Alegerea acestui produs a fost justificată de mecanismul său antiseptic non-antibiotic și de interesul clinic pentru metode capabile să reducă încărcătura bacteriană fără utilizarea antibioticelor. Uleiul ozonat lipozomal prezintă un potențial antimicrobian prin efecte oxidative locale, iar forma lipozomală poate contribui la o distribuție mai bună la nivelul suprafeței oculare și la o tolerabilitate acceptabilă. Într-un context în care rezistența antimicrobiană reprezintă o problemă tot mai importantă, intervențiile antiseptice non-antibiotice pot deveni utile pentru controlul microbiologic local, mai ales atunci când obiectivul este reducerea contaminării bacteriene și nu tratamentul unei infecții active.

Metodologia studiului a inclus recoltarea probelor de la nivel conjunctival, cultivarea microbiologică, identificarea izolatelor bacteriene și compararea statusului culturilor înainte și după tratament. Au fost urmărite atât modificările de pozitivitate ale culturilor, cât și tipurile de bacterii izolate, persistența culturilor pozitive și eventualele schimbări ale profilului microbiologic după intervenție. Această componentă

microbiologică a permis aprecierea efectului tratamentului asupra încărcăturii bacteriene de la nivelul suprafeței oculare și a oferit date relevante privind capacitatea unei intervenții antiseptice scurte de a modifica statusul bacterian conjunctival.

Pe lângă componenta microbiologică, studiul a inclus și o evaluare clinică a tolerabilității și siguranței tratamentului. Au fost monitorizate simptome subiective precum senzația de arsură, senzația de corp străin sau fotofobia, dar și semne obiective precum hiperemia conjunctivală, captarea fluoresceinei, timpul de rupere a filmului lacrimal și testul Schirmer. Această evaluare a fost necesară deoarece eficiența microbiologică a unei intervenții topice trebuie interpretată întotdeauna împreună cu impactul său asupra confortului ocular și asupra integrității suprafeței oculare. Un produs utilizat în această zonă trebuie să reducă încărcătura microbiană fără să inducă iritație semnificativă, afectare epitelială sau destabilizarea filmului lacrimal.

Prin designul său, studiul a combinat o componentă microbiologică obiectivă cu o componentă clinică practică, reflectând nevoia de a evalua simultan eficiența și siguranța intervențiilor aplicate la nivelul suprafeței oculare. Această abordare este relevantă mai ales în oftalmologie, unde pregătirea suprafeței oculare, reducerea contaminării bacteriene și prevenirea complicațiilor infecțioase au o importanță majoră. În același timp, studiul contribuie la discuția actuală privind utilizarea rațională a antibioticelor și posibilitatea introducerii unor alternative antiseptice în situațiile în care nu este necesară terapie antibiotică propriu-zisă.

În ansamblu, Studiul II a reprezentat componenta locală aplicată a cercetării doctorale. Dacă primul studiu a stabilit cadrul conceptual al relației dintre microbiom, disbioză și patologia oculară, acest al doilea studiu a testat practic posibilitatea de a modula microbiota suprafeței oculare printr-o intervenție topică antiseptică, de scurtă durată. Rezultatele acestui demers au oferit informații utile privind rolul strategiilor non-antibiotice în reducerea încărcăturii bacteriene conjunctivale și au susținut ideea că suprafața oculară poate fi abordată nu doar ca o zonă anatomică expusă contaminării, ci ca un ecosistem microbian local care poate fi influențat terapeutic.

Profilul de tolerabilitate a fost favorabil. Manifestările raportate au fost minime, fără semne clinice importante de afectare a suprafeței oculare. Nu au fost observate modificări relevante ale parametrilor filmului lacrimal sau leziuni epiteliale semnificative. Din punct de vedere practic, studiul sugerează că antisepticele non-antibiotice pot reprezenta o opțiune utilă pentru controlul încărcăturii microbiene locale, în special în contexte în care se dorește reducerea expunerii la antibiotice și menținerea unei tolerabilități bune.

7. Studiul III: Profilarea metagenomică a microbiomului intestinal în degenerescența maculară legată de vârstă – studiu pilot

Al treilea studiu al tezei a reprezentat componenta sistemică aplicată a cercetării doctorale și a avut ca obiectiv investigarea microbiomului intestinal la pacienți cu degenerescență maculară legată de vârstă. Studiul a fost conceput ca un studiu pilot observațional, de tip caz-martor, având un caracter descriptiv și explorator. Prin această abordare, s-a urmărit evaluarea posibilelor diferențe ale compoziției microbiomului intestinal între pacienții cu degenerescență maculară și martorii fără patologie retiniană, precum și explorarea unor particularități microbiene asociate formelor umedă și uscată ale bolii.

Lotul de studiu a inclus 35 de participanți, dintre care 19 pacienți diagnosticați cu degenerescență maculară legată de vârstă și 16 martori fără patologie retiniană. Recrutarea s-a desfășurat în cadrul Clinicii de Oftalmologie din Timișoara, cu respectarea aprobărilor etice, a consimțământului informat și a anonimizării datelor. Grupul de control a fost constituit din subiecți fără semne clinice de patologie retiniană, ceea ce a permis compararea profilurilor microbiene intestinale între pacienții cu AMD și martori.

Participanții au fost evaluați clinic și încadrați în grupurile corespunzătoare în funcție de prezența sau absența degenerescenței maculare. În cadrul grupului AMD, au fost luate în considerare și formele clinice ale bolii, respectiv forma uscată și forma umedă, pentru a permite o analiză exploratorie suplimentară. Această stratificare a fost relevantă deoarece degenerescența maculară legată de vârstă nu reprezintă o entitate biologică uniformă, ci include fenotipuri diferite, cu mecanisme inflamatorii, vasculare și degenerative parțial distincte. Prin urmare, analiza microbiomului intestinal în raport cu aceste forme clinice poate oferi indicii preliminare privind posibila relație dintre profilul microbian și expresia fenotipică a bolii.

