



Akademia Wychowania Fizycznego  
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

**mgr Jakub Wiącek**

**Ocena neuro- i immunomodulującego działania  
wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników  
aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów  
mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia  
u tancerek**

Rozprawa doktorska

Promotor:  
prof. AWF dr hab. Joanna Karolkiewicz

Poznań 2026

*Śp. Dziadkowi Lucjanowi za pasję do nauki  
Rodzicom za naukę wytrwałości  
Bratu za wprowadzenie do kultury fizycznej  
Narzeczonej Karolinie za trwanie w najtrudniejszych  
i najpiękniejszych chwilach*

## SPIS TREŚCI

DANE O KANDYDACIE .....	4
WYKAZ SKRÓTÓW .....	5
STRESZCZENIE.....	7
ABSTRACT.....	9
1. WSTĘP .....	11
1.1. Charakterystyka wysiłku i obciążenia psychofizycznego tancerzy .....	11
1.2. Wysiłek fizyczny a układ endokannabinoidowy i mikrobiota jelitowa.....	12
1.3. Zależności pomiędzy mikrobiotą jelitową, metabolitami bakteryjnymi i probiotykami a aktywnością fizyczną i stresem.....	13
1.4. Znaczenie badań dla nauki i praktyki.....	15
2. CEL BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE.....	16
3. CYKL PUBLIKACJI.....	18
4. MATERIAŁ I METODY.....	19
4.1. Charakterystyka badanej grupy .....	19
4.2. Opis zastosowanych metod badawczych.....	21
4.3. Analiza statystyczna wyników .....	24
4.4. Zgody etyczne.....	25
5. WYNIKI BADAŃ .....	26
5.1. Charakterystyka grupy.....	26
5.2. Wskaźniki biochemiczne z krwi (publikacje 1 i 2) .....	27
5.3. Wskaźniki metabolomiczne z kału (publikacja 3) .....	29
5.4. Kwestionariusze dotyczące samopoczucia psychofizycznego (publikacje 1-3).....	33
6. DYSKUSJA .....	35
6.1. Układ endokannabinoidowy oraz markery stanu zapalnego (publikacje 1 i 2) .....	35
6.2. Skład metabolitów jelitowych (publikacja 3) .....	36
6.3. Dolegliwości jelitowe, ból, zmęczenie, sen i radzenie sobie ze stresem (publikacje 1-3) .....	38
7. OGRANICZENIA BADAŃ I ICH ZNACZENIE .....	40
8. WNIOSKI .....	41
9. PIŚMIENNICTWO .....	42
PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-ZAWODOWEJ.....	51
ZAŁĄCZNIK 1. OŚWIADCZENIA.....	53
ZAŁĄCZNIK 2. PUBLIKACJE.....	66

## **DANE O KANDYDACIE**

Data uzyskania tytułu magistra: 19.07.2019 r.

Nazwa jednostki organizacyjnej, w której nadany został tytuł: Wydział Wychowania Fizycznego, Sportu i Rehabilitacji Akademii Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu.

Kandydat nie ubiegał się uprzednio o nadanie stopnia doktora.

Aktualne miejsce pracy: Zakład Żywności i Żywienia, Akademia Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu.

Zajmowane stanowisko: od 1.06.2023 r. – asystent badawczo-dydaktyczny.

## WYKAZ SKRÓTÓW

2-AG – 2-arachidonoiloglicerol

AEA – anandamid (N-arachidonoiloetanolamina)

ANOVA – analiza wariancji

ASCA (ang. *ANOVA-simultaneous component analysis*) – analiza jednoczesna składowych ANOVA

BIA (ang. *bioelectrical impedance analysis*) – bioelektryczna analiza impedancji

BMI – wskaźnik masy ciała

CB1 – receptor kannabinoidowy typu 1

CB2 – receptor kannabinoidowy typu 2

CFU (ang. *colony forming units*) – jednostki tworzące kolonie

CONSORT (ang. *Consolidated Standards of Reporting Trials*) – wytyczne raportowania badań klinicznych

ECS (ang. *endocannabinoid system*) – układ endokannabinoidowy

ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny

EU (ang. *endotoxin units*) – jednostki endotoksynowe

FAAH (ang. *fatty acid amide hydrolase*) – hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych

FAS (ang. *Fatigue Assessment Scale*) – Skala Oceny Zmęczenia

FC (ang. *fold change*) – iloraz stężeń przed interwencją i po interwencji

FDR (ang. *False Discovery Rate*) – odsetek fałszywych odkryć; metoda Benjaminiego-Hochberga)

HPA – oś podwzgórze-przysadka-nadnercza

IBD (ang. *inflammatory bowel disease*) – nieswoiste choroby zapalne jelit

IBS (ang. *irritable bowel syndrome*) – zespół jelita drażliwego

IL-1 $\beta$  – interleukina 1 beta

IL-10 – interleukina 10

LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas

LYM (ang. *lymphocytes*) – limfocyty

LPS – lipopolisacharyd

MDAT (ang. *Mediterranean Diet Assessment Tool*) – 14-elementowy kwestionariusz przylegania do diety śródziemnomorskiej

MEBA (ang. *multivariate empirical Bayes analysis*) – wielowymiarowa analiza empiryczna oparta na podejściu bayesowskim

