"VICTOR BABEȘ" UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY,
TIMIȘOARA
FACULTY OF MEDICINE
Department 4 – Biochemistry and Pharmacology

PUŞCĂŞELU ROXANA-ELENA

DOCTORAL THESIS

RESEARCH ON THE DEVELOPMENT OF NEXT-GENERATION MICROENCAPSULATED PROBIOTICS INCORPORATED INTO FUNCTIONAL FOODS FOR MAINTAINING GUT MICROBIOTA HEALTH AND PREVENTING DISEASES

ABSTRACT

PhD Supervisor:

PROF. UNIV. DR. DR. IOAN OVIDIU SÎRBU

T i m i ș o a r a

2 0 2 6

TABLE OF CONTENTS

List of published scientific papers V

List of abbreviations and symbols VI

Tables list VIII

Figures list IX

Acknowledgement XI

Introduction XII

GENERAL PART

1. Gut microbiota and its role in human physiology and pathology 1

1.1. Gut microbiota – Current concepts and implications 1

1.1.1. Diet–Microbiota–Metabolite interactions 2

1.1.2. Fecal microbiota transplantation and other therapeutic approaches 3

1.1.3. Metagenomics 6

1.1.4. Personalized therapies 7

1.2. The composition of the gut microbiota in a healthy adult 7

1.2.1. Age 9

1.2.2. Gender 9

1.2.3. Ethnicity, dietary habits, and cultural practices 10

1.2.4. Frequency of physical exercise 10

2. Intestinal dysbiosis and its implications in human pathology 11

2.1. Intestinal dysbiosis – definition, classification, and pathophysiological mechanisms 11

2.2. The role of intestinal dysbiosis in human pathology 12

2.2.1. Gastrointetsinal disorders 12

2.2.2. Carviovascular diorders 14

2.2.3. The gut–brain axis and neurodegenerative disorders 15

2.3. Intestinal dysbiosis in metabolic diseases 18

3. Probiotics and their importance in human health 21

3.1. Mechanisms of action of probiotics on the gut microbiota 21

3.2. The role of probiotics in the prevention and management of diseases 23

3.3. Metabolic syndrome and diabetes 27

3.4. Probiotic encapsulation – technological principles, strains of interest, and biological and medical perspectives 28

3.5. Safety and tolerability of administering encapsulated probiotics 32

4. Functional foods. The impact of functional foods on the gut microbiota and metabolic parameters 35

SPECIAL PART

5. Experimental part 39

5.1. Development and testing of probiotic capsules 39

5.1.1. Materials 39

5.1.2. Methods 39

5.1.3. Physical and optical characterization of capsules 41

5.1.4. Encapsulation efficiency and the viability of encapsulated probiotics 43

5.1.5. Swelling behavior and capsule kinetics 44

5.2. Development and testing of the product with encapsulated probiotics 45

5.2.1. Materials 45

5.2.2. Methods 45

5.3. Testarea in vivo si secvențierea probelor biologice 48

5.3.1. Materials 48

5.3.2. Experimental design 48

5.4. Statistical analysis methods used 55

5.5. Ethical considerations 55

6. Research results 57

6.1. Biopolymeric capsules with encapsulated probiotics 57

6.2. Development and testing of the product with encapsulated probiotics 70

6.3. *In vivo* testing and sequencing of biological samples 73

7. Discussions 94

7.1. Biopolymeric capsules with encapsulated probiotics 94

7.2. Development and testing of the product with encapsulated probiotics 99

7.3. *In vivo* testing and sequencing of biological samples 100

8. Conclusions and personal contributions 104

9. Bibliography 108

10. Anexes I

10.1. Questionnaire distributed to participants I

10.2. Participant informed consent for the study V

10.3. *In extenso* scientific papers VII

SUMMARY

The gut microbiota – a physiological partner of humans

The fundamental role of the gut microbiota in human health is supported by compelling research findings reported in the scientific literature. The gut microbiota is key to many aspects of human health, and microbial imbalance or dysbiosis (altered bacterial colonization associated with disease expression) has been linked to various gastrointestinal, metabolic, neurological, and oncological disorders. In dysbiosis, the composition of the microbiota undergoes significant changes. In eubiosis, it comprises over 100 trillion microorganisms, mainly from the phyla *Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria*, and *Proteobacteria*, playing a significant role in maintaining intestinal barrier integrity and preventing disease. Scientific studies have highlighted the existence of strains with protective (anti-inflammatory) roles that stimulate the immune system. The global pandemic caused by SARS-CoV-2 has driven the population toward increased consumption of functional products, especially probiotics. According to statistics, worldwide populations have shifted their attention toward such supplements and functional foods with superior nutritional quality.

The World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization (FAO) have recognized the beneficial effects of probiotics and have encouraged their use in foods, while most European physicians recommend probiotic consumption. The development of functional foods that include microbial strains with beneficial effects on human health, along with easy access to such products, could represent an important step in ensuring population health.

The potential of probiotics as modulators of the gut microbiota

Although the dietary supplement market in Romania has experienced significant growth, probiotics are still mainly marketed and associated with antibiotic use. Most of the available formulations are in powder or capsule form. The most pressing issue, however, is the level of information and awareness regarding the benefits of regular administration for human health. Nevertheless, recent efforts have focused on the development and diversification of probiotic formulations, as well as on expanding their use. At the same time, the importance of eubiosis in maintaining health has become a topic of growing general interest.

Technological aspects in probiotic formulation and processing

Since probiotics are living microorganisms, maintaining cellular viability remains a major challenge. This may also be one of the main reasons for consumers' lack of trust in new probiotic formulations. Innovative modern technologies—both in production and especially in formulation—could represent a key area of interest in this regard. Previous studies have shown that microencapsulation of bacterial strains contributes to preserving viability and offers

the possibility of increasing administration efficiency. An important factor in probiotic encapsulation is the material used. Therefore, the aim of this research is based on the use of materials that are relatively new in the biomedical industry but have a positive background and high applicability in the food sector. Natural biopolymers, such as sodium alginate and wheat starch, are biocompatible, biodegradable, non-toxic, inexpensive, accepted for consumption in quantum satis doses, and have proven efficiency as encapsulation materials. Due to its encapsulation properties, ability to maintain cell viability, and capacity for controlled and targeted release, alginate is the most widely used biopolymer for this purpose. Wheat starch, in addition to its ability to encapsulate and ferment in the colon, is a biopolymer mainly used as an insoluble dietary fiber. Moreover, it is capable of incorporating and protecting biologically active compounds during processing, storage, and passage through the gastrointestinal tract.

Motivation

The present research aims to identify the optimal biopolymeric composition for encapsulating beneficial bacterial strains, as well as the development method and its optimization. Additionally, testing the capsules in simulated gastrointestinal fluids and optimizing them contribute to obtaining products with targeted and controlled release.

The development of food product prototypes aims to create functional foods intended for all consumers, without constraints or inconveniences in their use. Furthermore, the formulation of functional foods increases consumer confidence in the benefits of probiotic use.

This study seeks to overcome these limitations and provide solutions for both producers and consumers.

Thus, through the proposed topic, the doctoral research addresses several aspects, including:â

1. the development of specific biopolymeric microcapsules for the incorporation of *Lacticaseibacillus rhamnosus* and *Bacillus clausii*, aiming to improve their survival;
2. the development and characterization of a functional food containing encapsulated probiotics;
3. the evaluation of beneficial effects on the microbiota, biological parameters, and overall well-being in patients diagnosed with Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), using metagenomic analyses based on next-generation sequencing.