Probele fecale au fost procesate standardizat, utilizând 50 mg de material biologic pentru fiecare probă. Extracția ADN-ului a fost realizată cu kitul ZymoBIOMICS DNA Miniprep, iar cuantificarea ADN-ului dublu catenar a fost efectuată prin Qubit dsDNA HS. Secvențierea a fost realizată pe platforma Oxford Nanopore Technologies, folosind Rapid Barcoding Kit 24 V14, în două runde de secvențiere care au inclus și controale negative. Includerea controalelor negative a fost importantă pentru monitorizarea potențialelor contaminări, aspect relevant în orice analiză microbiologică și metagenomică.

Datele obținute au fost evaluate prin indicatori de calitate, iar analiza bioinformatică a fost realizată cu ajutorul platformelor EPI2ME Labs și One Codex. Aceste instrumente au permis caracterizarea taxonomică a probelor și evaluarea diversității microbiene. Prin utilizarea unei abordări metagenomice long-read, studiul a urmărit obținerea unei rezoluții mai bune comparativ cu metodele strict bazate pe secvențierea 16S rRNA. Această alegere metodologică este importantă deoarece metodele metagenomice pot oferi o imagine mai detaliată asupra comunităților microbiene, permițând o caracterizare mai profundă a structurii bacteriene și a variațiilor dintre probe.

Obiectivele principale ale analizei au fost descrierea compoziției microbiomului intestinal, evaluarea diversității alfa și beta, compararea profilurilor microbiene dintre pacienții cu degenerescență maculară și martori, precum și explorarea diferențelor dintre formele umedă și uscată de AMD. Fiind un studiu pilot, rezultatele au fost interpretate cu prudență, accentul fiind pus pe identificarea unor tendințe biologice și nu pe demonstrarea unor relații cauzale definitive. Această precauție este necesară deoarece microbiomul intestinal este influențat de numeroși factori, precum vârsta, dieta, medicația, comorbiditățile, mediul de viață și statusul metabolic.

Analiza microbiomului intestinal a arătat că toate probele incluse au trecut controlul calității și au putut fi utilizate pentru evaluarea metagenomică. La nivel general, comunitățile microbiene au fost dominate de filumuri bacteriene așteptate pentru microbiomul intestinal uman, în special Firmicutes și Bacteroidota. Genurile frecvent observate au inclus Prevotella, Faecalibacterium, Bacteroides și Alistipes, confirmând existența unei structuri intestinale complexe și heterogene. Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele generale privind microbiomul intestinal, care descriu o variabilitate importantă între indivizi, chiar și în absența unei patologii evidente.

În grupul pacienților cu degenerescență maculară s-a observat o variabilitate mai mare a profilurilor microbiene comparativ cu martorii. Această dispersie crescută poate sugera o instabilitate ecologică mai accentuată a microbiomului intestinal la pacienții cu AMD sau o influență mai mare a factorilor individuali asupra compoziției microbiene. În schimb, martorii au prezentat o tendință de grupare mai apropiată, sugerând profiluri microbiene relativ mai omogene. Totuși, aceste observații trebuie interpretate în contextul dimensiunii relativ reduse a lotului total și al caracterului pilot al studiului.

În analiza comparativă, pacienții cu degenerescență maculară au prezentat tendințe de creștere pentru genuri precum Alistipes, Bacteroides, Ruminococcus,

Clostridium și Oscillibacter, în timp ce martorii au prezentat abundențe relativ mai mari pentru Prevotella și Roseburia. Aceste diferențe nu trebuie interpretate ca semnături microbiene definitive ale bolii, ci ca observații exploratorii care pot orienta cercetările viitoare. Unele dintre aceste genuri sunt implicate în metabolismul acizilor grași cu lanț scurt, în reglarea răspunsului inflamator, în menținerea funcției barierei intestinale și în interacțiunile dintre microbiom și imunitatea gazdei. Prin urmare, chiar dacă rezultatele nu stabilesc o relație cauzală, ele susțin ipoteza că pacienții cu AMD pot prezenta modificări ale ecosistemului intestinal cu potențială relevanță biologică.

Diversitatea alfa a fost mai redusă în grupul AMD pentru indicii Shannon și Simpson, în timp ce bogăția observată a prezentat diferențe mai puțin clare. Această reducere modestă a diversității poate fi interpretată ca un posibil semn de disbioză ecologică sau funcțională. Cu toate acestea, suprapunerile dintre pacienți și martori arată că degenerescența maculară nu este asociată, în acest studiu, cu un profil microbian unic, simplu și ușor reproductibil. Mai degrabă, rezultatele sugerează existența unor modificări subtile, dependente de contextul individual și de factorii clinici asociați.

Analiza diversității beta a evidențiat absența unor clustere complet separate între pacienții cu AMD și martori. Cu toate acestea, s-a observat o dispersie mai mare în grupul AMD și o grupare mai apropiată a martorilor. Această constatare susține ideea că microbiomul intestinal al pacienților cu degenerescență maculară poate fi mai heterogen, fără a prezenta însă o separare categorică față de microbiomul subiecților fără patologie retiniană. Din punct de vedere biologic, acest rezultat este important deoarece AMD este o boală multifactorială, influențată de vârstă, factori genetici, status inflamator, metabolism, comorbidități și factori de mediu. În acest context, microbiomul intestinal poate acționa ca un modulator al riscului și al mediului inflamator sistemic, nu ca un marker izolat și specific al bolii.