Mini-COPE – Inwentarz Radzenia Sobie w Sytuacjach Stresowych (wersja skrócona)  
MS/MS – spektrometria mas tandemowa  
m/z – stosunek masy do ładunku  
PCA – analiza głównych składowych  
PLA – grupa placebo  
PRO – grupa probiotyku  
PSQI (ang. *Pittsburgh Sleep Quality Index*) – Pittsburski Indeks Jakości Snu  
RCT (ang. *randomized controlled trial*) – randomizowane kontrolowane badanie kliniczne  
ROME IV – Kryteria Rzymskie IV do oceny zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego  
SCFA (ang. *short-chain fatty acids*) – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe  
TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor alpha*) – czynnik martwicy nowotworów alfa  
UHPLC (ang. *ultra-high performance liquid chromatography*) – ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa  
VAS – wizualna skala analogowa  
WBC (ang. *white blood cells*) – leukocyty

## STRESZCZENIE

**Wstęp.** Celem badań była ocena wpływu 12-tygodniowej suplementacji probiotykiem zawierającym *Lactobacillus helveticus* R0052 i *Bifidobacterium longum* R0175 na układ endokannabinoidowy (ECS), metabolom jelitowy oraz wybrane aspekty stanu psychofizycznego u tancerzek zawodowych narażonych na intensywny wysiłek fizyczny (próby i występy, podróże) i psychiczny (nauka i podleganie ocenie). Zarówno ECS, jak i bakterie jelitowe biorą aktywny udział w regulacji procesów zapalnych oraz funkcji układu nerwowego, w tym w kontroli bólu, apetytu czy snu. Jednym z najlepiej przebadanych zagadnień dotyczących działania ECS i mikrobioty jelitowej jest regulacja poziomu lipopolisacharydu (LPS), endotoksyny przenikającej do krwiobiegu w przypadku wystąpienia zaburzeń bariery jelitowej, przez anandamid, najlepiej poznany endokannabinoid wytwarzany w organizmie. Większość dotychczasowych eksperymentów badających dwukierunkową interakcję pomiędzy ECS a mikrobiotą jelitową przeprowadzono na modelach zwierzęcych, brakuje informacji z badań klinicznych, w tym badań z udziałem osób aktywnych fizycznie.

**Materiał i metody.** Badanie miało charakter randomizowanej kontrolowanej próby z podwójnie ślepą próbą (RCT). Z uwagi na trudności w rekrutacji oraz rygorystyczne kryteria (kontrola diety i poziomu aktywności fizycznej, brak kontuzji i chorób infekcyjnych, niestosowanie suplementacji czy leków mogących wpłynąć na wyniki) do ostatecznej analizy włączono 16 uczestniczek (5 w grupie z probiotykiem – PRO; 11 w grupie placebo – PLA). Przez cały okres badania (12 tygodni) uczestniczki zachowywały dotychczasowy tryb życia. Zalecono im brak zmian w zwyczajach żywieniowych i aktywności fizycznej (poza standardowym treningiem tanecznym), a wszelkie odstępstwa (dodatkowa suplementacja, zmiana diety, urazy, choroby) miały być zgłaszane. Na początku i na końcu interwencji przeanalizowano stężenia białka receptora kannabinoidowego 2 (CB2), enzymu hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych (FAAH), anandamidu (AEA), LPS oraz cytokin (czynnika martwicy nowotworów alfa – TNF- $\alpha$ ; interleukiny 1 beta – IL-1 $\beta$ ; interleukiny 10 – IL-10) za pomocą testów immunoenzymatycznych (ELISA). Próbki kału przeanalizowano na początku i na końcu interwencji za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS). Oceniono poziom aktywności fizycznej (liczba godzin ćwiczeń w tygodniu), siłę chwytu (dynamometr), masę ciała, indeks masy ciała (BMI), masę tkanki tłuszczowej oraz sposób żywienia poprzez analizę 3-dniowych dzienniczków dietetycznych i stopień przylegania do wzorca diety śródziemnomorskiej (14-elementowy kwestionariusz MDAT), a także wskaźniki hematologiczne (liczba białych krwinek – WBC i limfocytów – LYM). Dane dotyczące wskaźników antropometrycznych, hematologicznych i dietetycznych stanowiły czynniki kontrolne, eliminujące potencjalne zmienne zakłócające. Dodatkowo zastosowano kwestionariusze: oceny dolegliwości przewodu pokarmowego (kryteria ROME IV), poczucia zmęczenia (Skala Oceny Zmęczenia – FAS), jakości snu (Pittsburski Indeks Jakości Snu – PSQI) oraz radzenia sobie ze stresem (Mini-COPE). Przeprowadzono także test percepcji bólu mechanicznego (za pomocą algometru i wizualnej skali analogowej VAS).

**Wyniki.** Zaobserwowano istotną dodatnią korelację pomiędzy poziomami LPS i AEA. Suplementacja nie spowodowała istotnych zmian stężeń markerów ECS, LPS ani cytokin

w porównaniu z placebo. Nie zaobserwowano także poprawy objawów gastroenterologicznych, odczuwania bólu czy zmęczenia. Zaobserwowano trendy w kierunku wzrostu poziomu LPS w grupie PLA oraz poprawy jakości snu w grupie PRO. Analiza metabolomiczna wykazała zmianę profilu metabolitów kałowych, a jedną z głównych obserwacji było obniżenie poziomu 2-(4-hydroksyfenylo)kwasu propionowego, które mogło jednak wynikać z początkowych różnic pomiędzy grupami. Suplementacja probiotyczna była dobrze tolerowana i nie zgłoszono niepożądanych działań ubocznych.