The present work addresses a research field that is rapidly expanding both nationally and internationally, and the obtained results are of interest for the development of therapeutic strategies, with major implications for all categories of

consumers. The protection of bacterial strains through encapsulation and their incorporation into conventional food matrices represents a concept of major scientific interest, relatively new on the Romanian market.

According to in vitro studies conducted to date, probiotics encapsulated in biopolymeric matrices have proven to be effective over a longer period, with higher viability compared to non-encapsulated strains. The present research aims to identify the optimal biopolymer composition required to develop an edible material capable of incorporating microbial strains, resistant within food matrices, and suitable for the development of functional foods.

The consumption of such products (in this case, yogurt supplemented with encapsulated probiotics) may have beneficial effects in alleviating the consequences of Type 2 Diabetes Mellitus and may contribute to improving consumers' overall well-being. The administration of these products to patients with T2DM can support the restoration of the microbiome, facilitate improvements in insulin sensitivity, and enhance intestinal gluconeogenesis.

Through its findings, this research generates data of interest with both national and international implications, representing a link between nutrition and health, biotechnology, food science, medicine, and pharmacy.

Aim and objectives

The present study aims to evaluate the effects of functional foods containing a biopolymeric encapsulation system—effective in preserving the viability of probiotic strains of interest—on patients with Type 2 Diabetes Mellitus, using nanopore sequencing.

Thus, the objectives of the study are:

1. identifying an optimal biopolymeric composition for encapsulating the selected strains, in order to improve viability, with targeted and prolonged release;
2. developing and characterizing a prototype functional food product supplemented with encapsulated probiotics, with benefits in restoring the gut microflora;
3. characterizing and identifying changes in the gut microbiota of patients with Type 2 Diabetes Mellitus after administration of the functional food product, using nanopore sequencing.

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) represents one of the most important public health challenges worldwide, with a continuously increasing prevalence. In the past decade, research has highlighted the central role of the gut microbiota in the pathogenesis of T2DM, through mechanisms that include metabolic endotoxemia, altered production of short-chain fatty acids (SCFAs), disruption of bile acid metabolism, and modulation of the immune response.

Large-scale metagenomic studies have shown that patients with T2DM exhibit a reduction in butyrate-producing bacteria and an increase in opportunistic pathogens compared to healthy individuals. In this context, probiotic supplementation has emerged as a promising adjunctive therapeutic strategy, capable of modulating microbiota composition and improving glycemic control.

The present study investigated the effects of probiotic supplementation on the gut microbiota and metabolic markers in diabetic patients, using a two-arm design (experimental *vs*. placebo) and measurements at two time points (baseline and final). Paired analysis of 26 patients receiving probiotics and 25 receiving placebo revealed significant changes both at the metabolic level and in the composition of the microbiota, providing evidence that supports the hypothesis of modulation of the microbiota–metabolism axis as a mechanism of action of probiotics.

Effects on metabolic markers

The obtained results demonstrate significant and consistent improvements in all three metabolic markers analyzed in the probiotic group. Fasting blood glucose decreased by 12.15 mg/dL (−8.9%, $p < 0.001$), with a large effect size according to Jacob Cohen classification ($d = -1.40$). Triglycerides decreased by 7.60 mg/dL (−6.6%, $p < 0.001$, $d = -0.92$), and total cholesterol by 10.39 mg/dL (−6.4%, $p < 0.001$, $d = -1.07$). These Cohen's d values indicate large effects, highlighting the clinical relevance of the intervention beyond mere statistical significance.

In marked contrast, the placebo group showed no metabolic improvement. Fasting blood glucose remained practically unchanged (−0.48 mg/dL, $p = 0.696$), triglycerides increased significantly (+3.92 mg/dL, $p = 0.027$), and total cholesterol remained stable (+0.72 mg/dL, $p = 0.346$). The increase in triglycerides in the placebo group is particularly noteworthy, suggesting progressive metabolic deterioration in the absence of intervention.

Intergroup comparisons confirmed that the differences are highly significant for all three markers (Mann–Whitney U test, all $p < 0.001$), ruling out the possibility that the observed improvements are due to the passage of time or natural variation.

These results are consistent with the scientific literature. Research findings have reported that probiotic supplementation significantly reduces fasting blood glucose, total cholesterol, triglycerides, and HbA1c levels in patients with Type 2 Diabetes Mellitus. The magnitude of the glucose reduction observed in the present study (−8.9%) falls within the upper range of values reported in the literature, where reductions typically vary between 3% and 15%, depending on the probiotic strain, duration of the intervention, and severity of diabetes.

The mechanisms through which probiotics improve the metabolic profile are multiple and interconnected. The reduction of metabolic endotoxemia, through the improvement of intestinal barrier integrity, decreases the translocation of lipopolysaccharides (LPS), thereby reducing low-grade systemic inflammation that

contributes to insulin resistance. Additionally, the increased production of short-chain fatty acids (SCFAs), particularly butyrate, stimulates the secretion of GLP-1 and Peptide YY (PYY), incretin hormones that enhance insulin sensitivity and glycemic control. Regarding the lipid profile, probiotics can modulate bile acid metabolism through the activity of the enzyme bile salt hydrolase, increasing cholesterol excretion and reducing intestinal lipid absorption.

Changes in gut microbiota at the species and genus level

Species-level analysis identified 39 species with significant changes ($p < 0.05$) in the probiotic group, compared to only 14 in the placebo group. This quantitative imbalance is itself relevant, suggesting that the probiotic intervention induced a more extensive remodeling of the microbial ecosystem. Moreover, the direction of these changes differs fundamentally between groups: in the probiotic group, 30 out of the 39 significant species increased (enrichment pattern), whereas in the placebo group, 8 out of 14 decreased (depletion pattern). The progressive loss of microbial diversity in the absence of intervention is a well-documented phenomenon in Type 2 Diabetes Mellitus and is considered both a consequence and a perpetuating factor of metabolic dysbiosis.

The most notable finding at the species level was the significant reduction of *Clostridioides difficile (C. difficile*) by 53.5% ($p = 0.001$) in the probiotic group. This reduction is clinically relevant, as this bacterium is a major nosocomial pathogen associated with pseudomembranous colitis and severe disruption of the intestinal ecosystem. The obtained results confirm the importance of probiotics in the specific context of diabetic patients, where pre-existing dysbiosis creates favorable conditions for colonization by *Cl. difficile*.

At the genus level, species aggregation confirmed and extended these observations. The genus *Alistipes* (11 species) increased by 133.4% ($p = 0.002$) in the probiotic group. Studies have shown that Alistipes can ameliorate hepatic steatosis by remodeling the microbiota and suppressing inflammatory pathways, including through increased production of indole-3-propionic acid (IPA) and butyrate. In the context of diabetes, enrichment with *Alistipes* may contribute to reducing systemic inflammation and improving insulin sensitivity.

