

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

**Efectul tratamentului cu inhibitori de SGLT2 asupra
microbiotei intestinale și statusului inflamator
la pacienții cu DZ tip 2**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. GUJA CRISTIAN

Student-doctorand:

MÎNDRESCU NICOLETA MIHAELA

București, 2025

CUPRINS

Introducere

Listă articole publicate

Abrevieri

Partea generală

Capitolul 1. DZ TIP 2 ÎN SECOLUL 211

1.1 Epidemiologia în DZ tip 21

1.2. Actualități în etiopatogenia DZ tip 23

1.2.1. Factori de risc nemodificabili4

1.2.2. Factori de risc modificabili7

1.2.3. Factori etiopatogenici în DZ tip 210

1.3. Abordări terapeutice moderne în DZ tip 213

1.3.1 Medicație normoglicemiantă modernă13

Capitolul 2. MICROBIOMUL INTESTINAL.....18

2.1. Date generale18

2.2. Rolul microbiomului în fiziologia umană22

2.3. Implicații ale microbiotei intestinale în patologia umană27

2.3.1. Bolile cardiovasculare28

2.3.2. Afecțiunile neuro-psihiatrice29

2.3.3. Afecțiunile nefrologice.....30

2.3.4. Afecțiuni gastro-enterologice31

2.3.5. Afecțiuni oncologice32

2.3.6 Tulburări metabolice33

Capitolul 3. DISBIOZA INTESTINALĂ ÎN DZ TIP 235

3.1. Populațiile bacteriene benefice și rolul lor în sănătatea tabolică.....36

3.2. Populații bacteriene implicate în etiopatogenia DZ tip 239

3.3. Rolul dietei în ameliorarea disbiozei din DZ tip 240

3.4. Interacțiunea medicației normoglicemiante cu MI42

3.4.1 Efectul antiinflamator al inhibitorilor de SGLT2.....47

3.5. Pro/prebioticele-adjuvante în tratamentul DZ tip 250

3.6. Principalele probiotice și rolul lor53

Capitolul 4. MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI.....	57
4.1. Contextul cercetării.....	57
4.2. Justificarea alegerii temei	57
4.3. Obiective generale și specifice	59
4.3.1. Obiective generale	59
4.3.2. Obiective specifice	60
4.4. Ipotezele studiului	61
4.4.1. Ipotezele formulate și abordarea testării lor	61
 Capitolul 5. MATERIAL ȘI METODĂ.....	 63
5.1. Descrierea populației studiate.....	63
5.1.1. Criterii de includere	64
5.1.2. Criterii de excludere	64
5.1.3. Caracteristicile demografice și clinice ale lotului	65
5.2. Designul studiului.....	66
5.2.1. Tipul de studiu	67
5.2.2. Descrierea grupurilor	71
5.3. Intervenția cu inhibitori SGLT2.....	72
5.3.1. Schema terapeutică și doze.....	72
5.3.2. Durata intervenției și evaluările periodice	73
5.4. Evaluarea microbiotei intestinale	74
5.4.1. Metode de recoltare și analiză	74
5.4.2. Parametrii analizați.....	75
5.5. Evaluarea statusului inflamator	76
5.5.1. Markerii analizați.....	76
5.5.2. Tehnici de laborator folosite	77
5.6. Analiza statistică.....	78
5.6.1. Soft utilizat	78
5.6.2. Teste aplicate, prag de semnificație, interpretare.....	79
 Capitolul 6. REZULTATE	 81
6.1. Caracteristicile generale ale pacienților.....	81
6.1.1. Distribuția pe sexe, vârste, IMC, vechimea diabetului.....	81

6.1.2. Profil biochimic inițial.....	84
6.2. Efectele tratamentului asupra microbiotei.....	86
6.2.1. Schimbări în diversitatea bacteriană.....	86
6.2.2. Modificări la nivelul speciilor	88
6.3. Efectele tratamentului asupra markerilor inflamatori.....	89
6.3.1. Evoluția PCR, IL-6, PCR-hs, între vizite	89
Capitolul 7. TESTAREA IPOTEZELOR.....	92
7.1. Ipoteza 1 și Ipoteza 2	92
7.1.1. Metodologie de testare a ipotezelor.....	92
7.1.2. Rezultate obținute	93
7.1.3. Interpretarea rezultatelor	96
7.1.4. Compararea cu literatura de specialitate.....	96
7.1.5. Concluzie finală asupra ipotezei.....	96
7.1.6. Recomandări pentru cercetările viitoare.....	97
7.2. Ipoteza 3	97
7.2.1. Metodologie de testare a ipotezei	98
7.2.2. Rezultate obținute	98
7.2.3. Interpretarea rezultatelor	99
7.2.4. Compararea cu literatura de specialitate.....	100
7.2.5. Concluzie finală asupra ipotezei.....	100
7.2.6. Recomandări pentru cercetările viitoare.....	100
7.3. Ipoteza 4	101
7.3.1. Metodologie de testare a ipotezei	101
7.3.2. Rezultate obținute	102
7.3.3. Interpretarea rezultatelor	103
7.3.4. Compararea cu literatura de specialitate.....	104
7.3.5. Concluzie finală asupra ipotezei.....	104
7.3.6. Recomandări pentru cercetările viitoare.....	104
7.4. Ipoteza 5	105
7.4.1. Metodologie de testare a ipotezei	105
7.4.2. Rezultate obținute	107
7.4.3. Interpretarea rezultatelor	107
7.4.4. Compararea cu literatura de specialitate.....	107

7.4.5. Concluzie finală asupra ipotezei.....	107
7.4.6. Recomandări pentru cercetările viitoare.....	108
7.5. Ipoteza 6	108
7.5.1. Metodologie de testare a ipotezei	109
7.5.2. Rezultate obținute	109
7.5.3. Interpretarea rezultatelor	111
7.5.4. Compararea cu literatura de specialitate.....	112
7.5.5. Concluzie finală asupra ipotezei.....	112
7.5.6. Recomandări pentru cercetările viitoare.....	112
Capitolul 8. ANALIZA REZULTATELOR OBȚINUTE.....	113
8.1. Modificări în microbiota intestinală în urma tratamentului cu iSGLT2.....	113
8.1.1. Compoziția microbiană bazală și gradul de disbioză pre-tratamen.....	113
8.1.2. Modificarea post-tratament în diversitatea microbiană.....	113.
8.1.3. Reducerea speciilor proinflamatorii și normalizarea ecosistemului.....	114.
8.1.4. Modificări funcționale asociate cu ecosistemul bacterian.....	114
8.1.5. Asocieri între modificările microbiene și profilul clinic	114
8.2. Efecte asupra statusului inflamator sistemic.....	116
8.2.1. Profil inflamator bazal.....	116
8.2.2. Modificări post-tratament în grupul cu iSGLT2.....	116
8.2.3. Corelații între inflamație și modificările microbiene.....	117
8.2.4. Efectele asupra inflamației subclinice și riscul cardiovascular.....	117
8.2.5. Variații interindividuale și factori modulatorii.....	117
8.2.6. Sinteză narativă a modificărilor inflamatorii.....	120
8.3. Interdependențe între parametrii metabolici și modificările microbiene.....	120
8.3.1. Evaluarea modificărilor metabolice post-tratament.....	121
8.3.2 Evoluția microbiotei în paralel cu statusul metabolic.....	121
8.3.3. Corelații semnificative între parametrii metabolici și microbiotă.....	121
8.3.4. Influența AGL cu lanț scurt și fermentației bacteriene asupra metabolismului.....	122
8.3.5. Subgrupuri metabolice și profiluri microbiene distincte.....	122
8.3.6. Relații bidirecționale între metabolism și microbiotă.....	123

8.4. Patternuri clinico-biologice identificate	124
8.4.1 Integrarea pattern-urilor intr-un model clinic aplicabil	126
Capitolul 9. CONCLUZII	128
9.1. Concluzii generale	128
9.2. Concluzii specifice pe obiective	131
9.3. Propuneri utile pentru practica clinică.....	134
Capitolul 10. DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE ȘI DEZVOLTARE CLINICĂ	138
10.1 Extinderea analizelor asupra altor clase terapeutice cu efect potențial antiinflamator și cu acțiune asupra MI.....	138
10.2. Aplicarea analizei microbiotei în practica clinică curentă.....	141
10.3. Dezvoltarea strategiilor de medicină personalizată în DZ tip 2.....	143
10.4. Cercetări multidisciplinare și intervenții nutriționale sinergice.....	145
10.5. Monitorizarea longitudinală a răspunsului terapeutic multiplanar.....	146
Bibliografie.....	149

Rezumat

Secolul 21 înseamnă pentru umanitate o mai bună calitate a vieții prin revoluția tehnologică, conectivitate, mobilitate, nivelul crescut de educație și, nu în ultimul rând, printr-o medicină performantă, de precizie. Există însă și dezavantaje ale societății moderne, iar unul dintre cele mai importante este creșterea alarmantă a cifrelor de incidență și prevalență pentru foarte multe boli cronice, precum bolile cardiovasculare, cancerul, obezitatea, diabetul zaharat (DZ) de tip 2. Cu un număr estimat pentru 2024 de 589 milioane de adulți (20-79 ani) afectați, dintre care aproximativ 95% cu DZ tip 2 și cu multiple complicații cronice asociate, această boală metabolică de proporții pandemice consumă resurse financiare enorme pentru îngrijirea și tratamentul pe termen lung.