**Wnioski.** Zaobserwowana istotna dodatnia korelacja pomiędzy stężeniami LPS i AEA wskazuje na możliwy związek pomiędzy aktywacją układu endokannabinoidowego a endotoksemią i działaniem bariery jelitowej, co potwierdza hipotezy dotyczące osi mikrobiota–jelito–mózg. Probiotykoterapia nie wpłynęła znacząco na główne wskaźniki ECS oraz stanu zapalnego, jednak subtelne zmiany profilu metabolomicznego jelit sugerują możliwe efekty suplementacji, które wymagają potwierdzenia w badaniach z większymi grupami oraz uwzględniających różne dawki probiotyków, zastosowanie synbiotyków czy analizę porównawczą metabolitów z kału z metabolitami w surowicy. Dodatkowo przemawia za tym obserwacja wydłużonego średniego czasu zasypiania oraz trend wzrostowy w poziomie LPS w PLA.

## ABSTRACT

**Introduction.** The aim of the research cycle was to evaluate the effects of a 12-week supplementation with a probiotic containing *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 on the endocannabinoid system (ECS), the gut metabolome, and selected aspects of psychophysical status in professional female dancers exposed to intense physical (rehearsals and performances, travel) and psychological (studying and evaluation) stress. Both the ECS and gut bacteria play an active role in regulating inflammatory processes and nervous system functions, including the control of pain, appetite, and sleep. One of the best-studied topics regarding the function of the ECS and gut microbiota is the regulation of lipopolysaccharide (LPS) levels – an endotoxin entering the bloodstream when the intestinal barrier is impaired – by anandamide, the best-characterized endocannabinoid produced in the body. Most previous experiments examining the bidirectional interaction between the ECS and the gut microbiome have been conducted in animal models, with a scarcity of clinical data, including studies involving physically active individuals.

**Material and Methods.** The study was designed as a randomized, double-blind, placebo-controlled trial (RCT). Due to recruitment challenges and strict inclusion criteria (control of diet and physical activity, absence of injuries and infectious diseases, no supplementation or medication that could influence outcomes), the final analysis included 16 participants (5 in the probiotic group – PRO; 11 in the placebo group – PLA). Throughout the 12-week study period, participants maintained their usual lifestyle. They were instructed not to change their dietary or physical activity habits (apart from their regular dance training), and any deviations (additional supplementation, dietary changes, injuries, illnesses) were to be reported. At baseline and at the end of the intervention, concentrations of cannabinoid receptor type 2 protein (CB2), fatty acid amide hydrolase (FAAH), anandamide (AEA), LPS, and cytokines (tumor necrosis factor alpha – TNF- $\alpha$ ; interleukin 1 beta – IL-1 $\beta$ ; interleukin 10 – IL-10) were measured using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Stool samples were analyzed at both time points using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). Additional assessments included physical activity level (weekly training hours), grip strength (dynamometer), body mass, body mass index (BMI), fat mass, and dietary habits based on 3-day dietary records and adherence to the Mediterranean diet (14-Item MDAT), as well as hematological indices (white blood cell count – WBC, and lymphocyte count – LYM). Anthropometric, hematological, and dietary parameters served as control variables to eliminate potential confounders. The following questionnaires were also administered: gastrointestinal symptoms (ROME-IV criteria), fatigue (Fatigue Assessment Scale, FAS), sleep quality (Pittsburgh Sleep Quality Index, PSQI), and stress coping strategies (Mini-COPE). Mechanical pain perception was assessed using algometry and the visual analog scale (VAS).

**Results.** A significant positive correlation was observed between LPS and AEA levels. Supplementation did not produce significant changes in ECS markers, LPS, or cytokines compared to placebo. No improvement was observed in gastrointestinal symptoms, pain perception, or fatigue. Trends were noted toward an increase in LPS levels in the PLA group and improved sleep quality in the PRO group. Metabolomic analysis revealed changes in

the fecal metabolite profile, with one of the main findings being a reduction in 2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid levels, which, however, may have been due to baseline differences between groups. Probiotic supplementation was well tolerated, and no adverse effects were reported.

**Conclusions.** A significant positive correlation observed between LPS and AEA concentrations indicates a possible link between endocannabinoid system activation, endotoxemia, and intestinal barrier function, supporting hypotheses concerning the microbiota–gut–brain axis. Probiotic supplementation did not markedly affect the main ECS or inflammatory markers; however, subtle shifts in the intestinal metabolomic profile suggest potential effects of the intervention, which require confirmation in studies with larger cohorts, different probiotic dosages, the use of synbiotics, or comparative analyses of fecal and serum metabolites. This is further supported by the observation of prolonged average sleep onset latency and a trend toward increased LPS levels in the PLA.

# 1. WSTĘP

## 1.1. Charakterystyka wysiłku i obciążenia psychofizycznego tancerzy

Tancerze, podobnie jak sportowcy, poddawani są porównywalnym obciążeniom fizycznym, łącząc intensywny trening aerobowy i anaerobowy z wymogiem utrzymania gibkości oraz precyzji ruchów (Koutedakis i Jamurtas 2004). W praktyce tanecznej wysiłek trwa zazwyczaj ponad 30 minut dziennie i odbywa się wielokrotnie w ciągu tygodnia, co może wywoływać adaptacje metaboliczne zbliżone do adaptacji obserwowanych u sportowców. Zalicza się do nich nasilenie przemian energetycznych, zwiększony stres oksydacyjny oraz zmiany w profilu metabolitów, takie jak wzrost produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) czy pochodnych aminokwasów (Dziewiecka i in. 2022; Marttinen i in. 2020).