Analiza exploratorie a formelor umedă și uscată de degenerescență maculară a evidențiat diferențe descriptive între subgrupuri, însă acestea trebuie interpretate cu prudență din cauza numărului redus de participanți din fiecare subgrup. În forma uscată au fost observate tendințe de abundență mai mare pentru anumite genuri precum Alistipes și Oscillibacter, în timp ce forma umedă a prezentat o reprezentare relativ mai mare a genului Prevotella. Aceste observații pot sugera existența unor particularități microbiene asociate fenotipurilor clinice ale bolii, dar nu permit formularea unor concluzii definitive. Ele indică necesitatea ca studiile viitoare să includă loturi mai mari

și o stratificare riguroasă a pacienților în funcție de forma, stadiul și tratamentul degenerescenței maculare.

În ansamblu, Studiul III a arătat că pacienții cu degenerescență maculară legată de vârstă prezintă anumite modificări exploratorii ale microbiomului intestinal, caracterizate prin heterogenitate crescută, tendințe de modificare a abundenței unor genuri bacteriene și o reducere modestă a diversității alfa. Totuși, lipsa unei separări clare între grupuri și suprapunerea profilurilor microbiene confirmă faptul că microbiomul intestinal nu poate fi interpretat ca un determinant unic al bolii. Rezultatele susțin mai degrabă ipoteza că microbiomul poate contribui la un context biologic favorabil inflamației cronice, dezechilibrelor metabolice și vulnerabilității retiniene.

Caracterul pilot al studiului reprezintă atât o limitare, cât și o contribuție importantă. Limitările principale includ dimensiunea relativ redusă a lotului total, absența unei evaluări detaliate a dietei, lipsa unei analize longitudinale și posibila influență a comorbidităților, medicației și factorilor de mediu asupra compoziției microbiomului intestinal. Cu toate acestea, studiul oferă date preliminare valoroase și susține necesitatea unor cercetări viitoare care să combine analiza metagenomică cu evaluarea factorilor nutriționali, metabolici, inflamatori și genetici. Prin această contribuție, teza aduce o perspectivă modernă asupra degenerescenței maculare legate de vârstă, considerând microbiomul intestinal ca parte a unei rețele sistemice complexe care poate influența sănătatea retiniană.

8. Concluzii și contribuții personale

Rezultatele celor trei studii incluse în prezenta teză trebuie interpretate integrativ, deoarece fiecare abordează o dimensiune complementară a relației dintre microbiom și patologia oculară. Primul studiu a stabilit cadrul conceptual al cercetării, prin analiza literaturii privind rolul disbiozei în bolile oculare și prin evidențierea mecanismelor prin care microbiomul poate influența atât suprafața oculară, cât și structurile intraoculare, în special retina. Al doilea studiu a reprezentat componenta locală aplicată și a arătat că statusul microbiologic al suprafeței oculare poate fi modificat printr-o intervenție topică antiseptică non-antibiotică. Al treilea studiu a abordat componenta sistemică, prin investigarea metagenomică a microbiomului intestinal la pacienți cu degenerescență maculară legată de vârstă.

Privite împreună, rezultatele susțin faptul că microbiomul reprezintă o componentă relevantă a biologiei oculare, însă rolul său diferă în funcție de

compartimentul analizat. La nivelul suprafeței oculare, influența microbiotei este mai directă, prin interacțiunea microorganismelor locale cu epiteliul corneo-conjunctival, filmul lacrimal și mecanismele de apărare locală. La nivel retinian, influența microbiomului intestinal este probabil indirectă și sistemică, fiind mediată prin inflamație cronică de grad redus, metaboliți circulanți, activarea imunității înnăscute, dereglarea complementului, stres oxidativ și modificări metabolice asociate vârstei.

Teza susține că microbiomul nu trebuie privit ca un factor izolat sau ca determinant unic al bolii, ci ca parte a unei rețele complexe de factori biologici. În degenerescența maculară legată de vârstă, microbiomul intestinal poate interacționa cu factori genetici, vasculari, inflamatori, metabolici, nutriționali și de mediu. Modificările observate la nivel intestinal trebuie interpretate ca posibili factori modulatori ai susceptibilității și progresiei bolii, nu ca dovezi ale unei relații cauzale directe. În mod similar, la nivelul suprafeței oculare, microbiota locală trebuie analizată în relație cu filmul lacrimal, integritatea epiteliului, inflamația locală și expunerile terapeutice.

Rezultatele studiului metagenomic au evidențiat la pacienții cu AMD o heterogenitate mai mare a profilurilor microbiene, tendințe de modificare a abundenței unor genuri bacteriene și o reducere modestă a diversității alfa. Lipsa unei separări clare între pacienți și martori arată că nu poate fi definită o semnătură microbiană unică a bolii. Totuși, aceste observații susțin ipoteza că microbiomul intestinal poate contribui la un mediu sistemic favorabil inflamației cronice, dezechilibrelor metabolice și vulnerabilității retiniene.

La nivelul suprafeței oculare, tratamentul cu picături oftalmice pe bază de ulei ozonat lipozomal a determinat o reducere importantă a pozitivității culturilor bacteriene, fără afectarea clinică semnificativă a tolerabilității. Acest rezultat evidențiază potențialul antisepticelor non-antibiotice de a reduce încărcătura microbiană locală și de a contribui la controlul riscului microbiologic, mai ales în contextul preocupărilor privind rezistența antimicrobiană și utilizarea rațională a antibioticelor.