Cunoscut încă din antichitate, DZ tip 2 are ca element central hiperglicemia care, în timp, poate determina suferința organelor țintă prin apariția complicațiilor cronice micro și macrovasculare invalidante (retinopatia diabetică, nefropatia diabetică, neuropatia diabetică, boala cardiovasculară, boala cerebrovasculară, boala arterială periferică, etc.). Etiologia bolii este multifactorială și include factori de risc genetici dar și care țin de mediu sau de stilul de viață. Din rațiuni didactice aceștia se clasifică în factori de risc **nemodificabili** - istoricul familial, predispoziția genetică, vârsta, sexul, rasa, greutatea la naștere și **modificabili**, asupra cărora se poate interveni - obezitatea, fumatul, sedentarismul, dieta inadecvată, deprivarea de somn, etc. Faptul ca 60-70% din pacienții cu DZ tip 2 au cel puțin o rudă cu această boala diagnosticată face ca istoricul familial și predispoziția genetică să reprezinte factorii de risc modificabili de maximă importanță. Din a doua categorie, se situează pe poziția de frunte obezitatea, prezentă în peste 90% din cazuri.

Mecanismele etiopatogenice ale DZ tip 2 sunt extrem de complexe și încă incomplet elucidate. Apariția și progresia bolii stau sub semnul mai multor modificări fiziopatologice cunoscute sub denumirea de „octetul nefast”, descris de Ralph DeFronzo. Acesta subliniază implicarea mai multor componente, precum mușchiul scheletic, ficatul, țesutul adipos, celula β și cea α pancreatică, tractul gastrointestinal, rinichiul și creierul. Principalele mecanisme patogenice sunt **alterarea producției de insulină** și **creșterea insulinorezistenței** în țesutul hepatic, muscular și adipos. Disfuncția beta-celulară este primordială și este responsabilă de reducerea secreției de insulină din pancreas cu hiperglicemie consecutivă. Insulinorezistența scade utilizarea periferică a glucozei și crește producția hepatică a acesteia, ea fiind selectivă și afectând inegal căile metabolice implicate.

Un mecanism intrat recent în atenția lumii medicale este implicarea microbiotei intestinale (MI) în patogenia DZ tip 2, prin intermediul așa-numitelor disbioze, definite ca dezechilibre ale diverselor populații de microorganisme (bacterii, virusuri, protozoare, fungi) ce colonizează tractul digestiv. Microbiota și microbiomul intestinal sunt două noțiuni corelate care provin din două cuvinte de origine greacă - *micros* (mic) și *bios* (viață). Microbiota reprezintă totalitatea microorganismelor, iar microbiomul (sau ecosistemul microbial) reprezintă întregul habitat ce include organismele enumerate mai sus, suma genelor lor și mediul intestinal unde aceste elemente interacționează. Microbiomul și genomul uman formează metagenomul.

Microbiota intestinală este un sistem ecologic format din aproximativ 100 de trilioane de microorganisme, de 10 ori mai multe decât numărul celulelor umane. Peste 90 % dintre acestea sunt bacterii, iar greutatea sa totală este de 1,5 kg, comparabilă cu cea a ficatului, cel mai mare organ al corpului. Densitatea și compoziția sa cresc de sus în jos, atingând cea mai mare diversitate în colon. Sunt descrise 10 încregături, 1000 de specii și peste 17000 de subspecii bacteriene, dar ele nu se regăsesc toate în intestinul aceluiași individ, ci doar în număr de aproximativ 800-1200 de subspecii. Cele mai bine reprezentate încregături (peste 70 %) sunt *Bacteroidetes* și *Firmicutes*. *Bacteroidetes* include bacterii gram negative, cea mai bine studiată fiind *Prevotella*, iar *Firmicutes* include bacterii gram pozitive - *Clostridium*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* etc. Relația dintre aceste două populații bacteriene exprimată ca raport *Firmicutes* / *Bacteroidetes* se asociază cu câteva condiții patologice, obezitatea fiind cea mai cunoscută dintre ele (valoare crescută). Între speciile microbiene se dezvoltă relații **pozitive** (de mutualism, sinergism, comensalism), **negative** (de parazitism sau antagonism) sau **neutre**, iar interacțiunea lor permanentă influențează atât dinamica cât și funcționalitatea microbiomului. Astăzi, se știe că acest veritabil organ virtual al corpului are peste 3 milioane de gene, cu mult mai numeroase decât cele care compun genomul uman (în jur de 23000). Compoziția microbială este unică pentru fiecare individ și se conturează începând cu primele zile de viață. Aceasta depinde de vârsta gestațională la naștere, de genetica gazdei, de tipul de naștere (naturală, cezariană, în apă), de diversificarea alimentației, utilizarea antibioticelor etc. Se descrie o porțiune stabilă a microbiotei, determinată în primii ani de viață, și o parte variabilă, dependentă de dietă, stres, medicamente administrate etc. Nutriția este extrem de importantă pentru reglarea MI, alimentele asigurând un schimb informațional între mediu și organismul uman. Alimentele ingerate, digerate și transformate în substraturi ajung în intestin, unde vin

în contact cu bacteriile, posesoare de gene ce codifică enzime implicate în digestie. O dietă bogată în carbohidrați și grăsimi, de tip vestic, duce la proliferarea excesivă a bacteriilor specializate în digestia acestor substraturi, bacterii implicate în insulinorezistență și inflamație.

Microorganismele din tractul gastrointestinal sunt puternic implicate în multe procese fiziologice ale gazdei, precum controlul inflamației și al răspunsului imun, asigurarea integrității barierei intestinale, metabolismul acizilor grași și al medicamentelor, producția de vitamine, sinteza de proteine, extracția de energie din anumite substraturi altfel nedigerabile, motilitatea intestinală etc. Un rol esențial în multe dintre aceste procese îl au metaboliții bacterieni, precum acizii grași liberi (AGL) cu lanț scurt (acetat, butirat propionat), implicați în scăderea inflamației intestinale, a invaziei patogene, în activarea celulelor imune și reglarea expresiei citokinelor proinflamatoare (IL-6, IL-12, TNF- α).

În afară de rolurile esențiale în fiziologia umană, cercetările din ultimii ani au arătat ca MI este profund implicată în apariția și progresia multor boli cronice, precum bolile cardiovasculare, neuro-psihiatrice, nefrologice, gastro-enterologice, oncologice, metabolice etc. De exemplu, interacțiunea aparatului cardiovascular cu MI are la bază inflamația, iar intermediarii sunt o serie de molecule, unele cu rol potector (AGL cu lanț scurt), altele cu efect invers (trimetilamina, acizii biliari, lipopolzaharidele). În bolile neurodegenerative, ca de exemplu boala Alzheimer, este descrisă implicarea disbiozei intestinale, cu inflamație și permeabilizarea mucoasei intestinale, urmate de neuroinflamație, hiperfosforilare și acumulare de amilod. Boala Parkinson se corelează semnificativ cu *Helicobacter pylori*. Tulburările din spectrul autist au ca specie încriminată *Clostridium*, detectat în concentrații de 10 ori mai mari la copiii afectați decât la grupul de control. În bolile inflamatorii intestinale scade diversitatea microbiană și populația de *Firmicutes* și crește cea de *Enterobacter* și *Proteobacter*, precum și *Candida albicans*. Ficatul gras non alcoolic se asociază cu scăderea unor tulpini bacteriene antiinflamatoare (*Ruminococcus*, *Faecalibacterium*) și creșterea celor proinflamatoare (*Escherichia coli*, *Fusobacterium*, *Prevotella* etc).

Unele tulpini bacteriene sunt implicate și în apariția afecțiunilor maligne, în special prin metaboliți toxici cu rol proinflamator. *Escherichia coli*, prin metabolitul său colibactină, anumite specii din familia *Enterobacteriaceae*, *Prevotella* sunt implicate în patogenia cancerului colorectal, în timp ce *Lactobacillus reuteri* are rol protector. În cancerul gastric, infecția cu *Helicobacter pylori* este responsabilă de 65-80% din cazurile diagnosticate, arată statisticile.