Obciążenia fizyczne tancerzy często potęgowane są przez specyficzne wymagania estetyczne oraz tryb życia związany z uprawianą dyscypliną. Zarówno w tańcu klasycznym, jak i współczesnym może występować presja utrzymania szczupłej sylwetki, co wśród części osób zwiększa ryzyko niedożywienia, zaburzeń odżywiania oraz dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego (Ringham i in. 2006). Wieczorne próby i występy, a także praca w weekendy zaburzają rytm dobowy, negatywnie wpływając na wydzielanie hormonów oraz regenerację (Teo i in. 2011). Co więcej, częste podróże na występy, skutkujące ekspozycją na nowe patogeny, mogą być przyczyną nawracających infekcji (Niemann 1994).

Wymagania psychiczne związane z tańcem są równie istotne jak obciążenia fizyczne. Tancerze muszą opanowywać złożone sekwencje ruchowe i choreografie, często występując przed publicznością i jury, co wiąże się z silną presją emocjonalną i oceną zewnętrzną. Permanentny stres psychiczny może zwiększać podatność na urazy. W badaniach prospektywnych zaobserwowano, że u studentów tańca wysoki poziom odczuwanego stresu koreluje z częstszym występowaniem kontuzji (van Winden i in. 2021). Zawodowi tancerze narażeni są na znaczne ryzyko urazów układu ruchu, zwłaszcza gdy tygodniowy czas treningów przekracza ~11-12 godzin (Nunes i in. 2022). U kobiet dominują urazy przeciążeniowe układu kostnego (np. złamania przeciążeniowe), podczas gdy u mężczyzn częstsze są stłuczenia i tendinopatie (McBride i Bronner 2022).

Charakterystyczna dla tej grupy jest również tendencja do kontynuowania treningów pomimo odczuwanego bólu, co prowadzi do powstawania kompensacyjnych wzorców ruchowych, obniżenia jakości techniki oraz dalszego zwiększania obciążeń biomechanicznych i psychicznych (Hendry i in. 2022). W połączeniu ze stresem psychicznym może to przyczyniać się do narastania ogólnoustrojowego stanu zapalnego. Przykładowo, u tancerzy startujących w zawodach stwierdzono niższą aktywność osi stresowej (mniejsze wydzielanie kortyzolu) przy jednocześnie podwyższonych wskaźnikach stanu zapalnego we krwi (Berndt i in. 2012). Powyższe obserwacje pokazują, że tancerze stanowią grupę o unikatowym połączeniu stresu fizycznego i psychicznego, co czyni ich modelową populacją do badań poszukujących strategii wspomagających regenerację i samopoczucie, w tym uwzględniających układ endokannabinoidowy oraz mikrobiotę jelitową.

## 1.2. Wysiętek fizyczny a układ endokannabinoidowy i mikrobiota jelitowa

Układ endokannabinoidowy (ECS) to kluczowy regulator wielu procesów fizjologicznych, obejmujących modulację odczuwania bólu, nastroju, łaknienia, reakcji stresowych oraz funkcji immunologicznych (Pertwee 2006). Głównymi endokannabinoidami produkowanymi przez organizm są bioaktywne lipidy: anandamid (AEA), czyli N-arachidonoiloetanolamina, oraz 2-arachidonoilglicerol (2-AG) (Di Marzo i in. 1994). Działają one poprzez receptory kannabinoidowe typu 1 (CB1) i typu 2 (CB2) rozmieszczone w organizmie (Rahaman i Ganguly 2021). Receptory CB1 zlokalizowane są przede wszystkim w ośrodkowym układzie nerwowym, a ich pobudzenie wpływa na percepcję bólu, apetyt oraz samopoczucie (Katona i Freund 2012). Receptory CB2 występują głównie na komórkach układu odpornościowego i odpowiadają za modulację procesów zapalnych oraz odpowiedzi immunologicznej (Turcotte i in. 2016).

Co ważne, endokannabinoidy nie są magazynowane w pęcherzykach synaptycznych jak klasyczne neurotransmitery. Powstają one „na żądanie” – w odpowiedzi na wzrost stężenia jonów wapnia w komórce postsynaptycznej, po czym działają wstecznie na neurony presynaptyczne, regulując uwalnianie innych neuroprzekaźników (Ohno-Shosaku i in. 2012). Anandamid pełni swoje funkcje w sposób toniczny, utrzymuje homeostazę nastroju i apetytu w warunkach spoczynkowych, podczas gdy 2-AG działa fazowo, gwałtownie zwiększając swoje stężenie w odpowiedzi na ostre czynniki stresowe (np. uraz, silne emocje). Po spełnieniu swojej funkcji endokannabinoidy ulegają szybkiej degradacji enzymatycznej (Biernacki i Skrzydlewska 2016). Kluczowym enzymem rozkładającym anandamid jest hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych (FAAH), która hydrolizuje AEA do kwasu arachidonowego i etanolaminy, ograniczając dostępność anandamidu i czas trwania jego sygnału w organizmie (Ligresti i in. 2005; Zhanfirescu i in. 2022). Aktywność fizyczna istotnie wpływa na funkcjonowanie ECS. Umiarkowany wysiętek fizyczny prowadzi do zwiększonego uwalniania endokannabinoidów, zwłaszcza anandamidu, co koreluje z poprawą nastroju i zmniejszeniem lęku po ćwiczeniach, czyli zjawiskiem potocznie nazywanym „euforią biegacza” (ang. *runner's high*) (Matei i in. 2023; Tantimonaco i in. 2014). Jednocześnie podkreśla się, że zarówno niedostateczny, jak i nadmierny wysiętek lub przetrenowanie mogą zaburzać równowagę endokannabinoidową, w tym produkcję endokannabinoidów (Raichlen i in. 2013).