Other genera that increased significantly in the probiotic group include *Parabacteroides* (+51.7%, $p = 0.032$), a genus involved in bile acid metabolism and the maintenance of intestinal homeostasis, and *Oscillibacter* (+40.6%, $p = 0.029$), a butyrate-producing genus associated with reduced blood cholesterol levels. In the placebo group, the pattern was the opposite: *Megasphaera* decreased drastically (−89.9%, $p = 0.008$), Coprococcus decreased by 27.3% ($p = 0.040$), and Ruminococcus by 27.4% ($p = 0.048$). All these genera are important producers of short-chain fatty acids (SCFAs), and their loss indicates a progressive deterioration of intestinal fermentative capacity.

Taxonomic and functional perspective

Phylum-level analysis revealed remarkable stability in the overall composition in both groups, with *Firmicutes* dominating at approximately 80–84% of total abundance. The only significant change at this level was the increase in Actinobacteria in the probiotic group (+86.4%, p = 0.048). This phylum includes genera such as *Bifidobacterium* and *Collinsella*, which are frequently present in probiotic formulations and are associated with beneficial effects on metabolic health. The stability observed at the phylum level, combined with significant changes at lower taxonomic levels, indicates that probiotics act through fine redistribution of species within major taxonomic groups, rather than through radical restructuring of the overall composition.

The Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ratio, classically used as a biomarker of metabolic dysbiosis, was not informative in this dataset due to extreme variability (some patients had near-zero abundance of *Bacteroidetes*, which inflated the ratio). Some researchers consider that the F/B ratio is not a reliable indicator of dysbiosis in obese and diabetic patients, recommending higher-resolution approaches instead.

The most relevant finding from the functional analysis was the divergent trajectory of short-chain fatty acid (SCFA) producers between the two groups. In the probiotic group, these remained stable (+3.3%), whereas in the placebo group they decreased by 13.6% (p = 0.063). SCFAs, particularly butyrate, play essential roles in intestinal physiology and systemic metabolism: they maintain the integrity of the intestinal epithelial barrier, regulate hepatic gluconeogenesis through activation of GPR41 receptor and GPR43 receptor, stimulate the secretion of incretin hormones such as GLP-1 and Peptide YY, and exert anti-inflammatory effects through inhibition of histone deacetylases (HDACs).

The decrease in SCFA-producing capacity in the placebo group may at least partially explain the lack of metabolic improvement and even the deterioration of the lipid profile observed in these patients.

Concomitantly, opportunistic pathogens increased by 15.7% in the placebo group (compared to only +6.2% in the probiotic group), a pattern consistent with progressive metabolic endotoxemia. The increase in *Proteobacteria*, particularly *Enterobacteriaceae,* under dysbiotic conditions is considered a reliable indicator of microbial ecosystem instability and heightened susceptibility to infections and chronic inflammation.

Correlations between microbiota changes and metabolic markers

Spearman correlation analysis between changes in the microbiota and clinical markers revealed distinct and biologically coherent patterns between the two groups.

In the probiotic group, the strongest correlations involved blood glucose, with *Muribaculum intestinale* showing the strongest association (ρ = 0.62, p = 0.0007). *Muribaculum* belongs to the *Muribaculaceae* family (formerly S24-7) and is associated with mucin degradation and maintenance of the intestinal barrier. Other significant correlations with glycemia involved *Prevotella sp*. (ρ = 0.60), *Oxalobacter aliiformigenes* (ρ = 0.56), and *Lactococcus garvieae* (ρ = 0.55), as well as several SCFA-producing taxa from the genera *Solibaculum, Pusillibacter*, and *Roseburia* (ρ = 0.49–0.53).

For cholesterol, inverse correlations with *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (ρ = −0.54, p = 0.004) and *Marvinbryantia formatexigens* (ρ = −0.44, p = 0.025) suggest a mechanism mediated by bile acid metabolism. Both species are acetogenic anaerobes involved in the biotransformation of primary bile salts into secondary bile salts, a process that directly influences intestinal cholesterol absorption. The increase of these species following probiotic supplementation may enhance fecal cholesterol excretion, contributing to reduced cholesterolemia.

In the placebo group, the correlation pattern was fundamentally different, dominated by inverse associations between members of the *Enterobacteriaceae* family (e.g., *Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter*) and triglycerides. This association may reflect a disruption of lipid metabolism driven by endotoxemia induced by lipopolysaccharides (LPS) from Gram-negative bacteria, rather than a beneficial modulation.

It is noteworthy that *Companilactobacillus ginsenosidimutans* showed the strongest individual correlation (ρ = −0.66, p = 0.0004 with glycemia), suggesting that even in the absence of probiotic intervention, natural fluctuations in lactic acid bacteria may influence glucose metabolism.

Integrated mechanism of action

The synthesis of results across all levels of analysis—metabolic markers, individual species, genera, phyla, functional guilds, and correlations—allows the formulation of a coherent mechanism through which probiotics exert their beneficial effects.

The following integrated model is proposed: (1) probiotic supplementation maintains and stimulates populations of short-chain fatty acid (SCFA)-producing bacteria; (2) SCFAs preserve the integrity of the intestinal barrier and reduce the translocation of lipopolysaccharides (LPS); (3) the reduction of endotoxemia decreases low-grade systemic inflammation; (4) the improvement in inflammation enhances insulin sensitivity and lipid metabolism; (5) probiotics competitively inhibit colonization by opportunistic pathogens such as *Clostridioides difficile*.

This model is supported by the coherence observed across different levels of analysis: at the functional level, SCFA-producing bacteria are preserved in the probiotic group but decrease in the placebo group; at the genus level, beneficial taxa

such as *Alistipes, Parabacteroides*, and *Oscillibacter* increase, while the pathogen *Clostridioides difficile* decreases; at the correlation level, changes in SCFA-producing taxa are associated with improvements in glycemia, while acetogenic species correlate with cholesterol reduction. This convergence of evidence across multiple taxonomic and functional levels strengthens confidence in the biological reality of the observed effects, although the observational nature of the correlations does not allow for definitive establishment of causality.

Study limitations

The study presents several limitations that should be considered when interpreting the results.

First, the relatively modest sample size (n = 25–26 pairs per group) limits statistical power, particularly for detecting changes at the level of individual species, where the large number of simultaneous tests reduces the likelihood of identifying true signals. Future studies with larger sample sizes could confirm and extend these observations.

Additionally, there are baseline differences between the two groups in terms of age (61 *vs*. 55 years), duration of diabetes (12 *vs*. 7 years), sex distribution, and notably baseline glycemia (137 *vs*. 169 mg/dL). These differences may act as confounding factors, although the paired design (each patient serving as their own control) partially mitigates this risk. An ANOVA adjusted for baseline values would provide a more rigorous evaluation of the intervention effect.

In conclusion, the results of the present study suggest that probiotic supplementation in patients with Type 2 Diabetes Mellitus leads to significant improvements in the metabolic profile—reductions in blood glucose, triglycerides, and total cholesterol—alongside favorable changes in the gut microbiota. These changes include the reduction of the pathogen *Clostridioides difficile*, enrichment with beneficial genera such as Alistipes and Parabacteroides, preservation of short-chain fatty acid (SCFA)-producing bacterial populations, and an increase in Actinobacteria. The coherence observed across multiple levels of analysis—from species to genus, phylum, functional guilds, and correlations with metabolic markers—supports a mechanism of action based on modulation of the microbiota–metabolism axis. However, confirmation of these findings in larger randomized controlled trials, including comprehensive assessment of metabolic parameters, identification of optimal probiotic strains, and evaluation of long-term efficacy, remains a priority for future research.