Bolile metabolice asociază și ele disbioza intestinală, în etiopatogenie, pe lângă factorii genetici și cei de mediu. Obezitatea are ca element definitoriu bogația în *Firmicutes* și scăderea populației de *Bacteroidetes* și de *Bifidobacter*. Există deja numeroase dovezi din studiile pe animale, dar și pe subiecți umani, că MI este un jucător important și în DZ tip 2. Caracteristicile disbiozei din DZ tip 2 sunt creșterea unor specii de bacterii patogene și oportunistice gram-negative (*Enterobacteriaceae*, *Clostridiales*, *Escherichia coli*, *Bacteroides caccae*, *Prevotella copri*, *Bacteroides vulgates*), reducerea diversității microbiene, creșterea permeabilității intestinale, cu inflamație, endotoxemie metabolică și, secundar, rezistență la insulină. O specie semnificativ redusă în DZ tip 2 și prediabet este *Faecalibacterium prausnitzii*, producător de butirat și cu proprietăți antiinflamatoare, fapt dovedit atât la om cât și la animalele de laborator. O altă bacterie cu rol metabolic este *Akkermansia muciniphila*, considerată un biomarker al profilului metabolic sănătos, care scade în DZ tip 2, obezitate și ateroscleroză. Aceași tendință de scădere este descrisă și pentru populațiile de *Bifidobacterium* și *Lactobacillus*. Toate aceste tipuri de bacterii reprezintă probiotice potente care își vor găsi cu siguranță loc în terapia DZ tip 2, alături de medicația normoglicemiantă cunoscută, fie ca aditivi alimentari, fie ca alimente funcționale.

Profilul disbiotic din DZ tip 2 este departe de a fi unul uniform, așa cum demonstrează și studiile de metagenomică. Această variabilitate inter-individuală se corelează nu doar cu riscul de apariție și evoluție a bolii, ci și cu răspunsul la intervențiile nutriționale și farmacologice, aducând în discuție necesitatea unor metode de Machine Learning care să permită fenotiparea.

Un aspect de interes în ultimii ani este relația dintre MI și medicația antihiperglicemiantă, întrucât poate influența semnificativ atât eficacitatea tratamentului, reacțiile adverse dar și efectele pleiotrope benefice, deschizând calea unor posibile strategii terapeutice pentru această boală metabolică. Pe de o parte, medicația poate influența compoziția și funcția MI, iar pe de altă parte, aceasta din urmă poate determina răspunsul individual la tratament.

Metforminul, din familia biguanidelor, este cel mai longeviv agent terapeutic în DZ tip 2 și cel mai prescris - datorită disponibilității, eficacității în scăderea glicemiei, siguranței și prețului accesibil. Acționează la nivel intestinal, unde modifică compoziția MI, atât la persoanele cu diabet cât și la subiecții sănătoși. Un argument în acest sens este faptul că în jejun concentrația sa este de 30-300 ori mai mare decât în plasmă. Modificările microbiene după administrarea de metformin constau în restaurarea microflorei fiziologice, cu creșterea

populației de *Enterobacteriales*, *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus plantarum*, *L.reuteri*, *L.gasseri* și scăderea populației de bacterii patogene (*Roseburia*, *Dorea*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Intestinibacter bartlettii*). Consecința este creșterea concentrației de AGL cu lanț scurt, a integrității barierei gastrointestinale, scăderea lipopolizharidelor (LPZ) și a inflamației.

Acarboza, inhibitor de alfa-glucozidază, blochează absorbția intestinală a glucozei prin acțiune locală și scade glicemia postprandială, crescând biodisponibilitatea carbohidraților în intestin. Efectul pe MI constă în creșterea populațiilor bacteriene cu rol în degradarea acestora și creșterea concentrației de AGL cu lanț scurt. Cele mai importante modificări observate în studiile pe modele animale și pe subiecți umani sunt creșterea populațiilor de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* și *Ruminococcus* și a raportului acizi biliari primari / acizi biliari secundari și scăderea abundenței de *Bacteroides*.

Terapia incretinică face parte din medicația modernă a DZ tip 2. Sunt trei clase terapeutice dezvoltate până la acest moment și anume: inhibitorii de dipeptidyl-peptidaza-4 (DPP4), agoniștii de GLP-1 și agoniștii duali de GLP-1 și GIP (polipeptidul insulinootrop dependent de glucoză). Relația dintre MI și terapia incretinică este bidirecțională și complexă. O serie de metaboliți microbieni (LPZ, indoli, acizi biliari secundari) stimulează secreția de GLP-1. La rândul ei, terapia incretinică intervine prin mecanisme multiple, modulând structura și funcția MI. **Inhibitorii de DPP-4** determină creșterea populației de *Lactobacillus* și *Turicibacter* și scăderea celei de *Bacteroidetes*. **Agoniștii de GLP-1** ameliorează disbioza cu creșterea raportului *Bacteroidetes* / *Firmicutes*, creșterea abundenței tulpinilor de *Akkermansia muciniphila* și a diversității bacteriene, dovezi culese atât din studiile pe modele animale cât și din cele pe subiecți umani. Rezultatul proliferării tulpinilor benefice este creșterea producției de AGL cu lanț scurt, cu rol în imunitate, în păstrarea integrității barierei intestinale și în stimularea secreției endogene de GLP-1. Tirzepatidul, **agonist dual** de GLP-1 și GIP, a dovedit efecte de modulare a MI și a metaboliților acizilor biliari, cu creșterea concentrației de *Akkermansia muciniphila* și scăderea nivelului de acid colic, chenodeoxicolic și litocolic. La modelele animale, tirzepatidul a demonstrat o ameliorare a disbiozei, ducând la creșterea concentrației de *Bacteroides*, *Proteobacter*, *Actinobacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* și *Akkermansia muciniphila* și scăderea populației de *Firmicutes*.

Inhibitorii de SGLT2 reprezintă o clasă de medicamente normoglicemiante care și-a câștigat reputația de game-changer în tratamentul DZ tip 2. Eficacitatea acestor molecule, scăderea ponderală și a tensiunii arteriale, beneficiile cardio-renale semnificative și

numeroasele efecte pleiotrope își găsesc explicația doar parțial în mecanismul renal de acțiune, insulino-independent. Sunt deja numeroase studii care sugerează implicarea MI în medierea acestor efecte. Primele date în acest sens vin din studiile pe modele animale, unde dapagliflozina a determinat creșterea tulpinilor de *Ruminococcus*, creșterea *Bacteroidetes* și scăderea *Firmicutes*, cu efecte antiinflamatoare și antioxidante. Un alt studiu efectuat la șoareci cu diabet și nefropatie a arătat că administrarea de empagliflozină restaurează diversitatea bacteriană, scade concentrația de *Oscillibacter* (producător de LPZ), crește concentrația de *Bacteroides* și expresia occludinei. La subiecți umani, empagliflozina a determinat creșterea bacteriilor benefice (*Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*) și reducerea tulpinilor patogene (*Escherichia*, *Shigella*, *Hungatella*, *Bilophila*). Toate aceste date deschid noi perspective în tratamentul DZ tip 2. Identificarea particularităților individuale ale MI va permite, cu siguranță, o personalizare a tratamentului în scopul atingerii tuturor țintelor terapeutice și prevenirii complicațiilor cronice.

În plus, inhibitorii de SGLT2 au dovedit și efecte antiinflamatoare sistemice cât și locale, specifice de organ, care au la bază mai multe mecanisme: scăderea stresului oxidativ, ameliorarea disfuncției mitocondriale, diminuarea activității inflamatorului, creșterea nivelului de calciu și sodiu intracelular, atenuarea recrutării macrofagelor. Expresia acestor efecte este scăderea markerilor proinflamatori (IL-6, PCR, TNF- α). Rezultatele din studiile cu obiective cardiovasculare sau renale aduc dovezi suplimentare legate de reducerea inflamației la nivel endotelial, cardiac, renal, hepatic și adipos, unde scade populația de macrofage proinflamatoare M1 și crește populația celor antiinflamatoare M2.

Sulfonilureicele și **glinidele** au foarte puține dovezi privind interacțiunea cu MI. **Tiazolidindionele** (pioglitazona), molecule cu rol în scăderea insulinorezistenței din țesutul adipos, muscular și hepatic, nu mai sunt atât de mult utilizate în practica clinică, iar prin urmare nu au prezentat interes din acest punct de vedere.