Coraz więcej dowodów wskazuje także na ścisły związek między ECS a mikrobiotą jelitową. Układ pokarmowy komunikuje się z mózgiem m.in. poprzez oś jelitowo-mózgową, a ECS uczestniczy w tym procesie (Cani i in. 2016). Zmiany w składzie mikrobioty jelitowej mogą modulować aktywność ECS i odwrotnie – sygnalizacja kannabinoidowa wpływa na motorykę jelit, przepuszczalność bariery jelitowej oraz profil odpowiedzi zapalnej, co pośrednio kształtuje środowisko dla bakterii (Jansma i in. 2021). W jednym z pierwszych badań w tym zakresie podanie szczepu probiotycznego *Lactobacillus acidophilus* u myszy skutkowało zwiększeniem ekspresji receptorów kannabinoidowych w nabłonku jelitowym i redukcją bólu trzewnego, a efekt był porównywany do działania morfiny (Rousseaux i in. 2007). Z kolei z przeglądu badań z 2023 r. wynika, że ECS odgrywa ważną rolę w regulacji funkcji przewodu pokarmowego, ponieważ wpływa na motorykę, funkcje wydzielnicze, percepcję bólu trzewnego i stan zapalny, co czyni go potencjalnym celem terapeutycznym w zaburzeniach takich jak zespół jelita drażliwego (IBS) (Brierley i in. 2023).

Jednym z „mostów” łączących mikrobiotę z ECS jest wpływ metabolitów bakteryjnych na przepuszczalność bariery jelitowej i stan zapalny (Khan i in. 2021). W warunkach dysbiozy jelitowej, gdy dochodzi do przerwania ciągłości bariery jelitowej (tzw. nieszczelne-

go lub ciekącego jelita), do krwiobiegu przenikają składniki bakterii Gram-ujemnych, przede wszystkim lipopolisacharyd (LPS) (Kinashi i Hase 2021). LPS jest endotoksyną i markerem translokacji bakteryjnej, a jego podwyższone stężenie we krwi wywołuje reakcję zapalną i świadczy o zaburzeniu integralności bariery jelitowej (Ghosh i in. 2020). Co ciekawe, badania sugerują, że ECS reaguje na wzrost poziomu LPS: podwyższony LPS może stymulować syntezę anandamidu w komórkach odpornościowych, co stanowi mechanizm obronny organizmu przed nadmiernym stanem zapalnym (Liu i in. 2003; Maccarrone i in. 2001). Na przykład wykazano, że dodanie LPS do hodowli makrofagów indukuje w nich produkcję AEA poprzez szlak zależny od receptorów CD14 i białka NF-κB (Liu i in. 2003). Jednocześnie LPS może obniżać ekspresję FAAH – enzymu rozkładającego anandamid – co również skutkuje zwiększeniem poziomu AEA (Maccarrone i in. 2001). Dzięki temu anandamid, aktywując receptory CB2, może hamować nadmierną reakcję zapalną wywołaną endotoksyną (Berg i in. 2023; Malek i in. 2015).

### **1.3. Zależności pomiędzy mikrobiotą jelitową, metabolitami bakteryjnymi i probiotykami a aktywnością fizyczną i stresem**

Mikrobiota jelitowa to złożony ekosystem mikroorganizmów zasiedlających przewód pokarmowy, odgrywający fundamentalną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu. W jelicie grubym człowieka bytują biliony bakterii należących do kilkuset gatunków, które pełnią szereg korzystnych funkcji: uczestniczą w trawieniu i pozyskiwaniu energii z pożywienia, syntetyzują witaminy (np. K, z grupy B), modulują dojrzewanie i funkcjonowanie układu odpornościowego oraz komunikują się z układem nerwowym poprzez szereg metabolitów i neuroprzekazników (Rowland i in. 2018; Tang i in. 2023). Jednym z najważniejszych produktów przemian bakteryjnych w jelicie są SCFA, powstające głównie w wyniku fermentacji błonnika pokarmowego przez bakterie fermentujące (Martin-Gallausiaux i in. 2021). Do SCFA zalicza się octan, propionian i maślan. Maślan stanowi główne źródło energii dla komórek nabłonka jelit (kolonocytów) oraz stymuluje ekspresję białek połączeń ścisłych, uszczelniających barierę jelitową (Leonel i Alvarez-Leite 2012). Ponadto SCFA wykazują silne działanie immunomodulujące, np. maślan promuje różnicowanie przeciwwzapalnych limfocytów T regulatorowych (Treg) i hamuje wytwarzanie cytokin prozapalnych przez układ odpornościowy (Ney i in. 2023).

Oprócz SCFA bakterie jelitowe syntetyzują również inne metabolity o znaczeniu biologicznym. Na przykład kwas  $\gamma$ (gamma)-aminomasłowy (GABA), kluczowy neuroprzekaznik hamujący w mózgu, powstaje także w jelicie przy udziale niektórych szczepów bakterii *Lactobacillus* i może oddziaływać na ośrodkowy układ nerwowy poprzez nerw błędny lub krążenie krwi (Strandwitz 2018). Mikrobiota modyfikuje też metabolizm tryptofanu dostarczanego z diety, wpływając na produkcję serotoniny i innych indolowych metabolitów ważnych dla regulacji nastroju i reakcji na stres (O'Mahony i in. 2015). Z tego względu coraz częściej mówi się o mikrobiocie jako o „drugim mózgu” – jej skład i aktywność metaboliczna mogą kształtować funkcje neurobehawioralne gospodarza, w tym poziom lęku czy jakość snu (Ridaura i Belkaid 2015). Enteryczny układ nerwowy, będący rozbudowaną siecią neuronalną w ścianie przewodu pokarmowego, stanowi kluczowy kanał komunikacji między mikrobiotą jelitową a ośrodkowym układem nerwowym, umożliwiając wpływ sygnałów jelitowych na funkcje mózgu (Dowling i in. 2022).