The improvement in quality-of-life scores in the probiotic group highlights a positive overall impact of the intervention, not only at the biological level but also in terms of patients' perceived health status.

The obtained results support the hypothesis that probiotic interventions can modulate the gut microbiota predominantly at a functional level, even in the absence of significant taxonomic changes.

The original contributions of this study stem precisely from the fact that it not only demonstrates the beneficial effects of probiotic consumption in patients with Type 2 Diabetes Mellitus, but also presents the development of a food product enriched with encapsulated probiotics, covering the entire concept—from raw materials to demonstrated health benefits. Thus, an optimal composition for strain encapsulation was established, a functional product (yogurt) was developed and tested, and subsequently registered for patenting at State Office for Inventions and Trademarks.

This integrated approach highlights the transition from fundamental research to clinical applications, demonstrating the potential of using encapsulated probiotics incorporated into functional food products for the management of Type 2 Diabetes Mellitus. The results are of multidisciplinary interest, and the originality of the work also derives from integrating elements of microbiology, biotechnology, nutrition, and clinical research. Moreover, the study presents significant techno-economic advantages through the use of accessible and biocompatible biopolymers, such as alginate and starch, which enable the development of an efficient, stable encapsulation system that can be easily scaled at the industrial level. From a technical perspective, this system ensures protection of probiotics in the gastric environment and promotes their release in the intestine, contributing to increased viability and efficacy. Integration into a conventional food product—a staple in the Romanian diet—facilitates administration and improves patient compliance. From an economic standpoint, the use of accessible materials and simple processing technologies makes scaling feasible, compared to more complex delivery systems that require specialized development, monitoring, or storage conditions. Furthermore, the product has strong potential for valorization as a functional food, significantly contributing to reducing the costs associated with managing type 2 diabetes.

Taking into account all the presented information, these findings are valuable for future research. Studies should include a larger number of participants and be conducted over a longer period of time. Additionally, in order to identify personalized therapies, different doses and combinations of probiotics could be tested to individualize the delivery system. Last but not least, the integration of additional clinical parameters and long-term monitoring of lifestyle factors could contribute to a more accurate understanding of the interactions between the gut microbiota and metabolic health.

LIST OF SCIENTIFIC PAPERS

1. **Roxana Elena Gheorghita**, Andrei Lobiuc, Mihai Covasa, Alina Crina Muresan, Ioan Ovidiu Sirbu. *Biopolymer-Based Gel Capsules for Improved Probiotic Delivery*. **Gels**, 2026, 12, 212, **IF 5,3 (Q1).** https://doi.org/10.3390/gels12030212.
2. **Roxana Gheorghita**, Ioan-Ovidiu Sirbu, Andrei Lobiuc, Mihai Covasa. *Sodium Alginate–Starch Capsules for Enhanced Stability of Metformin in Simulated Gastrointestinal Fluids*. **Biomimetics** 2024, 9, 716. **IF 3,9 (Q1**). https://doi.org/10.3390/biomimetics9110716.
3. **Roxana Gheorghita Puscaselu**, Andrei Lobiuc, Ioan Ovidiu Sirbu, Mihai Covasa. *The Use of Biopolymers as a Natural Matrix for Incorporation of Essential Oils of Medicinal Plants*. ***Gels*** 2022, 8(11), 756, **IF 4.43 (Q1**). https://doi.org/10.3390/gels8110756 .
4. Sevag Hamamah, **Roxana Gheorghita**, Andrei Lobiuc, Ioan-Ovidiu Sirbu, Mihai Covasa. *Fecal microbiota transplantation in non-communicable diseases: Recent advances and protocols*. ***Frontiers in Medicine*** 2022, 9, **IF 5.06 (Q2).** https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.1060581/full.
5. Caliman-Sturdza, Olga Adriana, Josiana A. Vaz, Ancuta Veronica Lupaescu, Andrei Lobiuc, Codruta Bran, **Roxana Elena Gheorghita**. *Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Probiotic Strains*. ***International Journal of Molecular Sciences*** 2026, 27, 2: 1079. **IF 4,9 (Q1**). https://doi.org/10.3390/ijms27021079.

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE
“VICTOR BABEŞ” DIN TIMIŞOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul 4 – Biochimie şi Farmacologie

PUŞCĂŞELU ROXANA-ELENA

TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI PRIVIND DEZVOLTAREA DE PROBIOTICE DE GENERAŢIE NOUĂ, MICROÎNCAPSULATE, ÎNGLOBATE ÎN ALIMENTE FUNCŢIONALE, CU ROL ÎN MENŢINEREA SĂNĂTĂŢII MICROBIOTEI INTESTINALE ŞI ÎN PREVENIREA BOLILOR

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DR. IOAN OVIDIU SÎRBU

T i m i ș o a r a

2 0 2 6

CUPRINS

Listă lucrări ştiinţifice publicate V

Listă abrevieri şi simboluri VI

Listă cu tabele VIII

Listă cu figuri IX

Mulțumiri XI

Introducere XII

PARTEA GENERALĂ

1. Microbiota intestinală şi rolul în fiziologia şi patologia umană 1

1.1. Microbiota intestinală – implicații şi concepte actuale 1

1.1.1. Interacțiunea dietă-microbiotă-metaboliți 2

1.1.2. Transplantul de microbiotă fecală şi alte abordări terapeutice 3

1.1.3. Metagenomica 6

1.1.4. Terapiile personalizate 7

1.2. Compoziția microbiotei intestinale la adultul sănătos 7

1.2.1. Vârsta 9

1.2.2. Sexul 9

1.2.3. Etnia, obiceiurile alimentare și culturale 10

1.2.4. Frecvenţa exerciţiilor fizice 10

2. Disbioza intestinală și implicațiile în patologia umană 11

2.1. Disbioza intestinală – definiție, clasificare și mecanisme fiziopatologice 11

2.2. Rolul disbiozei intestinale în patologia umană 12

2.2.1. Afecțiuni gastrointestinale 12

2.2.2. Afecțiuni cardiovasculare 14

2.2.3. Axa intestin – creier şi afecțiunile neurodegenerative 15

2.3. Disbioza intestinală în bolile metabolice 18

3. Probioticele şi importanța în sănătatea umană 21

3.1. Mecanismele de acțiune ale probioticelor asupra microbiotei intestinale 21

3.2. Rolul probioticelor în prevenția și managementul bolilor 23

3.3. Sindromul metabolic şi diabetul 27

3.4. Încapsularea probioticelor – principii tehnologice, tulpini de interes, perspective biologice şi medicale 28