Contribuția personală a tezei constă în integrarea unei teme emergente, microbiomul, în cercetarea oftalmologică, prin combinarea unei analize teoretice cu două studii clinico-microbiologice aplicate. Prima contribuție este realizarea unei sinteze publicate privind rolul dezechilibrului microbiomului în bolile oculare, care a oferit baza conceptuală a cercetării doctorale. A doua contribuție este evaluarea prospectivă a unei intervenții antiseptice non-antibiotice asupra suprafeței oculare, cu demonstrarea reducerii culturilor pozitive după un tratament topic scurt cu ulei ozonat lipozomal. A

treia contribuție este realizarea unui studiu pilot de profilare metagenomică a microbiomului intestinal la pacienți cu AMD, folosind o abordare long-read, care oferă date originale dintr-o cohortă locală și susține fezabilitatea integrării tehnologiilor genomice în cercetarea oftalmologică.

Principalele limite ale cercetării sunt legate de dimensiunea relativ redusă a lotului din studiul metagenomic, caracterul transversal al analizei, absența unei evaluări dietetice detaliate și posibila influență a comorbidităților, medicației și factorilor de mediu asupra microbiomului intestinal. În studiul privind suprafața oculară, absența unui grup control randomizat limitează interpretarea cauzală, iar utilizarea culturilor convenționale nu oferă informații complete despre structura moleculară a microbiotei oculare. Aceste limite impun prudență în interpretarea rezultatelor, dar nu reduc valoarea exploratorie și clinică a cercetării.

Direcțiile viitoare ar trebui să includă studii longitudinale, cohorte mai mari, stratificare atentă a fenotipurilor de degenerescență maculară și integrarea datelor microbiomice cu metabolomică, biomarkeri inflamatori, profil genetic și evaluare nutrițională. Pentru suprafața oculară, sunt necesare studii randomizate care să compare intervențiile antiseptice cu tratamente standard și să evalueze atât cultura bacteriană, cât și modificările moleculare ale comunităților microbiene. Aceste abordări pot clarifica dacă microbiomul reprezintă doar un marker asociat bolii, un factor modulator al răspunsului inflamator sau o posibilă țintă terapeutică.

Cercetarea doctorală a fost valorificată prin trei articole publicate: „From Gut to Eye: Exploring the Role of Microbiome Imbalance in Ocular Diseases”, publicat în *Journal of Clinical Medicine*; „Reduction in Ocular Surface Culture Positivity Following Short-Term Treatment with Liposomal Ozonated Oil Eyedrops”, publicat în *Clinics and Practice*; și „Metagenomic Profiling of the Gut Microbiome in Age-Related Macular Degeneration – A Pilot Study”, publicat în *Biomedicines*. Prin aceste publicații, rezultatele tezei au fost integrate în circuitul științific internațional și contribuie la consolidarea unei direcții moderne de cercetare aflate la intersecția dintre microbiologie și oftalmologie.

VICTOR BABEȘ UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY TIMIȘOARA

FACULTY OF MEDICINE
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

TÎRZIU ANDREEA-TALIDA

SUMMARY OF PhD THESIS

THE INFLUENCE OF THE GUT MICROBIOME ON RETINAL PATHOLOGY AND THE IMPACT OF ANTISEPTIC INTERVENTIONS ON THE OCULAR SURFACE

Scientific Coordinator:
PROF. UNIV. DR. HABIL. HORHAT FLORIN-GEORGE

T i m i ș o a r a
2 0 2 6

1. Scientific context of the research

The doctoral thesis analyzes the role of the microbiome in ocular pathology from an integrative perspective, bringing together two complementary directions: the influence of the gut microbiota on retinal diseases and the impact of antiseptic interventions on the microbiota of the ocular surface. The choice of this topic was based on the need to move beyond a strictly local interpretation of ophthalmological diseases and to evaluate the eye in the context of systemic interactions between the host, microbiome, inflammation, metabolism, and immunity. In recent decades, the human microbiome has been redefined as an active biological system capable of influencing homeostasis through metabolites, immunological signals, maintenance of the epithelial barrier, and regulation of the inflammatory response.

In ophthalmology, the growing interest in microbiome-organ axes has led to the formulation of the gut-eye axis concept. This describes the indirect communication between the intestinal microbiota and ocular tissues, especially the retina, through inflammatory mediators, microbial metabolites, and systemic immune pathways. Although the retina is protected by mechanisms of immune privilege and by the blood-retinal barrier, it remains sensitive to systemic inflammatory and metabolic imbalances. In parallel, the ocular surface represents an interface open to the external environment, where local microbial communities, tears, and epithelial immunity contribute to ocular defense and to the maintenance of local stability.

Therefore, the thesis proposes an integrative approach that connects two complementary levels of ocular pathology: on the one hand, the systemic level, represented by the gut microbiome and its possible involvement in inflammatory, metabolic, and immunological mechanisms associated with age-related macular degeneration, and, on the other hand, the local level, represented by the ocular surface microbiota and the possibility of modulating it through non-antibiotic antiseptic interventions. This perspective allows ocular diseases to be interpreted beyond a strictly local framework and supports the idea that retinal diseases and ocular surface disorders may be influenced by different microbial imbalances, connected through inflammatory responses, immune changes, and alterations in tissue homeostasis. In this context, the microbiome is not analyzed merely as a passive element associated with disease, but as a possible biological factor involved in the susceptibility, progression, and modulation of ocular pathology. Thus, the thesis aims to highlight the relevance of

the gut microbiota in retinal pathology, with emphasis on age-related macular degeneration, as well as the importance of local microbiological control at the ocular surface, especially through antiseptic strategies with the potential to reduce bacterial burden without the use of antibiotics.