Incidența și prevalența în creștere a DZ tip 2 fac necesare introducerea de noi strategii terapeutice, atât pentru prevenția cât și pentru tratamentul acestei boli cronice. Noile verigi etiopatogenice care aduc în centrul atenției microbiomul intestinal și modificările lui, ridică problema utilizării, ca adjuvante, a pre- și probioticelor. Acestea au rol în ameliorarea inflamației gastrointestinale și a disbiozei, în creșterea hormonilor incretinici, scăderea rezistenței la insulină și a glicemiei. Pe lângă adoptarea unei diete de tip mediteranean (ce aduce beneficii certe pe termen lung) și practicarea regulată a exercițiului fizic, studiile clinice au arătat ca suplimentarea cu probiotice poate aduce îmbunătățiri cuantificabile în compoziția MI și, implicit, în statusul metabolic al pacienților cu DZ tip 2. Același efect îl poate avea și aportul crescut de fibre și oligozaharide care aparțin categoriei prebioticelor.

Justificarea temei

Alegerea temei de cercetare este justificată de necesitatea extinderii cunoștințelor privind mecanismele complexe care stau la baza interacțiunii dintre MI și medicația antihiperglicemiantă. Diabetul zaharat tip 2 nu mai este văzut doar ca o tulburare izolată a metabolismului glucidic, ci ca o afecțiune caracterizată prin inflamație cronică, disfuncție endotelială, dezechilibre hormonale și alterări ale microbiomului intestinal. Literatura de specialitate arată clar că rezistența la insulină, una dintre pietrele de temelie ale DZ tip 2, este strâns legată de procesele inflamatorii cronice de joasă intensitate, determinate de multiple cauze, printre care și disbioza intestinală. Din punct de vedere terapeutic, ultimii ani au adus în prim-plan o clasă de molecule inovatoare, cea a inhibitorilor de SGLT2, apreciați nu doar pentru reducerea glicemiei ci și pentru efectele lor extraglicemice. Studii recente au arătat că acești agenți pot influența compoziția MI, crescând populațiile benefice (*Bifidobacter*, *Lactobacillus*, *Faecalibacter prausnitzii*) și reducând bacteriile oportuniste proinflamatorii. În plus, inhibitorii de SGLT2 par să reducă semnificativ markerii inflamatori (CRP, IL-6, TNF- α), explicând parțial beneficiile cardiovasculare și renale observate în marile studii clinice. Cu toate acestea, datele sunt încă limitate, multe studii fiind efectuate pe modele animale sau pe populații mici, iar rezultatele lor nu sunt întotdeauna concordante.

Această temă este justificată și prin lipsa de date consistente din studiile realizate în România, pe populația locală, cu particularitățile sale genetice, dietetice și socio-economice. Cercetarea propusă vine să completeze aceste lacune, utilizând o cohortă bine caracterizată clinic și paraclinic, supusă unui protocol terapeutic clar (randomizare între două brațe: metformin+inhibitori de SGLT2 versus metformin+iDPP4). Analiza detaliată, prin metode moderne, a MI și corelarea rezultatelor cu markerii inflamatori și parametrii metabolici aduc o valoare adăugată cercetării.

O altă motivație importantă este caracterul practic și aplicabilitatea directă a rezultatelor. Înțelegerea modului în care inhibitorii de SGLT2 influențează MI și inflamația ar putea permite personalizarea tratamentului la pacienții cu DZ tip 2, optimizarea schemelor terapeutice și chiar dezvoltarea unor strategii combinate (asocierea cu pre/probiotice sau intervenții dietetice) care să maximizeze beneficiile metabolice.

Nu în ultimul rând, tema este relevantă din perspectiva cercetării fundamentale, încercând să elucideze mecanisme fiziopatologice încă incomplet înțelese. Într-un context global în care medicina personalizată și abordările integrate câștigă teren, această cercetare își propune să facă legătura între farmacologia modernă, microbiologie și inflamație, deschizând noi direcții de investigare și intervenție terapeutică.

Obiective generale și specifice

Direcțiile de cercetare sunt componente esențiale ale oricărui proiect de studiu. Obiectivul general al acestei lucrări de doctorat este de a investiga modul în care tratamentul cu inhibitori de SGLT2 influențează MI și statusul inflamator la pacienții cu DZ tip 2. Alegerea acestui obiectiv derivă din nevoia de a înțelege mai bine efectele extraglicemice ale noilor terapii, efecte care pot contribui la reducerea riscului cardiovascular și renal. Printr-o analiză comprehensivă a efectului inhibitorilor de SGLT2 asupra parametrilor metabolici, inflamatori și microbieni, lucrarea își propune să exploreze modificările calitative ale diversității bacteriene, dar și modificările cantitative ale populațiilor benefice și patogene, evaluând, în paralel, și modificările markerilor inflamatori.

Un alt obiectiv general constă în evaluarea corelațiilor dintre modificările în MI și evoluția parametrilor metabolici, pentru a determina dacă există o relație de tip cauză-efect între cele două. Prin această abordare integrativă, cercetarea își propune să contribuie la fundamentarea conceptului de medicină personalizată în diabet, oferind clinicianului informații suplimentare pentru a adapta tratamentul la nevoile individuale ale pacientului. De asemenea, lucrarea are ca obiectiv general și crearea unei baze de date locale, care să reflecte particularitățile pacienților români cu DZ tip 2, având în vedere că majoritatea datelor disponibile în literatură provin din studii internaționale, pe populații diferite din punct de vedere genetic, socio-economic, alimentar etc.

Obiectivele specifice constau în analiza modificărilor de MI înainte și după inițierea tratamentului cu iSGLT2. Cu ajutorul unor tehnici moleculare de rezoluție înaltă, sunt urmărite diversitatea bacteriană, abundența speciilor benefice și reducerea celor oportunistice. Un al doilea obiectiv specific este analiza modificărilor markerilor inflamatori, înainte și după 3 luni de tratament cu inhibitori de SGLT2. Totodată, se evaluează efectului antiinflamator potențial al acestora, independent de glicemie, prin măsurarea PCR, PCR-hs și IL-6. Al treilea obiectiv specific constă în compararea evoluției parametrilor metabolici între două grupuri de pacienți (unul tratat cu metformin și iSGLT2, iar celălalt cu metformin și iDPP4), pentru a detecta eventualele diferențe de eficacitate metabolică, antiinflamatoare și microbiană. Al patrulea obiectiv specific vizează identificarea, prin integrarea în modele statistice multivariate, a unor factori de influență asupra răspunsului terapeutic, precum vârsta, sexul, IMC-ul, circumferința abdominală etc. Un obiectiv specific important este explorarea relațiilor de tip corelație sau cauzalitate între

schimbările în MI și modificările parametrilor metabolici și inflamatori. Un ultim obiectiv specific este crearea unei baze de date integrate care să conțină informațiile clinice, paraclinice, biochimice și microbiologice ale pacienților studiați, pentru o analiză cât mai detaliată a rezultatelor, dar și ca punct de plecare pentru proiecte viitoare, cercetări multicentrice sau metaanalize.

Formularea ipotezelor

Pentru a răspunde obiectivelor lucrării și a construi o imagine cât mai clară asupra efectelor tratamentului cu inhibitori de SGLT2 asupra MI și statusului inflamator la pacienții cu DZ tip 2, am formulat **șase ipoteze principale**.

Ipoteza 1: Tratamentul cu iSGLT2 crește semnificativ abundența speciilor bacteriene benefice (producătoare de acizi grași liberi cu lanț scurt) la pacienții cu DZ tip 2. Această ipoteză pleacă de la dovezile actuale, obținute mai ales din studiile pe modele animale, care arată creșterea de *Bifidobacter*, *Lactobacillus*, *Faecalibacter prausnitzii* după administrarea de iSGLT2. Ipoteza va fi testată analizând compoziția MI înainte și după 3 luni de tratament cu empagliflozină. Analiza statistică va include teste de diferență pereche (paired t-test sau Wilcoxon), evaluarea diversității alfa și beta. Rezultatele vor fi interpretate în raport cu grupul control (pacienți tratați cu metformin + iDPP4).

Ipoteza 2: Tratamentul cu iSGLT2 reduce semnificativ abundența speciilor bacteriene patogene (*Escherichia*, *Klebsiella* etc.) la pacienții cu DZ tip 2. Există deja date acumulate din studiile pe modele animale și pe subiecți umani, că inhibitorii de SGLT2 reduc bacteriile patogene, endotoxemia și inflamația. Studiul își propune să testeze dacă empagliflozina induce astfel de modificări și cât de importante sunt acestea din punct de vedere cantitativ. Testarea ipotezei se va derula la fel cu Ipoteza 1, iar metodele statistice folosite vor fi identice.