Aktywność fizyczna należy do czynników środowiskowych o silnym wpływie na profil mikrobioty jelitowej. Regularny, umiarkowany wysiłek sprzyja zwiększeniu różnorod-

ności mikrobiologicznej i liczebności pożytecznych bakterii, co przekłada się na wyższe stężenia korzystnych metabolitów, takich jak SCFA (Monda i in. 2017). Osoby aktywne fizycznie, zwłaszcza sportowcy wytrzymałościowi, często wykazują unikatowy „atletyczny” profil mikrobioty, bogaty w bakterie zdolne do produkcji maślanu i propionianu oraz metabolitów wspierających wydolność (Mach i Fuster-Botella 2017; Mohr i in. 2020; Scheiman i in. 2019). Z drugiej strony, ekstremalny wysiłek lub ćwiczenia bez odpowiednich przerw regeneracyjnych mogą działać odwrotnie. Nadmierny stres fizjologiczny zaburza równowagę mikrobioty (dysbioza), prowadząc do spadku liczby pożytecznych bakterii, zwiększenia udziału bakterii potencjalnie patogennych, a także do przejściowego rozszczelnienia bariery jelitowej (Clauss i in. 2021; Varghese i in. 2024). U przetrenowanych sportowców obserwowano podwyższone poziomy LPS we krwi i objawy tzw. endotoksemii wysiłkowej będącej skutkiem właśnie translokacji bakteryjnej, co wywołuje reakcje zapalne i może powodować osłabienie (Clark i Mach 2016).

Stres o podłożu psychicznym również wpływa na mikrobiotę. Aktywacja osi podwzgórze–przysadka–nadnercza (HPA) i wydzielanie tzw. hormonów stresu (glikokortykosteroidy, adrenalina) może zmieniać motorykę jelit oraz skład mikroflory (Konturek i in. 2011). Chroniczny stres u ludzi często wiąże się ze zmniejszeniem różnorodności mikrobioty i proliferacją gatunków prozapalnych kosztem bakterii produkujących SCFA (Silva i in. 2020). Zaburzona mikrobiota nasila sygnały zapalne i neurochemiczne potęgujące odczuwanie stresu lub zmęczenia, co obserwuje się np. u osób z zespołem przewlekłego zmęczenia czy depresją (Misera i in. 2021; Sullivan i in. 2009).

W związku z powyższymi wymienionymi ustaleniami istnieje rosnące zainteresowanie możliwością terapeutycznej modulacji mikrobioty jelitowej u osób narażonych na stres fizyczny i psychiczny, takich jak tancerze czy sportowcy wyczynowi, celem poprawy ich zdrowia i zdolności regeneracyjnych (Jarrett i in. 2025). Probiotyki, czyli wyselekcjonowane szczepy korzystnych dla organizmu gospodarza (kiedy podawane są w odpowiedniej liczbie) bakterii, okazały się obiecującym narzędziem w tym zakresie. Suplementacja probiotykami z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* może przywracać równowagę mikrobioty, zwiększać produkcję SCFA i innych pożytecznych metabolitów, a jednocześnie obniżać poziom LPS (Rodes i in. 2013; Bhatia i in. 2022). Zaobserwowano, że przyjmowanie probiotyków przez sportowców może wpływać na zmniejszenie częstości wystąpień infekcji górnych dróg oddechowych, obniżać wskaźniki stanu zapalnego po intensywnych treningach oraz poprawiać niektóre wskaźniki wydolnościowe (Aparicio-Pascual i in. 2025; Łagowska i Bajerska 2021; Marttinen i in. 2020; Shing i in. 2014). Działanie to przypisuje się m.in. wzmocnieniu bariery jelitowej (mniejsze przenikanie endotoksyn) oraz bezpośredniemu wpływowi metabolitów bakteryjnych na układ immunologiczny i nerwowy. Szczególnie interesującym obszarem badań są tzw. psychobiotyki, czyli probiotyki wpływające korzystnie na funkcje psychiczne, np. redukujące objawy lękowe lub poprawiające jakość snu (Gil-Hernández i in. 2023; Wang i in. 2016). W licznych doświadczeniach wykazano działanie przeciwstresowe i przeciwzapalne kombinacji *Lactobacillus helveticus* R0052 i *Bifidobacterium longum* R0175 – zarówno w badaniach z udziałem modeli zwierzęcych (gdzie zaobserwowano redukcję poziomów markerów zapalnych w mózgu i krwi oraz zapobieganie zaburzeniom pamięci u szczurów poddanych działaniu LPS), jak i badaniach z udziałem ludzi (gdzie odnotowano poprawę nastroju i zmniejszenie poziomu kortyzolu u ochotników przyjmujących te szczepy) (Ait-Belgnaoui i in. 2018; Arseneault-Bréard i in. 2012; Cristofori i in. 2021; Edebol Carlman i in. 2022; Messaoudi i in. 2011; Mohammadi i in. 2019; Partrick i in. 2021; Rodes i in. 2013).

