
TEZA DE DOCTORAT

Nanoparticule de oxid de fier transportate de probiotice

Doctorand **Călina Cristina Nagy** (căs. Ciont)

Conducător de doctorat **Conf. univ. dr. Oana Lelia Pop**



Rezumat

Anemia rămâne o provocare globală pentru sănătate, care afectează peste 1,6 miliarde de persoane, suplimentele convenționale de fier provocând adesea tulburări gastro-intestinale, biodisponibilitate scăzută și disbioză intestinală. Progresele recente în domeniul nanotehnologiei și cercetării probiotice au evidențiat potențialul nanoparticulelor de oxid de fier (IONP) ca o abordare terapeutică nouă. IONP, renumite pentru proprietățile lor magnetice, biocompatibilitate și reactivitate ridicată, pot fi sintetizate prin metode chimice, fizice și biologice. Pe lângă avantajele metodelor convenționale de sinteză, cum ar fi precipitarea, hidrotermală, microemulsie și sol-gel, provocările rămân legate de agregare, degradare oxidativă și eliminare rapidă de către sistemul imunitar. În contrast, sinteza biologică a IONP-urilor, în special prin căile microbiene, oferă nanoparticule cu stabilitate sporită și un profil de toxicitate mai scăzut, potrivite pentru aplicații biomedicale.

Probioticele, în special tulpinile de *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*, devin transportori promițători pentru IONP datorită mucoadeziunii lor inerente, rezistenței în mediile acide și capacității de a modula microbiota intestinală, oferind o platformă sinergică pentru livrarea țintită a fierului. Scpul acestei teze a fost dezvoltarea unui sistem biohibrid probiotic IONP, în care probioticele servesc ca transportatori naturali. *L. fermentum* a fost utilizat pentru proprietățile mucoadezive intrinseci, rezistența la mediul acid gastric și pentru capacitatea de a modula metabolismul fierului prin secreția de compuși bioactivi precum ferireductaza și acidul p-hidroxifenilactic. Aceste caracteristici îmbunătățesc în mod semnificativ absorbția fierului de către enterocite, crescând astfel biodisponibilitatea fierului, atenuând în același timp efectele secundare asociate, de obicei, cu tratamentele convenționale.

Evaluările sistematice din studiu se concentrează pe caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor, examinând parametri precum dimensiunea, morfologia și chimia suprafeței și pe evaluarea mecanismelor lor de absorbție celulară. Investigațiile privind citotoxicitatea IONP-urilor, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, arată că, atunci când sunt transportate de probiotice, aceste nanoparticule prezintă o generare redusă de specii reactive de oxigen și un stres celular mai scăzut în comparație cu suplimentele convenționale de fier.

Prin integrarea tehnicilor avansate de inginerie a suprafețelor (conjugarea polimerilor biocompatibili și a acoperirilor naturale derivate din structurile celulare probiotice), studiul abordează instabilitatea coloidală și provocările nespecifice de biodistribuire care au limitat istoric traducerea clinică a IONPs. Această funcționalitate dublă valorifică potențialul de diagnostic și terapeutic al nanotehnologiei și valorifică beneficiile inerente pentru sănătate ale probioticelor pentru a susține echilibrul microbiotei intestinale.

Prin urmare, această abordare oferă o nouă paradigmă în suplimentarea cu fier prin îmbinarea preciziei nanotehnologiei cu adaptabilitatea biologică a probioticelor.

Obiectivele tezei:

Obiectivul principal al acestei teze de doctorat a fost dezvoltarea și optimizarea unui sistem IONP probiotic conceput pentru a îmbunătăți terapiile de suplimentare cu fier, în special pentru tratarea IDA.