2. General objectives

The motivation for this research derives from the growing interest in the role of microbial dysbiosis in chronic, inflammatory, and degenerative diseases. In this context, the gut microbiome is regarded as a biological system capable of influencing processes occurring at a distance from the digestive tract through inflammatory, metabolic, and immunological mechanisms. Age-related macular degeneration is one of the leading causes of irreversible visual impairment in elderly individuals, while its pathogenesis remains multifactorial and incompletely understood. Low-grade chronic inflammation, oxidative stress, complement activation, vascular dysfunction, and metabolic changes are central mechanisms in this disease, and the gut microbiome may interfere with these pathways through microbial metabolites and modulation of the immune response.

The main aim of the thesis was to evaluate the contribution of the microbiome to ocular pathology through an integrated analysis of the systemic and local microbial environments. The work aimed to clarify the relevance of the gut-eye axis, to assess changes in the gut microbiota in patients with age-related macular degeneration, and to analyze the effect of a topical antiseptic intervention on the bacterial burden of the ocular surface. Thus, the research connects two complementary directions: the role of the gut microbiome in retinal pathology and the importance of local microbiological control at the ocular surface.

The specific objectives of the thesis included synthesizing the literature regarding the relationship between dysbiosis, the gut-eye axis, and ocular diseases; evaluating the effect of liposomal ozonated oil eye drops on conjunctival cultures; characterizing the gut microbiome through metagenomic methods in patients with age-related macular degeneration; comparing microbial profiles between patients and controls; exploring differences between dry and wet forms of the disease; and identifying relevant methodological limitations for future studies.

3. General structure of the thesis and working hypothesis

The thesis is organized into two main parts. The general part presents the conceptual framework of the human microbiome, the role of the gut microbiota in regulating immunity, metabolism, and inflammation, as well as the mechanisms through which it may influence distant organs, including the retina. The particularities of the gut-eye axis, the ocular surface microbiota, and the relevance of non-antibiotic antiseptic interventions in ophthalmology are also addressed.

The experimental part includes three complementary scientific contributions. The first study is a narrative review on the relationship between microbiome imbalance and ocular diseases. The second study is a prospective pre-post clinical study evaluating the effect of short-term treatment with liposomal ozonated oil eye drops on the positivity of ocular surface cultures. The third study is a pilot observational case-control study investigating the metagenomic profile of the gut microbiome in patients with age-related macular degeneration.

The working hypothesis was that ocular pathology may be influenced both by systemic microbial imbalances, through the gut-retina axis, and by local changes in the ocular microbial ecosystem. Thus, the microbiome was analyzed as a possible modulator of inflammation, disease susceptibility, and response to non-antibiotic therapeutic interventions.

4. The gut microbiome and the gut-eye axis

The gut microbiome represents a complex ecosystem involved in maintaining the intestinal barrier, educating the immune system, and producing metabolites with systemic effects. In conditions of eubiosis, it contributes to host homeostasis, whereas dysbiosis may promote increased intestinal permeability, translocation of microbial products, and maintenance of low-grade chronic inflammation. These mechanisms may influence tissues located at a distance from the digestive tract, including retinal structures.

The gut-eye axis describes the indirect communication between the intestinal microbiota and ocular tissues, without implying direct colonization of the eye by intestinal microorganisms. This communication is mediated by microbial metabolites, microbial-associated molecules, cytokines, activation of innate immunity, and changes in inflammatory and complement pathways. Because the retina has intense metabolic

activity and increased sensitivity to oxidative stress, it may be vulnerable to such systemic imbalances, especially in the context of aging.

In age-related macular degeneration, retinal pigment epithelium dysfunction, drusen accumulation, complement activation, inflammation, oxidative stress, and microvascular impairment are important mechanisms. The gut microbiome may interfere with these processes by modulating the immune response, metabolism, and systemic inflammation. Although current evidence remains predominantly associative, it supports the investigation of the gut microbiome as a possible biomarker, modulating factor, or intervention target in degenerative retinal diseases.

5. Study I: The role of microbiome imbalance in ocular diseases

The first study of the thesis, published in Journal of Clinical Medicine, had the role of conceptually grounding the doctoral research direction through a narrative review of the relationship between dysbiosis, the microbiome, and ocular pathology. This study represented the starting point of the research, as it allowed the theoretical framework to be outlined for understanding how microbial imbalances may influence both the ocular surface and intraocular structures, especially the retina. Through its integrative approach, the study aimed to bring together information from several complementary fields, including microbiology, immunology, clinical ophthalmology, molecular biology, and metagenomic research.

The analysis included literature on the gut microbiome, the ocular surface microbiota, immunological mechanisms involved in maintaining ocular homeostasis, the role of microbial metabolites, and the possible contribution of dysbiosis to the onset or worsening of ocular diseases. Particular emphasis was placed on the concept of the gut-eye axis, which implies the existence of indirect communication mechanisms between the gut microbiome and ocular tissues through systemic inflammation, circulating metabolites, activation of innate and adaptive immunity, alteration of epithelial barriers, and metabolic changes. This perspective is especially relevant in chronic retinal diseases, where inflammatory and degenerative processes cannot be explained exclusively by local factors.

The results of the synthesis showed that the microbiome may influence ocular pathology through multiple mechanisms that differ according to the ocular compartment involved. At the level of the ocular surface, changes in the local microbiota may contribute to chronic inflammation, dry eye, tear film instability,

alteration of the local immune response, and increased susceptibility to infections. The ocular surface, being permanently exposed to the external environment, represents an ecosystem with low microbial biomass but significant biological importance. The balance between local microorganisms, the tear film, the corneo-conjunctival epithelium, and immune mechanisms contributes to the maintenance of homeostasis. When this balance is disrupted, conditions favorable to inflammation and colonization with potentially pathogenic organisms may occur.