## **1.4. Znaczenie badań dla nauki i praktyki**

Przedstawiony w publikacjach 1–3 cykl badań wnosi do literatury dane empiryczne dotyczące relacji między układem endokannabinoidowym a mikrobiotą jelitową w populacji osób aktywnych fizycznie, co dotychczas było opisywane głównie na modelach zwierzęcych. Nowatorskim aspektem podjętych badań jest zastosowanie analizy metabolomicznej kału oraz ocena wskaźników neuroimmunologicznych w kontekście suplementacji probiotycznej u tancerek. Zwrócono również uwagę na znaczenie personalizacji interwencji probiotycznych, z uwzględnieniem indywidualnych różnic w diecie i składzie mikrobioty jelitowej, poziomie i rodzaju aktywności fizycznej oraz podatności na stres. Uzyskane wyniki badań mogą stanowić punkt wyjścia do projektowania dalszych badań, z wykorzystaniem innych bakterii probiotycznych, sybiotyków, większej próby, dłuższego okresu interwencji oraz dokładniejszego profilowania mikrobioty, metabolomu jelitowego i ich interakcji z układami endokannabinoidowym, nerwowym i odpornościowym.

## 2. CEL BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE

### *Cel badań*

Głównym celem prezentowanej rozprawy doktorskiej była ocena wpływu 12-tygodniowej suplementacji probiotykiem zawierającym szczepy *Lactobacillus helveticus* R0052 i *Bifidobacterium longum* R0175 na wybrane wskaźniki ECS i stanu zapalnego, mikrobiotę i metabolom jelitowy oraz aspekty psychofizyczne związane z przewlekłym wysiłkiem fizycznym i psychicznym u tancerek.

Szczegółowe cele obejmowały:

- a) ocenę wpływu suplementacji probiotycznej na stężenia wybranych markerów ECS: receptora kannabinoidowego typu 2 (CB2), enzymu hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych (FAAH) oraz anandamidu (AEA) w surowicy krwi;
- b) zbadanie wpływu suplementacji na poziom endotoksyny bakteryjnej lipopolisacharydu (LPS) oraz wybranych cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) i przeciwzapalnych (IL-10) w surowicy krwi;
- c) ocenę zmian w składzie mikrobioty jelitowej oraz profilu metabolitów bakteryjnych w kale w odpowiedzi na suplementację probiotyczną;
- d) ocenę wpływu probiotykoterapii na odczuwanie objawów ze strony przewodu pokarmowego według kryteriów ROME-IV;
- e) ocenę wpływu probiotykoterapii na subiektywną jakość snu za pomocą kwestionariusza PSQI;
- f) ocenę wpływu probiotykoterapii na próg odczuwanego bólu mierzonego algometrycznie, poziom zmęczenia mierzonego za pomocą FAS oraz strategie radzenia sobie ze stresem oceniane kwestionariuszem Mini-COPE.

### *Hipotezy badawcze*

Założono, że suplementacja probiotykiem *Lactobacillus helveticus* R0052 oraz *Bifidobacterium longum* R0175 może wpływać na wskaźniki układu endokannabinoidowego, mikrobiotę i metabolom jelitowy oraz stan psychofizyczny tancerek poddawanych wysiłkowi fizycznemu i psychicznemu poprzez modulację osi jelitowo-mózgowej oraz odpowiedzi zapalnej.

Szczegółowe hipotezy badawcze:

1. Poziomy AEA i LPS będą ze sobą związane. Wyższe stężenia LPS, jako wskaźnika translokacji bakteryjnej i stanu zapalnego, będą towarzyszyły zwiększonemu poziomowi AEA, co może odzwierciedlać kompensacyjną aktywację ECS w odpowiedzi na endotoksemię.
2. Suplementacja probiotykiem wpłynie na obniżenie poziomu LPS poprzez poprawę integralności bariery jelitowej. Spodziewana redukcja poziomu LPS będzie się wiązała ze zmianą poziomu AEA, jednocześnie modulując ekspresję receptora CB2 bez istotnych zmian aktywności enzymu FAAH.
3. Podawanie probiotyku zmniejszy poziom cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), przy jednoczesnym wzroście stężenia cytokiny przeciwzapalnej IL-10, co odzwierciedlać będzie zmniejszenie ogólnoustrojowego stanu zapalnego wywołanego wysiłkiem i stresem.
4. Suplementacja probiotyczna wpłynie na skład mikrobioty jelitowej, zmieniając profil metabolitów bakteryjnych w próbkach kału.

5. Suplementacja probiotykiem wpłynie na zmniejszenie objawów gastroenterologicznych, takich jak bóle brzucha, biegunki czy zaparcia.
6. Probiotykoterapia korzystnie wpłynie na subiektywną jakość snu u tancerek, objawiając się np. skróceniem latencji snu, zmniejszeniem liczby przebudzeń oraz ogólną poprawą samopoczucia związanego ze snem.
7. Interwencja probiotyczna spowoduje wzrost progu odczuwanego bólu ocenianego za pomocą pomiarów algometrycznych, co może być pośrednim efektem modulacji osi jelitowo-mózgowej oraz układu endokannabinoidowego. Wpłynie także na obniżenie subiektywnego poziomu zmęczenia oraz poprawę strategii radzenia sobie ze stresem, przejawiających się zwiększeniem aktywnych strategii radzenia sobie oraz redukcją strategii unikania i biernego reagowania na stres.