Ipoteza 3: Tratamentul cu iSGLT2 reduce nivelurile markerilor inflamatori sistemici, independent de controlul glicemic.

Ipoteza se bazează pe datele din studii internaționale care arată că iSGLT2 au efecte antiinflamatorii care nu depind exclusiv de scăderea glicemiei. Pentru testare, vom compara valorile markerilor inflamatori la vizita inițială și finală, utilizând teste parametrice sau non-parametrice, în funcție de distribuția datelor. În plus, vom folosi modele de regresie pentru a controla efectele glicemiei asupra inflamației, evaluând dacă reducerea inflamației se menține după ajustarea pentru HbA1c.

Ipoteza 4: Tratamentul cu iSGLT2 reduce incidența fungilor patogeni intestinali la pacienții cu DZ tip 2, comparativ cu inhibitorii DPP-4.

Ipoteza 4 pornește de la premisa că tratamentul cu iSGLT2 (empagliflozin) are efecte benefice nu doar asupra parametrilor metabolici, ci și asupra compoziției microbiotei intestinale, în special prin reducerea speciilor fungice patogene (*Candida albicans*). Ipoteza se bazează pe observațiile anterioare care sugerează că tratamentul cu empagliflozină poate limita proliferarea fungilor glicofili prin inducerea unui mediu mai competitiv și mai puțin permisiv, secundar remodelării bacteriene (efect antifungic indirect).

Ipoteza 5: Efectele tratamentului cu inhibitori de SGLT2 asupra microbiotei sunt mai pronunțate decât cele ale tratamentului cu iDPP-4

Această ipoteză pornește de la premisa că tratamentul cu inhibitori de SGLT2 exercită un impact mai profund și mai extins asupra compoziției MI decât gliptinele. Pentru evaluarea acestei ipoteze, am comparat evoluția abundenței bacteriene între cele două grupuri de tratament. S-au analizat diferențele individuale pentru patru specii bacteriene reprezentative: *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* și *Escherichia coli*. Analiza statistică a inclus teste Wilcoxon pentru comparația pereche (intragrupe) și testul Mann-Whitney pentru diferențele intergrup.

Ipoteza 6: Modificările în microbiotă se corelează cu îmbunătățiri ale parametrilor metabolici și inflamatori, sugerând un rol mecanistic al microbiotei în beneficiile tratamentului cu iSGLT2

Această ipoteză urmărește să investigheze dacă modificările observate la nivel microbial sunt doar un efect colateral al tratamentului sau dacă acestea se corelează cu ameliorări metabolice și antiinflamatorii. Pentru testare, vom efectua analize de corelație între modificările bacteriene (ex. creșterea *Bifidobacterium*) și modificările în glicemie, HbA1c, PCR, PCR-hs, IL-6, precum și analize de regresie multivariată pentru a identifica predictorii independenți ai îmbunătățirii clinice.

Material și metodă

Populația studiată, designul cercetării și metodele de analiză folosite **reprezintă materialul și metoda** studiului. Lotul studiat în cadrul acestei cercetări a fost format din 61 de pacienți adulți diagnosticați cu diabet zaharat tip 2, recrutați din cadrul ambulatoriului Institutului Național „Prof. Dr. N. Paulescu” și al altor centre de diabet colaboratoare, în perioada ianuarie 2023 – ianuarie 2024. Acești pacienți au reprezentat o selecție atentă

dintr-o cohortă inițială mai largă de 72 de pacienți pre-evaluați, dintre care 61 au fost incluși definitiv în baza finală de date, după aplicarea protocoalelor de eligibilitate și după obținerea consimțământului informat.

Din punct de vedere demografic, lotul final a inclus 30 bărbați (49.2%) și 31 femei (50.8%), cu o vârstă medie de 64.2 ani, cu un minim de 37 ani și un maxim de 75 ani, indicând o grupă de vârstă la care boala este frecvent diagnosticată și tratată. Majoritatea (82%) provin din mediul urban. Durata medie a evoluției diabetului a fost de aproximativ 5.5 ani, cu variații între cazurile cu diagnostic recent și pacienți cu forme mai vechi, aflate în stadiu de intensificare terapeutică.

La nivel antropometric, pacienții au prezentat valori medii ale indicelui de masă corporală de 29.7 kg/m² (valoare mediană = 28.5, valoare minimă = 20.2, valoare maximă = 42.2), fiind în mare parte incluși în categoriile de obezitate grad I sau II (respectiv 41 de pacienți), conform criteriilor Organizației Mondiale a Sănătății. Circumferința abdominală, un indicator esențial pentru evaluarea obezității centrale și a riscului cardio-metabolic, a avut valori medii peste pragurile de risc recunoscute, consolidând imaginea unei populații cu risc metabolic crescut.

Pe lângă profilul antropometric, pacienții au fost evaluați și biochimic. Valorile medii ale hemoglobinei glicate au fost de 6.56%, cu un minim de 6 și un maxim de 9%. Acestea indică un nivel moderat de control glicemic, în pofida utilizării metforminului în doză medie de 2000 mg/zi la bărbați și 1500 mg/zi la femei. Valorile glicemiei à jeun au fost, de asemenea, monitorizate, cu o medie de 129.38 mg/dL, alături de un profil lipidic caracterizat prin colesterol total de 174.63 mg/dL, LDL de 100.9 mg/dL, HDL de 50 mg/dL și trigliceride de 167.6 mg/dL. În plus, acidul uric a avut valori medii de 5.15 mg/dl, cu un minim de 2.2mg/dl și un maxim de 9.6mg/dl, sugerând un risc asociat de hiperuricemie.

În ceea ce privește statusul inflamator, media CRP-hs a fost de 2.52 mg/L, iar media IL-6 a fost de 3.46 pg/mL, ambele marcând o stare de inflamație cronică de joasă intensitate, specifică DZ tip 2. Aceste date sunt relevante deoarece permit evaluarea impactului intervenției terapeutice nu doar asupra parametrilor glicemici, ci și asupra inflamației sistemice și a modificărilor de la nivelul microbiotei intestinale.

Pacienții au fost împărțiți în două grupuri terapeutice distincte, randomizate 1:1: un grup tratat cu metformin și inhibitor DPP4 (sitagliptin) și un grup tratat cu metformin și inhibitor SGLT2 (empagliflozin).

Criteriile de includere au fost riguros stabilite: vârsta cuprinsă între 18 și 80 de ani, diagnosticul de DZ tip 2 conform criteriilor de diagnostic stabilite de Asociația Americană de Diabet (ADA), hemoglobina glicată $\leq 9\%$, IMC-ul >20 kg/m². Un alt criteriu important a fost utilizarea metforminului ca terapie de fond, acesta fiind considerat standardul de

tratament inițial în DZ tip 2. În plus, pacienții trebuiau să accepte să participe voluntar la studiu și să semneze consimțământul informat, conform normelor etice internaționale.

Criteriile de excludere au fost concepute pentru a minimiza variabilele de confuzie și pentru a reduce riscul apariției unor evenimente adverse care ar putea compromite integritatea studiului. Astfel, pacienții diagnosticați cu diabet zaharat tip 1 au fost excluși, întrucât mecanismele patogenice și răspunsurile la tratament diferă fundamental de cele din DZ tip 2.

Au fost excluși și pacienții cu insuficiență renală severă, definită printr-un eGFR < 20 ml/min/1.73 m², deoarece această afecțiune limitează utilizarea inhibitorilor SGLT2 și ar putea introduce factori de risc suplimentari. De asemenea, pacienții cu boli gastrointestinale cronice (sindrom de colon iritabil, boală celiacă, boli inflamatorii intestinale) au fost excluși, dat fiind că aceste condiții pot influența direct compoziția microbiotei intestinale și valorile markerilor de inflamație și pot distorsiona rezultatele studiului.

Un alt criteriu de excludere a fost utilizarea recentă de antibiotice (în ultimele 30 de zile), care pot modifica profund structura și funcția microbiotei intestinale, cu efecte persistente. Pacienții cu afecțiuni maligne active sau cu alte boli inflamatorii cronice, care pot induce modificări sistemice ale statusului inflamator, au fost, de asemenea, excluși pentru a evita bias-ul.

Femeile gravide sau cele care planificau o sarcină în perioada studiului au fost excluse, atât din motive de siguranță, cât și din cauza modificărilor fiziologice și metabolice asociate sarcinii, care pot influența variabilele analizate. De asemenea, pacienții cu alergii cunoscute la inhibitorii de SGLT2 și la cei de DPP-4 sau care erau deja înrolați în alte studii clinice au fost excluși, pentru a evita reacțiile adverse și suprapunerea de intervenții.