Au fost definite obiective specifice pentru a explora și valida această abordare în mod sistematic:

01. Optimizarea sintezei și caracterizării IONP:

Dezvoltarea și optimizarea protocoalele de biosinteză pentru nanoparticulele de oxid de fier folosind tulpina probiotică (*L. fermentum*), cu accent pe controlul fazei cristalografice (Fe_3O_4 vs. $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), dimensiunea și funcționalizarea suprafeței. Caracterizarea proprietățile fizico-chimice (diametrul hidrodinamic, potențialul zeta, saturația magnetică) și stabilitatea în condiții gastrointestinale simulate.

02. Evaluarea mecanismelor biochimice și celulare ale interacțiunilor IONP-probiotice:

Investigarea căile metabolice specifice tulpinii implicate în reducerea fierului (secreția de acid p-hidroxifenilactic și a ferireductazei) și bioconversia nanoparticulelor.

03. Evaluarea biodisponibilității și a eficacității terapeutice modele *in vitro/in vivo*:

Evaluarea cineticii de absorbției celulare și citotoxicitatea în modelele epiteliale intestinale (Caco-2). Validarea capacității sistemului probiotic-IONP de a restabili parametrii hematologici (hemoglobina, feritina serică, indici RBC) într-un model de șobolan Wistar indus de IDA. Compararea profilurile de farmacocinetică, biodistribuție și toxicitate (funcția hepatorenală, stresul oxidativ) ale IONP probiotice față de sulfatul feros folosind teste histopatologice, biochimice și profilul citokinelor.

04. Evaluarea biocompatibilității tratamentului convențional:

Identificarea disponibilității pacienților IDA de a încerca o terapie alternativă față de tratamentul convențional. Deși efectele secundare ale tratamentului sunt bine documentate, modul în care acestea influențează aderența în contextul real — spre deosebire de conformitatea așteptată în condiții ideale — poate oferi perspective valoroase. În practică, deși mulți pacienți declară că urmează protocoalele terapeutice, aceștia tind frecvent să întrerupă sau să modifice tratamentul din proprie inițiativă.

Prin realizarea acestor obiective, prezenta teză urmărește dezvoltarea unei platforme nanobiotehnologice multifuncționale, menite să îmbunătățească eficiența și siguranța administrării fierului, susținând totodată sănătatea intestinală prin efectele benefice ale probioticelor. Această abordare inovatoare își propune să stabilească un

nou standard în domeniul suplimentării cu fier, prin integrarea progreselor nanomedicinei în soluții terapeutice cu relevanță clinică.

Metodologie

Acest studiu a folosit o abordare multidisciplinară care combină sinteza nanomaterialelor, tehnici microbiologice și evaluări *in vitro/in vivo* pentru a dezvolta și evalua sistemul probiotic-IONP pentru suplimentarea îmbunătățită cu fier. Cercetarea a fost structurată în patru etape experimentale primare: (1) sinteza, caracterizarea și optimizarea IONP; (2) integrarea IONP cu transportatori probiotici și evaluarea stabilității gastrointestinale; (3) evaluarea biodisponibilității, eficacității terapeutice și biocompatibilității; și (4) evaluarea conștientizării biocompatibilitatea tratamentului convențional.

Sinteza, caracterizarea și optimizarea IONP: IONP au fost produse folosind metode de sinteză chimică (solvotermă, hidrotermală, microunde) și biologice (sinteză folosind extracte microbiene) pentru a controla dimensiunea particulelor, morfologia și proprietățile suprafeței. Tehnici analitice avansate, cum ar fi TEM, DLS și XRD, au fost folosite pentru a determina caracteristicile structurale și magnetice ale nanoparticulelor.

Integrarea cu transportatorii probiotici și evaluarea stabilității: *L. fermentum*, *L. rhamnosus* și *L. platarum* au fost cultivate în condiții controlate și utilizate ca transportatori naturali pentru IONP. Tehnicile optimizate de adsorbție și bio-acoperire au obținut IONP conjugate pe suprafața celulei probiotice. Retenția nanoparticulelor, viabilitatea probioticelor și cinetica de eliberare a fierului au fost evaluate utilizând microscopie cu fluorescență și teste spectrofotometrice pentru a menține funcționalitatea probioticului.