3.5. Siguranța și tolerabilitatea administrării probioticelor încapsulate 32

4. Alimentele funcționale. Impactul alimentelor funcționale asupra microbiotei intestinale și parametrilor metabolici 35

PARTEA SPECIALĂ

5. Partea experimentală 39

5.1. Dezvoltarea şi testarea capsulelor probiotice 39

5.1.1. Materiale 39

5.1.2. Metode 39

5.1.3. Caracterizarea fizică și optică a capsulelor 41

5.1.4. Eficiența încapsulării și viabilitatea probioticelor încapsulate 43

5.1.5. Comportamentul la umflare și cinetica capsulelor 44

5.2. Dezvoltarea şi testarea produsului cu probiotice încapsulate 45

5.2.1. Materiale 45

5.2.2. Metode 45

5.3. Testarea *in vivo* si secvențierea probelor biologice 48

5.3.1. Materiale 48

5.3.2. Design experimental 48

5.4. Metode de analiză statistică utilizate 55

5.5. Aspecte etice 55

6. Rezultatele cercetării 57

6.1. Capsule biopolimerice cu probiotice încapsulate 57

6.2. Dezvoltarea şi testarea produsului cu probiotice încapsulate 70

6.3. Testarea *in vivo* si secvențierea probelor biologice 73

7. Discuții 94

7.1. Capsule biopolimerice cu probiotice încapsulate 94

7.2. Dezvoltarea şi testarea produsului cu probiotice încapsulate 99

7.3. Testarea *in vivo* si secvenţierea probelor biologice 100

8. Concluzii şi contribuții personale 104

9. Bibliografie 108

10. Anexe I

10.1. Chestionar distribuit participanților I

10.2. Consimțământ informat al participantului la studiu V

10.3. Lucrări ştiinţifice *in extenso* VII

REZUMAT

Microbiota intestinală – partener fiziologic al omului

Rolul fundamental al microbiotei intestinale în sănătatea umană este susținut de rezultatele convingătoare ale cercetărilor în domeniu, menționate în literatura de specialitate. Microbiota intestinală este cheia multor aspecte ale sănătății umane, iar dezechilibrul microbian sau disbioza (colonizarea bacteriană alterată asociată cu exprimarea bolii) a fost asociată cu diferite tulburări ale tractului gastrointestinal, metabolice, afecţiuni neurologice sau oncologice. În disbioză, compoziția microbiotei prezintă modificări semnificative. În eubioză, aceasta cuprinde peste 100 de trilioane de microorganisme, mai ales din genul *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* şi *Proteobacteria*, cu rol semnificativ în păstrarea integrității barierei intestinale şi prevenirea bolilor. Rezultatele studiilor științifice au evidențiat că există tulpini cu rol protector (antiinflamator), care stimulează sistemul imunitar. Pandemia generată de SARS-CoV-2 în întreaga lume a împins populația către consumul de produse funcționale şi, în special, de probiotice. Conform statisticilor, la nivel mondial, populația și-a îndreptat atenția către astfel de suplimente şi alimente funcționale cu calitate nutrițională superioară.

Organizația Mondială a Sănătății (OMS) și Organizația pentru Alimentație și Agricultură (FAO) au recunoscut efectul benefic al probioticelor și a încurajat utilizarea lor în alimente, iar majoritatea medicilor europeni recomandă consumul de probiotice. Dezvoltarea unor alimente funcționale, care să includă tulpini de microorganisme cu rol benefic pentru sănătatea umană şi accesul facil la astfel de produse ar putea reprezenta un pas important în asigurarea sănătății populației.

Potențialul probioticelor ca modulator al microbiotei intestinale

Chiar dacă în România piața suplimentelor alimentare a cunoscut un real progres, probioticele încă sunt comercializate şi asociate cu consumul de antibiotice. Mare parte dintre formulele disponibile sunt de tip pulbere sau capsule. Problema cea mai astringentă se referă, de fapt, la nivelul de informare şi conștientizare al beneficiilor administrării regulate asupra sănătății umane. Se remarcă, totuși, în ultimul timp, eforturi de dezvoltare şi diversificare a formulelor probiotice, dar şi de extindere a utilizării acestora. De asemenea, importanța eubiozei în menținerea stării de sănătate a devenit un subiect de interes general.

Aspecte tehnologice în condiționarea probioticelor

Fiind microorganisme vii, păstrarea viabilității celulare a rămas o provocare majoră. Poate acesta este şi unul dintre principalele motive al neîncrederii consumatorilor în noile formule probiotice. Tehnologiile moderne inovative, atât cele de obținere, dar mai ales cele de condiționare, ar putea reprezenta un prim punct de interes in acest sens. Studiile anterioare au demonstrat faptul că microîncapsularea

tulpinilor bacteriene contribuie la păstrarea viabilității şi oferă posibilitatea de a crește eficiența administrării.

Un factor important în încapsularea probioticelor îl reprezintă materialul utilizat. De aceea, scopul acestei cercetări are la bază folosirea unor materiale nou utilizate în industria biomedicală, dar cu background pozitiv şi aplicabilitate ridicată în cea alimentară. Astfel, biopolimeri naturali, precum alginatul de sodiu şi amidonul din grâu sunt biocompatibili, biodegradabili, nontoxici, ieftini, acceptați pentru consum în doze *quantum satis* și cu eficiență dovedită ca materiale de încapsulare. Datorită proprietăților sale de încapsulare, menținerea viabilității celulare și eliberarea controlată şi țintită, alginatul este cel mai utilizat biopolimer în acest sens. Amidonul din grâu, pe lângă capacitatea sa de a încapsula și de a fermenta în colon, este un biopolimer folosit în special ca fibră alimentară insolubilă. Mai mult decât atât, acesta este capabil să înglobeze și să protejeze compușii biologic activi în timpul procesării, depozitării și trecerii prin tractul gastrointestinal.

Motivație

Cercetarea de faţă își propune să identifice cea mai bună compoziție biopolimerică pentru încapsularea de tulpini de bacterii benefice, metoda de dezvoltare și optimizarea acesteia. De asemenea, testarea capsulelor în fluide gastrointestinale simulate şi optimizarea acestora contribuie la obținerea unor produse cu eliberare țintită şi controlată.

Dezvoltarea prototipurilor de produse alimentare are ca scop obținerea de alimente funcționale destinate tuturor consumatorilor, fără constrângeri sau inconveniente în utilizarea acestora. Mai mult, formularea alimentelor funcționale duce la creșterea încrederii consumatorilor în beneficiile utilizării probioticelor.

Studiul își propune să depășească aceste limite și să aducă soluții producătorului și consumatorului.

Astfel, prin tema propusă, cercetarea doctorală abordează mai multe aspecte, prin:

1) dezvoltarea de microcapsule biopolimerice specifice în vederea încorporării *Lacticaseibacillus rhamnosus* şi *Bacillus clausii* și îmbunătățirea supraviețuirii acestora;

2) dezvoltarea şi caracterizarea unui aliment funcțional cu probiotice încapsulate;

3) evaluarea efectelor benefice asupra microbiotei, parametrilor biologici şi stării generale de bine la pacienți diagnosticați cu diabet zaharat de tip 2 (T2DM), prin analize metagenomice bazate pe secvențiere de nouă generație.

Prezenta lucrare urmărește un domeniu de cercetare aflat în plină expansiune la nivel național şi internațional, iar rezultatele obținute sunt de interes pentru dezvoltarea strategiilor terapeutice, cu implicații majore asupra tuturor categoriilor de

consumatori. Protejarea tulpinilor bacteriene prin încapsulare şi înglobarea în matrici alimentare convenționale este un concept de interes științific major, nou pe piața românească.

Conform studiilor *in vitro* realizate până în prezent, probioticele încapsulate în matrici biopolimerice s-au dovedit a fi eficiente pe o perioadă mai îndelungată de timp, cu viabilitate ridicată comparativ cu tulpinile non-încapsulate. Cercetarea de faţă are ca scop identificarea compoziției optime de biopolimeri, necesară pentru dezvoltarea unui material comestibil, ce poate îngloba tulpini de microorganisme, este rezistent în matrici alimentare şi pot fi folosite pentru dezvoltarea alimentelor funcționale.