Designul studiului a fost structurat în mai multe etape, de la recrutarea pacienților și aplicarea criteriilor de eligibilitate, până la randomizarea lor în grupurile de tratament și monitorizarea longitudinală. Studiul a fost unul randomizat, prospectiv, cu evaluări realizate la două momente esențiale: vizita inițială (baseline) și vizita finală, realizată după trei luni de tratament. Pacienții au fost evaluați clinic și paraclinic la fiecare dintre aceste momente, fiind colectate date privind parametrii antropometrici, markerii metabolici, compoziția MI și markerii inflamatori sistemici. Prelevarea probelor de materii fecale și analiza detaliată a microbiomului intestinal au reprezentat un element inovator al studiului, fiind efectuate prin metoda culturilor.

Randomizarea pacienților a fost realizată în proporție de 1:1, folosindu-se o listă generată computerizat, astfel încât fiecare pacient eligibil să fie alocat aleatoriu fie în grupul de tratament cu metformin + iSGLT2, fie în grupul de tratament cu metformin + iDPP-4 (control). Această metodă a permis obținerea a două grupuri comparabile din punct de vedere al caracteristicilor de bază (vârstă, sex, IMC, durată a diabetului), reducând influența

factorilor confuzivi. În cadrul acestui studiu, am optat pentru metoda *randomizării prin minimizare*, care este dinamică și adaptativă, funcția de minimizare aleasă fiind parametrizată prin doi factori: vârsta pacientului și valoarea măsurată a hemoglobinei glicozilate (HbA1c). Pentru asigurarea uniformității intervenției, pacienții au fost instruiți să păstreze constant regimul alimentar și nivelul de activitate fizică pe durata studiului, astfel încât modificările observate să poată fi atribuite în principal tratamentului farmacologic. Durata intervenției în acest studiu a fost de trei luni (12 săptămâni), interval ales pe baza datelor din literatura de specialitate, care arată că modificările la nivelul microbiotei intestinale și ale statusului inflamator pot deveni detectabile în acest interval, chiar dacă anumite efecte metabolice apar mai rapid. Pe durata intervenției, pacienții au fost monitorizați prin contacte telefonice și vizite intermediare, pentru a evalua aderența la tratament și eventualele efecte adverse. De asemenea, s-au oferit recomandări privind hidratarea, igiena personală și recunoașterea simptomelor posibilelor infecții genito-urinare, care reprezintă un efect advers cunoscut al inhibitorilor SGLT2.

Un aspect esențial al designului l-a reprezentat și respectarea principiilor etice: toți pacienții au fost informați complet cu privire la obiectivele și procedurile studiului și au semnat consimțământul informat. Studiul a fost aprobat de comisia de etică și s-a desfășurat în conformitate cu Declarația de la Helsinki.

Evaluarea MI a reprezentat un element central al acestui studiu, având rolul de a explora modul în care tratamentul cu inhibitori SGLT2 influențează ecosistemul microbial intestinal la pacienții cu diabet zaharat tip 2. Pentru realizarea unei analize precise, recoltarea probelor fecale a fost efectuată în condiții standardizate, conform protocoalelor internaționale de lucru. Pacienții au fost instruiți să recolteze probele în recipiente sterile, special concepute pentru transportul materialului biologic, evitând contaminarea externă și păstrând integritatea probelor. Recoltările au fost realizate preferabil în primele ore ale dimineții, iar probele au fost transportate în condiții standardizate către laboratorul central din Berlin (DIN EN ISO15189), unde au fost analizate utilizând metoda culturilor. Mediile de cultură folosite sunt conforme cu legislația europeană, fiind produse de Biomerieux și Becton Dickinson. Timpul de incubație este de 1-4 zile, la temperatură de 30-35 de grade, în funcție de tulpinile bacteriene sau fungice care urmează a fi detectate. Pentru identificare și cuantificare, coloniile de anumite morfologii sunt numărate și calculate pentru a obține rezultatul în formatul CFU (colony forming units) /g materii fecale. Dacă este necesară diferențierea suplimentară, aceasta este obținută prin sistemul VITEK (Biomerieux). Parametrii evaluați au fost diversitatea microbială, pH-ul, compoziția în principalele încregături, urmărindu-se creșterea proporției bacteriilor benefice și reducerea bacteriilor proinflamatoare.

Din punct de vedere al profilului inflamator, în cadrul studiului au fost analizați trei markeri inflamatori principali: proteina C reactivă de înaltă sensibilitate, interleukina 6 și

proteina C reactivă standard. Acești markeri au fost evaluați la două momente cheie: înainte de inițierea tratamentului (baseline) și după trei luni de intervenție terapeutică, pentru a surprinde dinamica modificărilor induse de terapie. Compararea acestor valori între grupul tratat cu iSGLT2 + metformin și grupul control (metformin + inhibitor DPP-4) a permis identificarea efectelor specifice ale SGLT2i asupra inflamației sistemice.

Aceste analize, ca și cele standard (hemoleucograma, profilul lipidic, uree, creatinină, a uric etc.) au fost realizate în laboratoarele acreditate Synevo, folosindu-se echipamente calibrate și controale interne și externe de calitate. Probele au fost analizate în dublu determinare, pentru a minimiza erorile de măsurare, iar rezultatele au fost validate de personal specializat, cu experiență în diagnosticul biochimic și imunologic.

Un aspect important în descrierea grupurilor îl constituie faptul că pacienții tratați cu iSGLT2 au beneficiat nu doar de reducerea glicemiei, ci și de efecte secundare benefice asupra greutatei corporale, tensiunii arteriale și, conform ipotezelor studiului, asupra microbiotei intestinale. Grupul de control, deși eficient din punct de vedere glicemic, nu a avut aceste efecte pleiotrope, fapt ce a permis evidențierea diferențelor între cele două intervenții.

Analiza statistică s-a desfășurat în mai multe etape: (1) pregătirea bazei de date, (2) analiza descriptivă, (3) testarea diferențelor între grupuri și a modificărilor înainte-după tratament, (4) analiza corelațiilor și regresiilor, și (5) interpretarea rezultatelor în contextul ipotezelor formulate. Fiecare etapă a fost realizată cu atenție, respectând bunele practici statistice, pentru a garanta calitatea și validitatea concluziilor. Datele au fost colectate și înregistrate în baza finală de date, analizate ulterior folosind softuri statistice specializate (SPSS, Minitab, Excel). Testele aplicate au inclus atât analize descriptive (medii, deviații standard, intervale de încredere), cât și teste comparative (t-test, Mann-Whitney U, ANOVA), corelații Pearson/Spearman și modele de regresie multivariată. Pragul de semnificație a fost setat la $p < 0,05$.

Rezultatele: Caracteristicile generale ale pacienților

Analiza caracteristicilor generale ale pacienților incluși în studiu reprezintă un punct esențial pentru interpretarea corectă a rezultatelor. Aceasta permite stabilirea comparabilității grupurilor și oferă un cadru solid pentru evaluarea impactului intervențiilor terapeutice asupra markerilor studiați. Din punct de vedere al **distribuției pe sexe**, pacienții au fost aproape egal împărțiți: 31 femei (50.8%) și 30 bărbați (49.2%), ceea ce asigură

omogenitatea eșantionului. **Vârsta** pacienților a variat între 37 și 75 de ani, cu o medie de 64.25 ± 9.64 ani și o mediană de 68 de ani. Aceasta reflectă tiparul demografic tipic al populației cu diabet zaharat tip 2, cu majoritatea pacienților fiind de vârstă mijlocie și înaintată. În ceea ce privește **IMC-ul**, valoarea medie a fost de 29.7 ± 4.81 kg/m², cu o mediană de 28.5 kg/m², încadrând majoritatea pacienților în categoria supraponderalității și obezității. **Circumferința abdominală**, un marker relevant al obezității centrale și al riscului metabolic, a avut o medie de 104.44 ± 12.15 cm, cu o mediană de 103 cm, valoarea maximă înregistrată fiind de 136 cm.

Profilul biochimic inițial al pacienților din studiu a fost detaliat mai sus și reflectă tiparele clasice ale populației cu diabet zaharat tip 2: un control glicemic moderat, dislipidemie aterogenă frecventă, funcție renală în general conservată, dar cu tendințe spre hiperuricemie, valori hematologice încadrate în limite normale, precum și un status inflamator cronic de joasă intensitate. Toate aceste caracteristici definesc un teren metabolic vulnerabil, în care inflamația persistentă, dereglările lipidice și riscul pro-trombotic se combină și pot amplifica riscurile cardiovasculare și renale specifice pacientului diabetic.