In retinal diseases, the influence of the microbiome appears to be mainly indirect and systemic. The retina is not physiologically colonized by microorganisms, but it may be affected by signals originating from the intestine. Dysbiosis may promote increased intestinal permeability, the entry of microbial molecules into the circulation, activation of innate immune receptors, and maintenance of low-grade chronic inflammation. In addition, microbial metabolites such as short-chain fatty acids, tryptophan derivatives, and secondary bile acids may influence the immune response, oxidative stress, vascular function, and cellular metabolism. These mechanisms are relevant to degenerative retinal pathology, including age-related macular degeneration, in which inflammation, complement activation, retinal pigment epithelium dysfunction, and oxidative stress play important roles.

The study also highlighted that the gut-eye axis represents a promising conceptual framework, although it is still insufficiently demonstrated through longitudinal, interventional studies and research involving large patient cohorts. Existing data support associations between dysbiosis and various ocular conditions, but they do not yet allow a clear causal relationship to be established. In this sense, the microbiome should be interpreted rather as a possible modulator of disease susceptibility and progression, not as a unique determinant of ocular pathology. This conclusion is important because it places the microbiome within a complex network of biological factors, alongside age, genetic predisposition, diet, comorbidities, metabolic status, medication, and environmental factors.

Another major conclusion of the study concerned the methodological limitations of existing research. The analyzed studies show considerable heterogeneity in terms of design, cohort size, inclusion criteria, sampling methods, sequencing techniques, databases used for taxonomic identification, and bioinformatic strategies. In addition, factors such as diet, antibiotic or anti-inflammatory treatments, associated diseases, and geographical differences can significantly influence microbiome

composition and limit the comparability of results. For this reason, the study emphasized the need for better standardized research, with rigorous clinical phenotyping and modern metagenomic analysis methods.

Therefore, Study I had an essential role in the structure of the thesis, because it justified the applied directions of the doctoral research. Based on the conclusions drawn from the analyzed literature, the thesis continued with two complementary approaches: a local one, focused on the ocular surface microbiota and on the possibility of reducing bacterial burden through a non-antibiotic antiseptic intervention, and a systemic one, oriented toward the characterization of the gut microbiome in patients with age-related macular degeneration. Thus, the first study represented the theoretical and scientific foundation of the entire doctoral research, providing the arguments needed to investigate the microbiome as a possible factor involved in ocular pathology.

6. Study II: Reduction in ocular surface culture positivity following short-term treatment with liposomal ozonated oil eye drops

The second study of the thesis aimed to evaluate the impact of short-term topical treatment with liposomal ozonated oil eye drops on the positivity of bacterial cultures from the ocular surface. The study was part of the research direction concerning the local ocular microbiota and the possibility of modulating it through non-antibiotic antiseptic interventions. The importance of this approach derives from the fact that the ocular surface is a compartment permanently exposed to the external environment, colonized by a low-biomass microbiota but with important clinical relevance, especially in the context of inflammation, infectious risk, and ophthalmological procedures.

The research was conducted as a prospective, monocentric, pre-post clinical study within the Ophthalmology Clinic in Timișoara. The study included 101 patients, each participant being evaluated through an initial microbiological sampling, followed by topical treatment and a control sampling after a short follow-up interval. The paired design was important because it allowed the microbiological status of the same eye to be compared before and after the intervention, reducing interindividual variability and providing a clearer view of treatment-related changes. Thus, each patient served as his or her own comparator, which strengthened the observational value of the results obtained.

The intervention consisted of administering liposomal ozonated oil eye drops, one drop four times daily for four days. The choice of this product was justified by its non-antibiotic antiseptic mechanism and by the clinical interest in methods capable of reducing bacterial burden without using antibiotics. Liposomal ozonated oil has antimicrobial potential through local oxidative effects, while the liposomal form may contribute to improved distribution on the ocular surface and acceptable tolerability. In a context in which antimicrobial resistance represents an increasingly important problem, non-antibiotic antiseptic interventions may be useful for local microbiological control, especially when the objective is to reduce bacterial contamination rather than to treat an active infection.

The study methodology included conjunctival sampling, microbiological culture, identification of bacterial isolates, and comparison of culture status before and after treatment. Changes in culture positivity, types of bacterial isolates, persistence of positive cultures, and possible changes in the microbiological profile after the intervention were monitored. This microbiological component allowed the effect of treatment on the bacterial burden of the ocular surface to be assessed and provided relevant data on the ability of a short antiseptic intervention to modify conjunctival bacterial status.

In addition to the microbiological component, the study also included a clinical assessment of treatment tolerability and safety. Subjective symptoms such as burning sensation, foreign body sensation, or photophobia were monitored, as well as objective signs such as conjunctival hyperemia, fluorescein staining, tear film break-up time, and the Schirmer test. This assessment was necessary because the microbiological efficacy of a topical intervention must always be interpreted together with its impact on ocular comfort and ocular surface integrity. A product used in this area must reduce microbial burden without inducing significant irritation, epithelial damage, or tear film destabilization.

Through its design, the study combined an objective microbiological component with a practical clinical component, reflecting the need to evaluate both the efficacy and safety of interventions applied to the ocular surface. This approach is particularly relevant in ophthalmology, where ocular surface preparation, reduction of bacterial contamination, and prevention of infectious complications are of major importance. At the same time, the study contributes to the current discussion regarding

the rational use of antibiotics and the possible introduction of antiseptic alternatives in situations where antibiotic therapy itself is not necessary.