Consumul unor astfel de produse (iaurt cu adaos de probiotice încapsulate în cazul de faţă) poate avea efect benefic în ameliorarea efectelor datorate diabetului zaharat de tip 2 şi poate contribui la îmbunătățirea stării de bine a consumatorilor. Administrarea unor astfel de produse pacienților cu T2DM va stimula refacerea microbiomului, va facilita îmbunătățirea sensibilității la insulină și a gluconeogenezei intestinale.

Prin rezultatele identificate, cercetarea generează date de interes, cu implicații la nivel național şi internațional, reprezentând un liant între nutriție şi sănătate, biotehnologie, alimentație, medicină şi farmacie.

Scop şi obiective

Studiul de faţă urmărește evaluarea efectelor alimentelor funcționale ce conțin un sistem de încapsulare biopolimeric, eficiente pentru păstrarea viabilității tulpinilor probiotice de interes, asupra pacienților cu diabet zaharat de tip 2, prin secvențiere de tip nanopore.

Astfel, obiectivele studiului sunt reprezentate de:

1) identificarea unei compoziții biopolimerice optime pentru încapsularea tulpinilor selectate, în vederea îmbunătățirii viabilității, cu eliberare țintită şi prelungită;

2) dezvoltarea şi caracterizarea unui prototip de produs alimentar funcțional, cu adaos de probiotice încapsulate, cu beneficii în restabilirea microflorei intestinale;

3) caracterizarea şi identificarea modificărilor microbiotei intestinale a pacienților cu diabet zaharat de tip 2, după administrarea produsului alimentar funcțional, prin secvențiere nanopore.

Diabetul zaharat de tip 2 (T2DM) reprezintă una dintre cele mai importante provocări de sănătate publică la nivel mondial, cu o prevalență în continuă creștere.

În ultimul deceniu, cercetările au evidențiat rolul central al microbiotei intestinale în patogeneza T2DM, prin mecanisme care includ endotoxemia metabolică, alterarea producerii de acizi grași cu lanț scurt (SCFA), perturbarea metabolismului acizilor biliari și modularea răspunsului imun. Studiile metagenomice ample au demonstrat că pacienții cu T2DM prezintă o reducere a bacteriilor producătoare de butirat și o creștere a patogenilor oportunisti, comparativ cu indivizii sănătoși. În acest context, suplimentarea cu probiotice a apărut ca o strategie terapeutică adjuvantă promițătoare, capabilă să moduleze compoziția microbiotei și să îmbunătățească controlul glicemic.

Prezentul studiu a investigat efectele suplimentării cu probiotice asupra microbiotei intestinale și a markerilor metabolici la pacienții diabetici, utilizând un design cu două brațe (experimental *vs*. placebo) și măsurători la două momente (inițial și final). Analiza pereche a 26 de pacienți cu probiotice și 25 cu placebo a relevat modificări semnificative atât la nivel metabolic cât și la nivelul compoziției microbiotei, oferind dovezi care susțin ipoteza modulării axei microbiotă–metabolism ca mecanism de acțiune al probioticelor.

Efectele asupra markerilor metabolici

Rezultatele obţinute demonstrează îmbunătățiri semnificative și consistente ale tuturor celor trei markeri metabolici analizați în grupul cu probiotice. Glicemia à jeun a scăzut cu 12,15 mg/dl (−8,9%, $p < 0,001$), cu o mărime a efectului mare conform clasificării lui Cohen ($d = −1,40$). Trigliceridele au scăzut cu 7,60 mg/dl (−6,6%, $p < 0,001$, $d = −0,92$), iar colesterolul total cu 10,39 mg/dl (−6,4%, $p < 0,001$, $d = −1,07$). Aceste valori ale lui Cohen d indică efecte mari, subliniind relevanța clinică a intervenției dincolo de semnificația pur statistică.

În contrast marcat, grupul placebo nu a prezentat nicio ameliorare metabolică. Glicemia a rămas practic nemodificată (−0,48 mg/dl, $p = 0,696$), trigliceridele au crescut semnificativ (+3,92 mg/dl, $p = 0,027$), iar colesterolul a fost stabil (+0,72 mg/dl, $p = 0,346$). Creșterea trigliceridelor în grupul placebo este deosebit de relevantă, sugerând o deteriorare metabolică progresivă în absența intervenției.

Comparațiile inter-grup au confirmat că diferențele sunt foarte semnificative pentru toți trei markerii (testul Mann-Whitney U, toate $p < 0,001$), eliminând posibilitatea ca îmbunătățirile să fie atribuite efectului timpului sau variației naturale.

Aceste rezultate sunt în concordanță cu literatura de specialitate. Rezultatele cercetărilor au raportat că suplimentarea cu probiotice reduce semnificativ glicemia à jeun, colesterolul total, trigliceridele și HbA1c la pacienții cu T2DM. Amplitudinea reducerii glicemiei observată în prezentul studiu (−8,9%) se situează în intervalul superior al valorilor raportate în literatură, unde reducerile variază tipic între 3% și 15% în funcție de tulpina probiotică, durata intervenției și severitatea diabetului.

Mecanismele prin care probioticele îmbunătățesc profilul metabolic sunt multiple și interconectate. Reducerea endotoxemiei metabolice prin îmbunătățirea

barierei intestinale diminuează translocarea lipopolizaharidelor (LPS), reducând inflamația sistemică de grad scăzut care contribuie la rezistența la insulină. De asemenea, creșterea producerii de SCFA, în special butirat, stimulează secreția de GLP-1 și PYY, hormoni incretini care îmbunătățesc sensibilitatea la insulină și controlul glicemic. Pentru profilul lipidic, probioticele pot modula metabolismul acizilor biliari prin activitatea enzimei hidrolazei sărurilor biliare, crescând excreția de colesterol și reducând absorbţia lipidică intestinală.

Modificări ale microbiotei intestinale la nivel de specie și gen

Analiza la nivel de specie a identificat 39 de specii cu modificări semnificative ($p < 0,05$) în grupul cu probiotice, comparativ cu doar 14 în grupul placebo. Acest dezechilibru cantitativ este în sine relevant, sugerând că intervenția probiotică a indus o remodelare mai extinsă a ecosistemului microbian. Mai mult, direcția modificărilor diferă fundamental între grupuri: în grupul cu probiotice, 30 din cele 39 de specii semnificative au crescut (pattern de îmbogățire), în timp ce în grupul placebo, 8 din 14 au scăzut (pattern de sărăcire). Pierderea progresivă a diversității microbiene în absența intervenției este un fenomen bine documentat în T2DM și este considerat atât o consecință cât și un factor perpetuant al disbiozei metabolice.

Cea mai notabilă constatare la nivel de specie a fost reducerea semnificativă a *Clostridioides difficile* (*Cl. difficile*) cu 53,5% ($p = 0,001$) în grupul cu probiotice. Această reducere este clinic relevantă dat fiind că acesta este un patogen nosocomial major, asociat cu colita pseudomembranoasă și cu perturbarea severă a ecosistemului intestinal. Rezultatele obţinute confirmă importanța probioticelor în contextul specific al pacienților diabetici, unde disbioza preexistentă creează condiții favorabile colonizării cu *Cl. difficile*.