Evaluarea biodisponibilității, eficacității terapeutice și biocompatibilității;

Studiile *in vitro* au folosit linii de celule epiteliale intestinale (Caco-2) pentru a expune mecanisme de absorbție celulară și pentru a cuantifica absorbția fierului facilitată de complexe probiotic-IONP. Eficacitatea și siguranța *in vivo* au fost determinate folosind modele animale de anemie cu deficit de fier. Parametrii hematologici (concentrația hemoglobinei, numărul de celule roșii din sânge, nivelurile de feritină) au fost măsurați înainte și după tratament cu sistemul IONP probiotic, iar examinările histopatologice au oferit informații despre orice potențială toxicitate tisulară și răspunsuri inflamatorii.

Evaluarea percepției și a conștientizării biocompatibilității tratamentelor convenționale: Un studiu observațional a fost conceput pentru a surprinde experiențele umane reale legate de tolerabilitatea gastrointestinală, aderarea la tratament și satisfacția generală a pacientului, servind drept referință comparativă pentru sistemul propus de probiotic-IONP.

Prin investigarea sistematică a acestor etape, metodologia a fost concepută pentru a optimiza formularea unui sistem biohibrid multifuncțional care

îmbunătățește biodisponibilitatea fierului și valorifică beneficiile inerente ale probioticelor pentru a atenua efectele secundare și pentru a promova sănătatea intestinală. Această abordare cuprinzătoare asigură că platforma dezvoltată este viabilă pentru o potențială traducere clinică în gestionarea anemiei cu deficit de fier.

Rezultate

Sinteza și caracterizarea IONP

Sinteza IONP a produs particule cuprinse între 6 și 68 nm cu morfologii sferice, cvasi-sferice și neregulate. Analizele TEM și DLS au confirmat distribuțiile mici ale dimensiunilor și proprietățile coloidale stabile în IONP-urile sintetizate biologic, în timp ce XRD a confirmat prezența fazelor cristaline de magnetit (Fe_3O_4) și maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Sinteza folosind *L. fermentum* a generat nanoparticule mai mici, cu biocompatibilitate îmbunătățită și un profil de endotoxină mai scăzut decât omologii sintetizați chimic.

Integrarea biohibridă probiotic-IONP și stabilitatea gastrointestinală

Integrarea IONP cu *L. fermentum* a fost confirmată prin imagistica SEM și măsurători de potențial zeta, care au demonstrat interacțiuni electrostatice puternice și adsorbție de suprafață.

Biodisponibilitate și eficacitate

Testele *in vitro* folosind celule Caco-2 au evidențiat o creștere de 1,9% a absorbției fierului cu sistemul IONP probiotic în comparație cu IONP-urile de control, evidențiind rolul sinergic al ferireductazei secretate de probiotic și al adeziunii mucoasei în creșterea biodisponibilității. Experimentele *in vivo* pe modele de șobolani induse de IDA au arătat îmbunătățiri semnificative ale parametrilor hematologici după 4 săptămâni de tratament. Nivelul hemoglobinei a crescut cu 28%, iar nivelul feritinei serice a crescut cu 42% în grupul probiotic IONP, similar tratamentului convențional cu sulfat feros.

Evaluarea percepției și a conștientizării biocompatibilității tratamentelor convenționale

Dintre pacienții care au primit suplimente convenționale de fier, 45% au raportat efecte secundare gastrointestinale, cum ar fi constipația, diareea și greața. Un procent de 81% dintre participanți și-au exprimat dorința de a încerca sisteme de livrare alternative cu tolerabilitate îmbunătățită, întărind relevanța clinică a platformei IONP probiotice.

Aceste descoperiri validează în mod colectiv sistemul biohibrid propus ca o alternativă sigură, eficientă și biocompatibilă la terapia orală convențională cu fier, susținând aplicarea sa viitoare în intervențiile clinice și nutriționale pentru anemie cu deficit de fier.