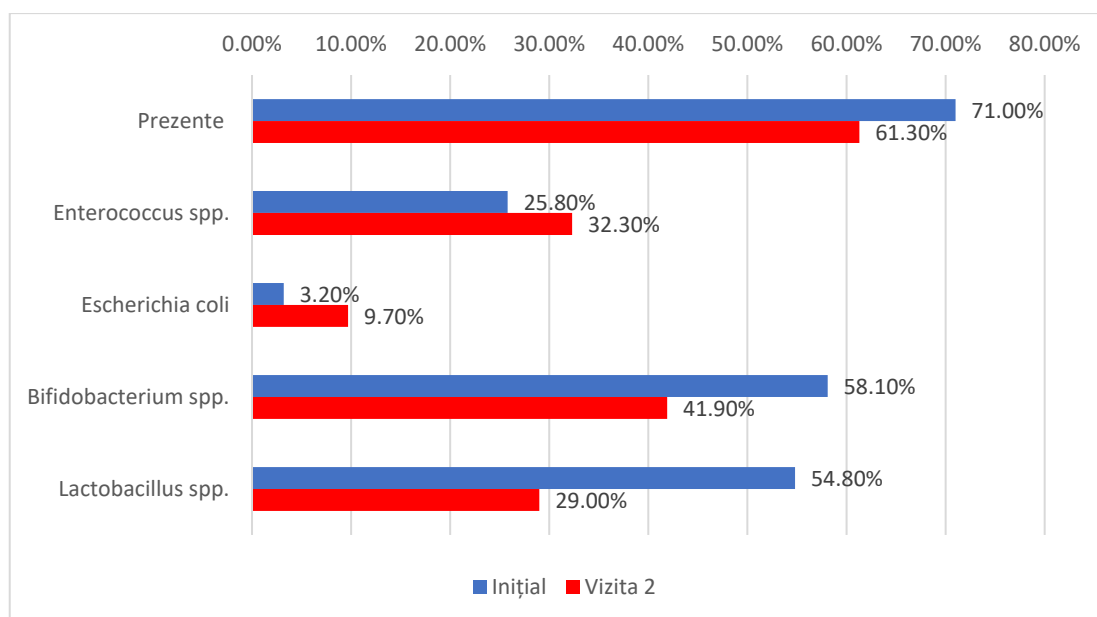
Testarea ipotezelor

Ipoteza 1: Tratamentul cu iSGLT2 crește semnificativ abundența speciilor bacteriene benefice (producătoare de acizi grași liberi cu lanț scurt) la pacienții cu DZ tip 2 în comparație cu inhibitorii de DPP-4

Conform rezultatelor, atât frecvența cât și tipul de bacterii scăzute nu s-au modificat semnificativ în timp ($p > 0.05$) la pacienții în tratament cu Jardiance, cu excepția speciei *Lactobacillus spp.* ($p = 0.021$), unde s-a observat o scădere semnificativă a frecvenței reduse a acestei bacterii de la prima vizită la a doua vizită (54.8% vs. 29%).

Analiza statistică a inclus teste de diferență pereche (paired t-test sau Wilcoxon, în funcție de distribuția datelor) pentru comparația abundenței speciilor înainte și după tratament în cadrul grupului iSGLT2, evaluarea diversității microbiene alfa (indicele Shannon și Simpson) și beta (distanțele Bray-Curtis și Unifrac), precum și comparații intergrup între iSGLT2 și iDPP4 prin teste independente (Mann–Whitney U și t-test). Analiza comparativă a modificărilor în prevalența speciilor bacteriene în grupul tratat cu iDPP4 a evidențiat o tendință generală de ameliorare a profilului microbial, dar fără atingerea semnificației statistice.

Ipoteza nu se confirmă decât în cazul *Lactobacillus*.



Comparația în evoluție a existenței și tipului de bacterii scăzute la pacienții în tratament cu Jardiance

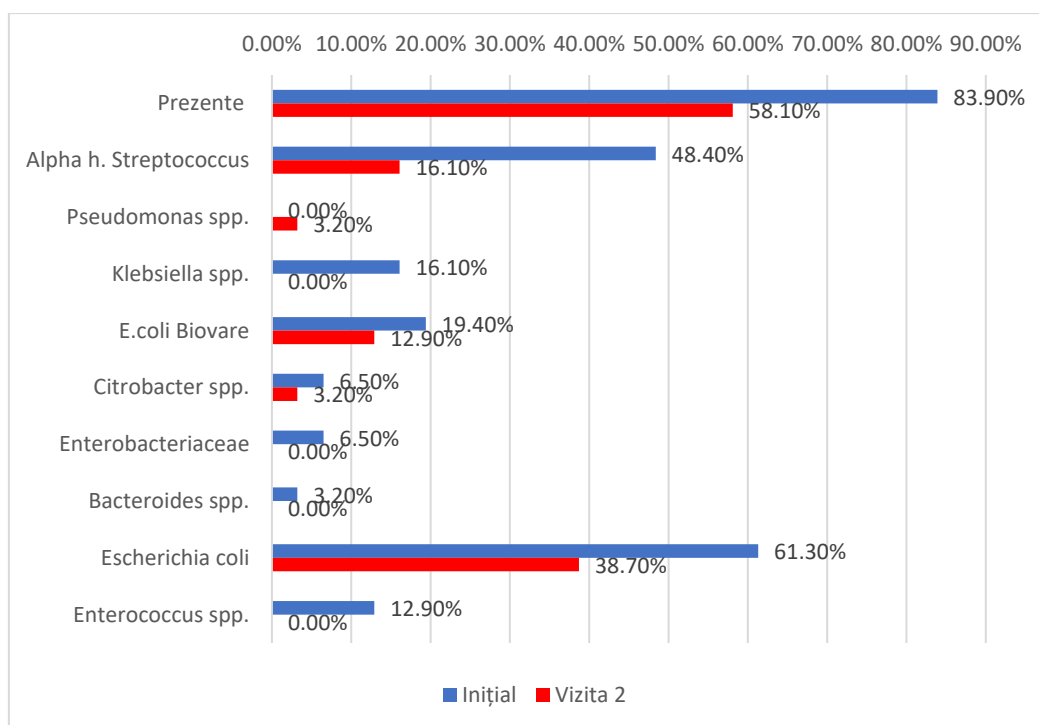
Ipoteza 2: Tratamentul cu iSGLT2 reduce semnificativ abundența speciilor bacteriene patogene (*Escherichia*, *Klebsiella* etc.) la pacienții cu DZ tip 2.

Conform rezultatelor, frecvența bacteriilor crescute (83.9% vs. 58.1%, $p=0.039$) și a speciei de *Streptococ alpha-hemolitic* (48.4% vs. 16.1%, $p=0.013$) au scăzut semnificativ la a doua vizită față de prima vizită, existând o tendință către semnificație în direcția scăderii frecvenței speciilor *Klebsiella spp.* ($p=0.063$) și *Escherichia coli* ($p=0.065$).

Analiza indicilor de diversitate (Shannon, Simpson) nu a arătat modificări semnificative statistic între momentul inițial și final, sugerând că, deși există tendințe de echilibrare a microbiotei, acestea nu ating praguri robuste de semnificație în perioada analizată.

Conform rezultatelor, atât frecvența cât și tipul de bacterii crescute nu s-au modificat semnificativ în timp ($p>0.05$) la pacienții în tratament cu Januvia.

Ipoteza 2 este confirmată parțial



Comparația în evoluție a existenței și tipului de bacterii crescute la pacienții în tratament cu Jardiance

Ipoteza 3: Tratamentul cu iSGLT2 reduce nivelurile markerilor inflamatori sistemici, independent de controlul glicemic.

După trei luni de tratament cu empagliflozin, pacienții din grupul Jardiance au prezentat o reducere semnificativă a tuturor celor trei markeri inflamatori analizați: proteina C reactivă, proteina C reactivă ultrasensibilă și interleukina 6. Mai exact, valorile medii ale PCR au scăzut de la 3.31 mg/L la 1.94 mg/L ($p = 0.037$), PCR-hs de la 2.44 mg/L la 1.52 mg/L ($p = 0.042$), iar IL-6 de la 3.72 pg/mL la 2.58 pg/mL ($p = 0.040$). Aceste modificări au fost semnificative statistic și au rămas relevante chiar și după ajustarea pentru valorile HbA1c, indicând că empagliflozinul exercită un efect antiinflamator independent de ameliorarea controlului glicemic. În schimb, în grupul tratat cu sitagliptin, nu s-au înregistrat modificări semnificative ale markerilor inflamatori. Valorile PCR au crescut ușor, de la 2.1 la 2.46 mg/L ($p = 0.650$), PCR-hs a suferit o creștere nesemnificativă ($p = 0.485$), iar nivelurile de IL-6 au rămas practic neschimbate ($p = 0.517$). Analiza de regresie multiplă a arătat că efectul de reducere a inflamației observat în grupul empagliflozin nu este explicat de variațiile HbA1c, sugerând un posibil efect direct sau pleiotrop al iSGLT2 asupra mecanismelor inflamatorii sistemice.