La nivel de gen, agregarea speciilor a confirmat și extins aceste observații. Genul *Alistipes* (11 specii) a crescut cu 133,4% ($p = 0,002$) în grupul cu probiotice. Studiile au demonstrat că *Alistipes* ameliorează steatoza hepatică prin remodelarea microbiotei și suprimarea căilor inflamatorii, inclusiv prin creșterea producerii de acid indol-3-propionic (IPA) și butirat. În contextul diabetului, îmbogățirea cu *Alistipes* ar putea contribui la reducerea inflamației sistemice și la îmbunătățirea sensibilității la insulină.

Alte genuri care au crescut semnificativ în grupul cu probiotice includ *Parabacteroides* (+51,7%, $p = 0,032$), un gen implicat în metabolismul acizilor biliari și menținerea homeostaziei intestinale și *Oscillibacter* (+40,6%, $p = 0,029$), un gen producător de butirat asociat cu reducerea colesterolului sanguin. În grupul placebo, pattern-ul a fost opus: *Megasphaera* a scăzut drastic (−89,9%, $p = 0,008$), *Coprococcus* a fost mai redus cu 27,3% ($p = 0,040$) și *Ruminococcus* cu 27,4% ($p = 0,048$). Toate aceste genuri sunt producători importanți de SCFA, iar pierderea lor semnifică o deteriorare progresivă a capacității fermentative intestinale.

Perspectiva taxonomică și funcțională

Analiza la nivel de filum a evidențiat o stabilitate remarcabilă a compoziției generale în ambele grupuri, *Firmicutes* dominând cu ~80–84% din abundanța totală. Singura modificare semnificativă la acest nivel a fost creșterea *Actinobacteria* în grupul cu probiotice (+86,4%, p = 0,048). Acest filum include genuri precum *Bifidobacterium* și *Collinsella*, frecvent prezente în formulările probiotice și asociate cu efecte benefice asupra sănătății metabolice. Stabilitatea la nivel de filum, combinată cu modificări semnificative la niveluri taxonomice inferioare, indică faptul că probioticele acționează prin redistribuirea fină a speciilor în cadrul marilor grupuri taxonomice, mai degrabă decât prin restructurarea radicală a compoziției.

Raportul *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B), clasic utilizat ca biomarker al disbiozei metabolice, nu a fost informativ în setul de date din cauza variabilității extreme (unii pacienți au avut abundanță aproape zero de *Bacteroidetes*, ceea ce a inflat raportul). Unii cercetători consideră că raportul F/B nu este un indicator fiabil al disbiozei la pacienții obezi și diabetici, recomandând utilizarea unor abordări cu rezoluție mai mare.

Cea mai relevantă constatare din analiza funcțională a fost traiectoria divergentă a producătorilor de SCFA între cele două grupuri. În grupul cu probiotice, aceștia au rămas stabili (+3,3%), în timp ce în grupul placebo au scăzut cu 13,6% (p = 0,063). SCFA, în special butiratul, joacă roluri esențiale în fiziologia intestinală și metabolismul sistemic: mențin integritatea barierei epiteliale intestinale, reglează gluconeogeneza hepatică prin activarea receptorilor GPR41 și GPR43, stimulează secreția de hormoni incretini (GLP-1, PYY) și exercită efecte antiinflamatorii prin inhibarea histonelor deacetilaze (HDAC. Scăderea capacității de producere a SCFA în grupul placebo ar putea explica, cel puțin parțial, absența îmbunătățirii metabolice și chiar deteriorarea profilului lipidic la acești pacienți.

Concomitent, patogenii oportunisti au crescut cu 15,7% în grupul placebo (comparativ cu doar +6,2% în grupul cu probiotice), un pattern consistent cu endotoxemia metabolică progresivă. Creșterea Proteobacteriilor, în special a *Enterobacteriaceae,* în condiții de disbioză este considerată un indicator fiabil al instabilității ecosistemului microbian și al vulnerabilității la infecții și inflamație cronică.

Corelații între modificările microbiotei și markerii metabolici

Analiza corelațiilor Spearman dintre modificările microbiotei și cele ale markerilor clinici a relevat pattern-uri distincte și biologic coerente între cele două grupuri. În grupul cu probiotice, cele mai puternice corelații au implicat glicemia, cu *Muribaculum intestinale* prezentând cea mai puternică asociere (ρ = 0,62, p = 0,0007). Muribaculum este un gen din familia *Muribaculaceae* (fostă S24-7), asociat cu degradarea mucinei și menținerea barierei intestinale. Alte corelații semnificative cu glicemia au implicat *Prevotella sp*. (ρ = 0,60), *Oxalobacter aliiformigenes* (ρ = 0,56) și *Lactococcus garvieae* (ρ = 0,55), precum și mai mulți taxoni producători de SCFA din genurile *Solibaculum, Pusillibacter* și *Roseburia* (ρ = 0,49–0,53).

Pentru colesterol, corelațiile inverse cu *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (ρ = −0,54, p = 0,004) și *Marvinbryantia formatexigens* (ρ = −0,44, p = 0,025) sugerează un mecanism mediat de metabolismul acizilor biliari. Ambele specii sunt anaerobi acetogeni care participă la biotransformarea sărurilor biliare primare în săruri biliare secundare, un proces care influențează direct absorbția intestinală a colesterolului. Creșterea acestor specii în urma suplimentării cu probiotice ar putea amplifica excreția fecală de colesterol, contribuind la reducerea colesterolemiei.

În grupul placebo, pattern-ul corelațiilor a fost fundamental diferit, dominat de asocieri inverse între specii de *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter*) și trigliceride. Această asociere poate reflecta un mecanism de perturbarea metabolismului lipidic prin endotoxemia indusă de LPS-ul bacteriilor Gram-negative, mai degrabă decât o modulare benefică. De remarcat că *Companilactobacillus ginsenosidimutans* a prezentat cea mai puternică corelație individuală (ρ = −0,66, p = 0,0004 cu glicemia), sugerând că și în absența intervenției probiotice, unele modificări naturale ale bacteriilor lactice pot influența metabolismul glucozei.

Mecanism integrat de acțiune

Sinteza rezultatelor de la toate nivelurile de analiză — markeri metabolici, specii individuale, genuri, filumuri, ghilde funcționale și corelații — permite conturarea unui mecanism coerent prin care probioticele își exercită efectele benefice. Se propune următorul model integrat: (*1*) suplimentarea probiotică menține și stimulează populațiile de bacterii producătoare de SCFA, (*2*) SCFA mențin integritatea barierei intestinale și reduc translocarea LPS, (*3*) reducerea endotoxemiei diminuează inflamația sistemică de grad scăzut, (*4*) ameliorarea inflamației îmbunătățește sensibilitatea la insulină și metabolismul lipidic, și (*5*) probioticele inhibă competitiv colonizarea cu patogeni oportunisti precum *Cl. difficile*.

Acest model este susținut de coerența observată între nivelurile de analiză: la nivel funcțional, producătorii de SCFA sunt conservați în grupul cu probiotice dar scad în placebo; la nivel de gen, taxonii benefici (*Alistipes, Parabacteroides, Oscillibacter*) cresc iar patogenul *Clostridioides* scade; la nivel de corelații, modificările taxonilor producători de SCFA se asociază cu ameliorarea glicemiei, iar speciile acetogene cu reducerea colesterolului. Această convergență a dovezilor de la multiple niveluri taxonomice și funcționale întărește încrederea în realitatea biologică a efectelor observate, deși natura observațională a corelațiilor nu permite stabilirea definitivă a cauzalității.