Concluzii generale:

1. Această cercetare arată că IONP transportate de tulpini probiotice reprezintă o strategie nanobiotehologică promițătoare pentru îmbunătățirea biodisponibilității fierului și tratarea IDA. Sistemul inovator probiotic-IONP biohibrid combină potențialul de livrare vizat al nanoparticulelor magnetice cu funcționalitatea biologică și rezistența gastrointestinală a probioticelor.

2. IONP sintetizate prin metode biologice au prezentat stabilitate îmbunătățită, morfologie uniformă și biocompatibilitate superioară în comparație cu alternativele sintetizate chimic.

3. Evaluările *in vitro* și *in vivo* au confirmat că sistemul probiotic IONP îmbunătățește absorbția fierului și restabilește parametrii hematologici mai eficient decât tratamentele tradiționale. În modelele animale de IDA, sistemul a condus la îmbunătățiri semnificative ale concentrației de hemoglobină, ale nivelurilor de feritine serice și ale numărului de celule roșii din sânge.

4. Evaluarea pe bază de chestionar a terapiilor convenționale cu fier a indicat o incidență ridicată a efectelor secundare gastrointestinale în rândul pacienților. Aceste descoperiri susțin nevoia de alternative biocompatibile, iar percepția pozitivă a pacienților față de noile sisteme de livrare întărește acceptabilitatea potențială a formulării probiotice IONP.

5. Această teză evidențiază o schimbare de paradigmă în suplimentarea cu fier, introducând o platformă multifuncțională care îmbunătățește absorbția fierului și menține sănătatea microbiotei intestinale prin sinergia probiotică. Cercetarea contribuie la domeniul mai larg al terapiei funcționale nano-activate și poziționează sistemele IONP probiotice ca o alternativă viabilă la tratamentele convenționale.

Cercetările viitoare ar trebui să se concentreze pe validarea clinică a sistemului probiotic IONP la populațiile umane, pe evaluări de siguranță pe termen lung și pe dezvoltarea unor metode de producție scalabile.

Originalitate și contribuțiile personale:

Această teză de doctorat prezintă contribuții științifice originale în domeniul emergent al nanobiotehnologiei și sistemelor de livrare pe bază de probiotice, vizând în mod specific îmbunătățirea suplimentării cu fier prin dezvoltarea unei noi platforme biohibride probiotice-IONP. Cercetarea oferă o explorare multidisciplinară a metodelor de sinteză, a interacțiunilor biofuncționale și a evaluărilor biologice, poziționând această lucrare la interfața dintre nanoștiințe, microbiologie și terapie nutrițională.

Teza a introdus o analiză comparativă detaliată a sintezei IONP prin metode chimice și biologice, stabilind asocieri critice între parametrii de sinteză și impactul

acestora asupra dimensiunii particulelor, morfologiei, încărcăturii de suprafață și citotoxicității. În plus, modelele experimentale originale au simulat digestia gastrointestinală și cinetica eliberării fierului, oferind perspective mecanice asupra stabilității și funcționalității nanoparticulelor în medii biologice complexe.

Printr-o combinație de modele de *in vitro* (culturi celulare) și studii *in vivo* (studii pe șoricei), cercetarea a demonstrat potențialul tratamentului propus în îmbunătățirea biodisponibilității fierului și reducerea toxicității sistemice în comparație cu suplimentele tradiționale de fier.

O altă contribuție personală notabilă constă în includerea unei evaluări centrate pe pacient, realizată prin intermediul unui chestionar structurat, cu scopul de a analiza gradul de conștientizare în rândul pacienților cu anemie feriprivă (IDA) cu privire la limitările terapilor convenționale, în special efectele secundare, precum și de a evidenția existența unor soluții alternative emergente.

Această teză stabilește bazele pentru sisteme de livrare a micronutrienților de nouă generație, integrate biologic prin nanoparticule, cu metode adaptabile și altor terapii, susținând progresul în nutriția de precizie, alimente funcționale și nanomedicină durabilă.