Overall, Study II represented the local applied component of the doctoral research. If the first study established the conceptual framework of the relationship between the microbiome, dysbiosis, and ocular pathology, the second study practically tested the possibility of modulating the ocular surface microbiota through a short-term topical antiseptic intervention. The results of this approach provided useful information regarding the role of non-antibiotic strategies in reducing conjunctival bacterial burden and supported the idea that the ocular surface can be approached not only as an anatomical area exposed to contamination, but as a local microbial ecosystem that can be therapeutically influenced.

The tolerability profile was favorable. The reported manifestations were minimal, without clinically important signs of ocular surface damage. No relevant changes in tear film parameters or significant epithelial lesions were observed. From a practical point of view, the study suggests that non-antibiotic antiseptics may represent a useful option for controlling local microbial burden, especially in contexts in which reducing exposure to antibiotics and maintaining good tolerability are desired.

7. Study III: Metagenomic profiling of the gut microbiome in age-related macular degeneration - a pilot study

The third study of the thesis represented the systemic applied component of the doctoral research and aimed to investigate the gut microbiome in patients with age-related macular degeneration. The study was designed as a pilot observational case-control study, with a descriptive and exploratory character. Through this approach, the aim was to evaluate possible differences in gut microbiome composition between patients with macular degeneration and controls without retinal pathology, as well as to explore microbial particularities associated with wet and dry forms of the disease.

The study group included 35 participants, of whom 19 were patients diagnosed with age-related macular degeneration and 16 were controls without retinal pathology. Recruitment took place at the Ophthalmology Clinic in Timișoara, in compliance with ethical approvals, informed consent, and data anonymization. The control group consisted of subjects without clinical signs of retinal pathology, allowing the intestinal microbial profiles of AMD patients and controls to be compared.

Participants were clinically evaluated and assigned to the corresponding groups according to the presence or absence of macular degeneration. Within the AMD group, the clinical forms of the disease, namely dry and wet AMD, were also considered in order to allow an additional exploratory analysis. This stratification was relevant because age-related macular degeneration is not a uniform biological entity, but includes different phenotypes, with partially distinct inflammatory, vascular, and degenerative mechanisms. Therefore, analyzing the gut microbiome in relation to these clinical forms may provide preliminary indications regarding the possible relationship between the microbial profile and the phenotypic expression of the disease.

Fecal samples were processed in a standardized manner, using 50 mg of biological material for each sample. DNA extraction was performed with the ZymoBIOMICS DNA Miniprep kit, and double-stranded DNA quantification was carried out using Qubit dsDNA HS. Sequencing was performed on the Oxford Nanopore Technologies platform, using the Rapid Barcoding Kit 24 V14, in two sequencing runs that also included negative controls. The inclusion of negative controls was important for monitoring potential contamination, a relevant aspect in any microbiological and metagenomic analysis.

The data obtained were evaluated using quality indicators, and the bioinformatic analysis was performed with EPI2ME Labs and One Codex. These tools allowed taxonomic characterization of the samples and evaluation of microbial diversity. By using a long-read metagenomic approach, the study aimed to obtain better resolution compared with methods based strictly on 16S rRNA sequencing. This methodological choice is important because metagenomic methods can provide a more detailed view of microbial communities, allowing a deeper characterization of bacterial structure and variation between samples.

The main objectives of the analysis were to describe gut microbiome composition, evaluate alpha and beta diversity, compare microbial profiles between patients with macular degeneration and controls, and explore differences between wet and dry forms of AMD. As this was a pilot study, the results were interpreted with caution, with emphasis placed on identifying biological trends rather than demonstrating definitive causal relationships. This caution is necessary because the gut microbiome is influenced by numerous factors, including age, diet, medication, comorbidities, living environment, and metabolic status.

The gut microbiome analysis showed that all included samples passed quality control and could be used for metagenomic evaluation. Overall, the microbial communities were dominated by bacterial phyla expected for the human gut microbiome, especially Firmicutes and Bacteroidota. Frequently observed genera included Prevotella, Faecalibacterium, Bacteroides, and Alistipes, confirming the presence of a complex and heterogeneous intestinal structure. These results are consistent with general data on the gut microbiome, which describe substantial variability between individuals, even in the absence of evident pathology.

In the group of patients with macular degeneration, greater variability of microbial profiles was observed compared with controls. This increased dispersion may suggest more pronounced ecological instability of the gut microbiome in patients with AMD or a stronger influence of individual factors on microbial composition. In contrast, controls showed a tendency toward closer grouping, suggesting relatively more homogeneous microbial profiles. However, these observations must be interpreted in the context of the relatively small total sample size and the pilot character of the study.

In the comparative analysis, patients with macular degeneration showed trends toward increased abundance of genera such as Alistipes, Bacteroides, Ruminococcus, Clostridium, and Oscillibacter, whereas controls showed relatively higher abundances of Prevotella and Roseburia. These differences should not be interpreted as definitive microbial signatures of the disease, but as exploratory observations that may guide future research. Some of these genera are involved in short-chain fatty acid metabolism, regulation of the inflammatory response, maintenance of intestinal barrier function, and interactions between the microbiome and host immunity. Therefore, although the results do not establish a causal relationship, they support the hypothesis that AMD patients may show changes in the intestinal ecosystem with potential biological relevance.

Alpha diversity was lower in the AMD group for the Shannon and Simpson indices, whereas observed richness showed less clear differences. This modest reduction in diversity may be interpreted as a possible sign of ecological or functional dysbiosis. However, the overlap between patients and controls shows that macular degeneration was not associated, in this study, with a unique, simple, and easily reproducible microbial profile. Rather, the results suggest the presence of subtle changes dependent on individual context and associated clinical factors.