Limitări ale studiului

Studiul prezintă mai multe limitări care trebuie considerate la interpretarea rezultatelor. În primul rând, dimensiunea relativ modestă a eșantionului (n = 25–26 perechi per grup) limitează puterea statistică, în special pentru detectările de modificări la nivelul speciilor individuale, unde numărul mare de teste simultane

reduce probabilitatea identificării semnalelor reale. Studii viitoare cu eșantioane mai mari ar putea confirma și extinde aceste observații.

De asemenea, există diferențe inițiale între cele două grupuri în ceea ce privește vârsta (61 vs. 55 ani), durata diabetului (12 vs. 7 ani), distribuția pe sexe și, notabil, nivelul glicemiei bazale (137 vs. 169 mg/dl). Aceste diferențe ar putea constitui factori de confuzie, deși designul pereche (fiecare pacient este propriul său control) atenuează parțial acest risc. O analiză ANOVA ajustată pentru valorile bazale ar oferi o evaluare mai riguroasă a efectului intervenției.

În concluzie, rezultatele prezentului studiu sugerează că suplimentarea cu probiotice la pacienții cu diabet zaharat de tip 2 produce îmbunătățiri semnificative ale profilului metabolic — reduceri ale glicemiei, trigliceridelor și colesterolului total — concomitent cu modificări favorabile ale microbiotei intestinale. Aceste modificări includ reducerea patogenului *Clostridioides difficile*, îmbogățirea cu genuri benefice precum *Alistipes* și *Parabacteroides*, conservarea populațiilor de bacterii producătoare de SCFA și creșterea *Actinobacteria*. Coerența observată între nivelurile de analiză — de la specie la gen, la filum, la ghildă funcțională, la corelații cu markerii metabolici — susține mecanismul de acțiune prin modularea axei microbiotă–metabolism. Confirmarea acestor rezultate în studii randomizate controlate mai ample, cu măsurarea completă a tuturor parametrilor metabolici, identificarea tulpinilor probiotice optime și evaluarea eficacității pe termen lung, rămâne o prioritate pentru cercetările viitoare.

Îmbunătățirea scorurilor de calitate a vieţii în grupul probiotic evidenţiază un impact pozitiv general al intervenției, nu doar la nivel biologic, ci şi perceput asupra stării de sănătate.

Rezultatele obţinute susțin ipoteza că intervențiile probiotice pot modula microbiota intestinală predominant la nivel funcţional, chiar şi în absenta unor modificări taxonomice semnificative.

Contribuțiile originale ale acestui studiu derivă tocmai din faptul că lucrarea nu prezintă doar efectele benefice ale consumului de probiotice asupra pacienţilor cu T2DM, ci prezintă şi dezvoltarea unui produs alimentar augmentat cu probiotice încapsulate, prezentând conceptul, de la materie primă până la efecte benefice. Astfel, s-a stabilit o compoziţie optimă pentru încapsularea tulpinilor, s-a dezvoltat un produs funcţional, respectiv iaurt, testat şi ulterior înregistrat pentru brevetare la OSIM.

Această abordare integrată evidenţiază tranziția de la cercetare fundamentală la aplicații clinice, demonstrând potențialul utilizării probioticelor încapsulate şi înglobate în produse alimentarea funcționale pentru managementul T2DM. Rezultatele sunt de interes la nivel multidisciplinar, iar originalitatea lucrării derivă şi din faptul că studiul integrează elemente de microbiologie, biotehnologie, nutriție şi cercetare clinică. Mai mult, studiul prezintă avantaje tehnico-economice semnificative, prin utilizarea unor biopolimeri accesibili şi biocompatibili, precum

alginatul şi amidonul, care permit dezvoltarea unui sistem de încapsulare eficient, stabil, ușor de scalat la nivel industrial. Astfel, din punct de vedere tehnic, sistemul asigură protecția probioticelor în mediul gastric şi promovează eliberarea la nivel intestinal, contribuind la creşterea viabilităţii şi eficienței acestora. Integrarea într-un aliment convențional, de bază în alimentația românilor, facilitează administrarea şi creşte complianța pacienţilor. Din punct de vedere economic, utilizarea unor materiale accesibile şi aplicarea unor tehnologii simple de procesare face posibilă scalarea, comparativ cu alte sisteme de livrare mai complexe, care necesită sisteme de dezvoltare, monitorizare sau depozitare mai speciale. Mai mult, produsul are potențial de valorificare ca aliment funcţional, contribuind semnificativ la reducerea costurilor asociate managementului diabetului zaharat de tip 2.

Luând în calcul toate informațiile prezentate, acestea sunt valoroase pentru cercetări viitoare. Studiile ar trebui să includă un număr mai mare de participanţi şi să se deruleze pe o perioadă mai îndelungată de timp. De asemenea, în vederea identificării de terapii personalizate, pot fi testate şi alte doze şi combinații de probiotice, pentru individualizarea sistemului de livrare. Nu în ultimul rând, integrarea parametrilor clinici suplimentari şi monitorizarea stilului de viaţă pe o perioadă mai îndelungată de timp pot contribui la o înțelegere mai exactă a interacțiunilor dintre microbiota intestinală şi sănătatea metabolică.

LISTĂ LUCRĂRI ŞTIINŢIFICE PUBLICATE

1. **Roxana Elena Gheorghita**, Andrei Lobiuc, Mihai Covasa, Alina Crina Muresan, Ioan Ovidiu Sirbu. *Biopolymer-Based Gel Capsules for Improved Probiotic Delivery*. **Gels**, 2026, 12, 212, **IF 5,3 (Q1).** https://doi.org/10.3390/gels12030212.
2. **Roxana Gheorghita**, Ioan-Ovidiu Sirbu, Andrei Lobiuc, Mihai Covasa. *Sodium Alginate–Starch Capsules for Enhanced Stability of Metformin in Simulated Gastrointestinal Fluids*. **Biomimetics** 2024, 9, 716. **IF 3,9 (Q1**). https://doi.org/10.3390/biomimetics9110716.
3. **Roxana Gheorghita Puscaselu**, Andrei Lobiuc, Ioan Ovidiu Sirbu, Mihai Covasa. *The Use of Biopolymers as a Natural Matrix for Incorporation of Essential Oils of Medicinal Plants*. ***Gels*** 2022, 8(11), 756, **IF 4.43 (Q1**). https://doi.org/10.3390/gels8110756 .
4. Sevag Hamamah, **Roxana Gheorghita**, Andrei Lobiuc, Ioan-Ovidiu Sirbu, Mihai Covasa. *Fecal microbiota transplantation in non-communicable diseases: Recent advances and protocols*. ***Frontiers in Medicine*** 2022, 9, **IF 5.06 (Q2).** https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.1060581/full.
5. Caliman-Sturdza, Olga Adriana, Josiana A. Vaz, Ancuta Veronica Lupaescu, Andrei Lobiuc, Codruta Bran, **Roxana Elena Gheorghita**. *Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Probiotic Strains*. ***International Journal of Molecular Sciences*** 2026, 27, 2: 1079. **IF 4,9 (Q1**). https://doi.org/10.3390/ijms27021079.