Ipoteza 3 este confirmată.

Ipoteza 4: Tratamentul cu iSGLT2 reduce incidența fungilor patogeni intestinali la pacienții cu DZ tip 2, comparativ cu inhibitorii DPP-4.

În grupul tratat cu empagliflozin, după trei luni de terapie, s-au constatat modificări notabile în profilul fungic intestinal. Proporția pacienților cu fungi detectabili în scaun a scăzut semnificativ, de la 46,7% la 23,3% ($p = 0.031$), sugerând un posibil efect antifungic indirect al tratamentului. Un aspect remarcabil a fost dispariția completă a *Candida albicans* la trei pacienți care o prezentau la momentul inițial.

Specie fungică	Prevalență Vizita 1 – N (%)	Prevalență Vizita 2 – N (%)	Test McNemar – p-value
Total fungi	14 (46,7%)	7 (23,3%)	0.031
<i>Candida albicans</i>	8 (26,7%)	5 (16,7%)	0.157
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3 (10%)	4 (13,3%)	0.625

Evoluția fungilor la pacienții Jardiance (Vizita 1 vs Vizita 2, McNemar test)

Rezultatele indică o scădere semnificativ mai mare a prevalenței totale a fungilor în grupul Jardiance, cu un Δ de $-23,4\%$ față de $-3,3\%$ în grupul Januvia, diferență care este statistic semnificativă ($p = 0.041$). În ceea ce privește *Candida albicans*, prevalența a scăzut cu 10% în grupul tratat cu iSGLT2, în timp ce în grupul DPP-4 nu s-a înregistrat nicio variație; totuși, această diferență nu a atins pragul de semnificație statistică ($p = 0.226$).

Ipoteza 4 este confirmată.

Ipoteza 5: Efectele tratamentului cu iSGLT2 asupra microbiotei sunt mai pronunțate decât cele ale tratamentului cu iDPP4.

Specie bacteriană	Δ iSGLT2 (medie SD)	$\pm\Delta$ iDPP4 (medie SD)	$\pm p$ U) (Mann–Whitney)
<i>Bifidobacterium</i>	$+1.32 \pm 0.54$	$+0.13 \pm 0.48$	0.004
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$+0.87 \pm 0.61$	$+0.11 \pm 0.39$	0.010
<i>Roseburia</i>	$+0.62 \pm 0.57$	$+0.12 \pm 0.51$	0.026
<i>Escherichia coli</i>	-0.75 ± 0.49	-0.09 ± 0.32	0.017

În grupul tratat cu iSGLT2, am observat o creștere semnificativă a abundenței speciilor benefice, în special *Bifidobacterium* (Δ medie: $+1.32 \pm 0.54$, $p < 0.01$) și *Faecalibacterium prausnitzii* (Δ : $+0.87 \pm 0.61$, $p = 0.042$). În paralel, *Escherichia coli* a înregistrat o scădere (Δ : -0.75 ± 0.49 , $p = 0.036$), sugerând un efect pozitiv asupra

echilibrului bacterian. În grupul iDPP4, modificările au fost minime și nesemnificative statistic. Compararea Δ între grupuri a evidențiat diferențe clare în favoarea empagliflozinului pentru toate cele patru specii.

Ipoteza 5 este confirmată (pentru speciile testate)

Ipoteza 6: Modificările în microbiotă se corelează cu îmbunătățiri ale parametrilor metabolici și inflamatori, sugerând un rol mecanistic al microbiotei în beneficiile tratamentului cu iSGLT2.

Rezultatele au evidențiat corelații semnificative între creșterea relativă a speciilor benefice și ameliorarea statusului metabolic și inflamator. De exemplu, o creștere a abundenței genului *Bifidobacterium* s-a asociat cu o scădere semnificativă a HbA1c (coef. Spearman = -0.41 , $p = 0.032$) și a IL-6 (coef. = -0.38 , $p = 0.047$). De asemenea, *Faecalibacterium prausnitzii* s-a corelat negativ cu PCR-hs și pozitiv cu HDL-colesterol. În regresia multivariată, *Bifidobacterium* a rămas un predictor independent al reducerii HbA1c, cu un coeficient $\beta = -0.27$, IC95%: $-0.49 - -0.06$, $p = 0.014$.

Ipoteza 6 este confirmată.

Analiza rezultatelor, concluzii

Ambele clase terapeutice îmbunătățesc parametrii metabolici, dar cu diferențe în amploare și mecanisme, în favoarea inhibitorilor de SGLT2. Doar tratamentul cu iSGLT2 influențează semnificativ microbiota intestinală. Interdependența dintre metabolism, inflamație și microbiotă este mai evidentă în cazul tratamentului cu iSGLT2, fapt dovedit de multiplele corelații dintre aceste componente.

Pe baza răspunsului clinic și biologic, pacienții tratați cu iSGLT2 au fost clasificați în patru patternuri clinico-biologice: răspuns complet, parțial, non-răspuns și paradoxal. Această stratificare nu a fost posibilă în grupul DPP-4i, unde variabilitatea răspunsului a fost mai redusă, iar modificările biologice au fost mai omogene, dar și mai limitate ca amploare. Acest lucru sugerează că iSGLT2, prin influența sa multiplă, poate genera profiluri diferențiate de răspuns, oferind oportunități pentru medicina de precizie. Ambele clase au profiluri favorabile de siguranță, dar iSGLT2 aduce beneficii pleiotrope. Inhibitorii de SGLT2 influențează consistent fondul inflamator de joasă intensitate asociat DZ tip 2, susținând utilizarea sa în profilurile cu risc inflamator crescut (ex. sindrom metabolic, disbioză intestinală, obezitate).

Direcții viitoare de cercetare și dezvoltare clinică

Aplicabilitatea practică a acestei teze de doctorat include selectarea clasei terapeutice în funcție de profilul pacientului, integrarea markerilor inflamatori în evaluarea curentă, analiza microbiotei intestinale ca instrument clinic, ghidarea tratamentului pe baza pattern-urilor de răspuns, reconsiderarea rolului alimentației și terapiei adjuvante cu pre- și probiotice.

Acest studiu poate fi punct de plecare pentru noi studii și direcții de cercetare. În primul rând, analizele de MI pot fi **extinse** și corelate și cu alte clase terapeutice moderne utilizate în tratamentul DZ tip 2, precum agonisții de GLP-1 sau agonisții duali. Modificările de MI în decursul tratamentului pot fi folosite drept **marker de răspuns terapeutic**. Această abordare ar permite intervenții terapeutice dinamice, prin ajustarea clasei medicamentoase sau adăugarea de adjuvante (probiotice, postbiotice) în funcție de răspunsul microbiotic documentat.

Pe lângă rolul său terapeutic, microbiomul intestinal poate deveni un instrument valoros de **screening și prevenție**. Identificarea precoce a pacienților cu profil disbiotic – chiar înaintea instalării hiperglicemiei manifeste – ar putea permite intervenții timpurii prin dietă, stil de viață sau suplimentare cu prebiotice/probiotice, contribuind astfel la prevenirea progresiei către DZ tip 2. Rezultatele obținute în această lucrare subliniază importanța integrării datelor clinice, biologice și microbiene în conturarea unor **strategii terapeutice personalizate**, care să depășească paradigma tradițională bazată exclusiv pe valorile glicemice. Corelațiile parametrilor metabolici, inflamatori și microbieni pot reprezenta puncte de plecare pentru cercetări multidisciplinare, care pot permite o și mai clară diferențiere a pattern-urilor de răspuns. Nu în ultimul rând, **digitalizarea și integrarea datelor**, folosirea unor algoritmi de inteligență artificială, monitorizarea multiplanară care urmărește simultan parametrii metabolici, inflamatori și microbiotici, vor putea oferi o imagine cuprinzătoare asupra pacientului cu DZ tip 2. Această abordare dinamică și personalizată permite adaptarea timpurie a terapiei, cu control metabolic optim și prevenția complicațiilor. În viitor, integrarea acestor date într-un sistem digital inteligent ar putea transforma radical modul în care este gestionat diabetul, de la prevenție până la tratamentul de întreținere.