Beta diversity analysis showed the absence of completely separated clusters between AMD patients and controls. Nevertheless, greater dispersion was observed in the AMD group and closer grouping among controls. This finding supports the idea that the gut microbiome of patients with macular degeneration may be more heterogeneous, without showing a categorical separation from the microbiome of subjects without retinal pathology. From a biological perspective, this result is important because AMD is a multifactorial disease influenced by age, genetic factors, inflammatory status, metabolism, comorbidities, and environmental factors. In this context, the gut microbiome may act as a modulator of risk and of the systemic inflammatory environment, rather than as an isolated and specific marker of the disease.

The exploratory analysis of wet and dry forms of age-related macular degeneration revealed descriptive differences between subgroups, but these must be interpreted with caution because of the small number of participants in each subgroup. In the dry form, trends toward higher abundance of certain genera such as Alistipes and Oscillibacter were observed, whereas the wet form showed a relatively higher representation of Prevotella. These observations may suggest the existence of microbial particularities associated with the clinical phenotypes of the disease, but they do not allow definitive conclusions. They indicate the need for future studies with larger cohorts and rigorous stratification of patients according to the form, stage, and treatment of macular degeneration.

Overall, Study III showed that patients with age-related macular degeneration present certain exploratory changes in the gut microbiome, characterized by increased heterogeneity, trends in the abundance of certain bacterial genera, and a modest reduction in alpha diversity. However, the lack of clear separation between groups and the overlap of microbial profiles confirm that the gut microbiome cannot be interpreted as a unique determinant of the disease. The results rather support the hypothesis that the microbiome may contribute to a biological context favorable to chronic inflammation, metabolic imbalances, and retinal vulnerability.

The pilot character of the study represents both a limitation and an important contribution. The main limitations include the relatively small total sample size, the absence of a detailed dietary assessment, the lack of longitudinal analysis, and the possible influence of comorbidities, medication, and environmental factors on gut microbiome composition. Nevertheless, the study provides valuable preliminary data

and supports the need for future research combining metagenomic analysis with the evaluation of nutritional, metabolic, inflammatory, and genetic factors. Through this contribution, the thesis brings a modern perspective to age-related macular degeneration, considering the gut microbiome as part of a complex systemic network that may influence retinal health.

8. Conclusions and personal contributions

The three studies included in this thesis should be interpreted integratively, as each addresses a complementary dimension of the relationship between the microbiome and ocular pathology. Study I established the conceptual framework regarding dysbiosis and ocular disease. Study II evaluated local modulation of the ocular surface microbiota through a topical non-antibiotic antiseptic intervention. Study III addressed the systemic component by investigating the gut microbiome in patients with age-related macular degeneration.

Taken together, the results support the relevance of the microbiome in ocular biology, with different mechanisms depending on the compartment analyzed. At the ocular surface, the effect is more direct, through interactions with the epithelium, tear film, and local defense mechanisms. At the retinal level, the effect of the gut microbiome is probably indirect and systemic, mediated by inflammation, circulating metabolites, immune activation, complement dysregulation, oxidative stress, and age-related metabolic changes.

The thesis supports the idea that the microbiome should not be viewed as an isolated or unique determinant of disease, but as part of a wider biological network. In AMD, it may interact with genetic, vascular, inflammatory, metabolic, nutritional, and environmental factors. Therefore, intestinal changes should be interpreted as possible modulators of susceptibility and progression, not as proof of direct causality. Similarly, the ocular surface microbiota must be analyzed in relation to tear film stability, epithelial integrity, local inflammation, and therapeutic exposures.

The metagenomic study showed greater heterogeneity of microbial profiles in AMD patients, trends in the abundance of selected bacterial genera, and a modest reduction in alpha diversity. The absence of clear separation between patients and controls indicates that a unique microbial signature of AMD cannot be defined, but the results support the hypothesis that the gut microbiome may contribute to systemic inflammation, metabolic imbalance, and retinal vulnerability.

At the ocular surface, liposomal ozonated oil eye drops reduced bacterial culture positivity without clinically significant tolerability issues. This result highlights the potential of non-antibiotic antiseptics for reducing local microbial burden and supporting microbiological risk control in the context of rational antibiotic use.

The personal contribution of the thesis consists in integrating the microbiome into ophthalmological research through a published narrative review and two applied clinical-microbiological studies. The first contribution provided the conceptual basis of the research. The second demonstrated the reduction of positive ocular surface cultures after short-term treatment with liposomal ozonated oil. The third provided original pilot metagenomic data from a local cohort of AMD patients and controls, supporting the feasibility of genomic technologies in ophthalmological research.

The main limitations include the relatively small sample size of the metagenomic study, its cross-sectional design, the absence of detailed dietary assessment, and the possible influence of comorbidities, medication, and environmental factors. In the ocular surface study, the absence of a randomized control group and the use of conventional cultures limit causal and molecular interpretation, requiring cautious evaluation of the results.

Future research should include longitudinal studies, larger cohorts, careful AMD phenotype stratification, and integration of microbiomic data with metabolomics, inflammatory biomarkers, genetic profiling, and nutritional assessment. For the ocular surface, randomized studies should compare antiseptic interventions with standard approaches and include both culture-based and molecular microbiota evaluation.

The doctoral research was valorized through three published articles: “From Gut to Eye: Exploring the Role of Microbiome Imbalance in Ocular Diseases” in Journal of Clinical Medicine; “Reduction in Ocular Surface Culture Positivity Following Short-Term Treatment with Liposomal Ozonated Oil Eyedrops” in Clinics and Practice; and “Metagenomic Profiling of the Gut Microbiome in Age-Related Macular Degeneration - A Pilot Study” in Biomedicines. These publications integrate the thesis results into the international scientific circuit and support a modern research direction at the intersection of microbiology and ophthalmology.