### 3. CYKL PUBLIKACJI

Przedłożona dysertacja doktorska to cykl trzech monotematycznych prac pod wspólnym tytułem *Ocena neuro- i immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerek.*

1. Wiącek J., Podgórski T., Kusy K., Łoniewski I., Skonieczna-Żydecka K., Karolkiewicz J. (2024) Evaluating the Impact of Probiotic Therapy on the Endocannabinoid System, Pain, Sleep and Fatigue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Dancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 25 (11), 5611. <https://doi.org/10.3390/ijms25115611>  
punktacja MEiN: 140; Impact Factor: 4,9; Impact Factor 5-letni: 5,7
2. Wiącek J., Skonieczna-Żydecka K., Łoniewski I., Deli C.K., Fatouros I.G., Jamurtas A.Z., Moszczyńska D., Karolkiewicz J. (2025) *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 Supplementation: An Exploratory, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Endocannabinoid and Inflammatory Responses in Female Dancers. *Microorganisms*, 13 (6), 1284. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13061284>  
punktacja MEiN: 40; Impact Factor: 4,2; Impact Factor 5-letni: 4,6
3. Wiącek J., Skonieczna-Żydecka K., Łoniewski I., Styburski D., Kaczmarczyk M., Karolkiewicz J. (2025) A Randomized Controlled Trial Evaluating the Effects of a Probiotic Containing *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 on Gastrointestinal Symptoms and Metabolomic Profiles in Female Dancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 26 (12), 5823. <https://doi.org/10.3390/ijms26125823>  
punktacja MEiN: 140; Impact Factor: 4,9; Impact Factor 5-letni: 5,7

Łącznie: punktacja MEiN: 320; Impact Factor: 14; Impact Factor 5-letni: 16

## 4. MATERIAŁ I METODY

### 4.1. Charakterystyka badanej grupy

Do badania zgłosiła się grupa 51 tancerek, z których następnie wyłoniono uczestniczki spełniające kryteria włączenia, w wieku 18–36 lat, trenujące powyżej 8 godzin tygodniowo. Aż 25 osób nie spełniło kryteriów włączenia i zostało wykluczonych przed losowaniem do badania. Do powodów formalnych wykluczenia należały m.in.: niedawne urazy, choroby przewlekłe, przyjmowanie probiotyków, prebiotyków lub synbiotyków, hospitalizacja, podróż do stref tropikalnych, stosowanie antybiotyków, produktów konopnych bądź leków sterydowych w ciągu ostatnich 3 miesięcy.

Jednym z istotnych problemów, które wydłużyły czas realizacji badań, była konieczność zmiany pierwotnie zakładanej grupy uczestników z żołnierzy na zawodowe tancerki, co wynikało z ograniczeń pandemicznych związanych z COVID-19 oraz brakiem dostępu do wcześniej zadeklarowanych jednostek szkoleniowych. W odniesieniu do żołnierzy głównym założeniem badawczym było wykorzystanie wspólnego zakwaterowania, zbliżonego schematu ćwiczeń i ujednoliconej diety jako czynników umożliwiających precyzyjne rozdzielanie grup interwencyjnych, tancerki natomiast zostały wybrane alternatywnie ze względu na ich wysoką aktywność fizyczną, narażenie na stres psychiczny oraz częstsze występowanie zaburzeń odżywiania w tej populacji.

Ostatecznie 26 tancerek zakwalifikowano do udziału w badaniu zgodnie z przyjętymi kryteriami. Spośród nich 6 wycofało się na początku projektu: 3 nie podały żadnej przyczyny, a kolejne 3 nie zgłosiły się w ustalonych terminach na pobranie próbek lub po odbiór suplementu/placebo. W efekcie na pierwsze zaplanowane pobrania krwi i kału stawiało się tylko 20 z 26 zakwalifikowanych tancerek. Rezygnacje te wynikały prawdopodobnie z napiętego grafiku i trudności logistycznych (opisanych niżej), choć część osób nie podała wytłumaczenia swojej nieobecności. Z grupy 20 uczestniczek 3 nie zrealizowały pełnego protokołu 12-tygodniowej suplementacji. Osoby te wprawdzie poddały się badaniom wstępnym (ich krew i kał oddano do analiz), jednak nie rozpoczęły suplementacji probiotykiem i nie zgłosiły się po odbiór preparatu. Nie poznano powodów rezygnacji z udziału w badaniu tych uczestniczek. Ostatecznie pełny protokół (od początku do końca interwencji) ukończyło 17 tancerek. Żadna z nich nie przerwała udziału z powodu działań niepożądanych i nie odnotowano efektów ubocznych suplementacji, co potwierdziło dobrą tolerancję preparatu.

Część danych dotyczących grupy 17 kobiet, które dotrwały do końca badania, musiano wykluczyć na etapie analizy wyników w celu zapewnienia rzetelności. Dane jednej uczestniczki zostały wyłączone z analiz ze względu na jej wyższy wskaźnik masy ciała (BMI) niż pozostałych, co mogło zaburzać homogeniczność próby. Dane innej uczestniczki odrzucono jako odstające w publikacjach dotyczących analizy wskaźników biochemicznych z krwi – wartości wybranych markerów (np. stężenie AEA) odbiegały ponaddwukrotnie od wartości reszty grupy. Ostatecznie do analiz statystycznych oznaczeń z surowicy krwi – markerów układu endokannabinoidowego oraz markerów stanu zapalnego – włączono 15 tancerek (10 w grupie placebo, 5 w grupie z probiotykiem). Niecelowana analiza metabolomu z próbek kału objęła 16 uczestniczek. Wykluczono jedynie osobę ze skrajnym BMI, natomiast pozostałe uczestniczki dostarczyły pełne i prawidłowe próbki.

Rozkład uczestniczek między grupami wyniósł w tym przypadku 11 w grupie placebo i 5 w grupie probiotyku, co przedstawiono na rycinie 1.



BMI - wskaźnik masy ciała, AEA - anandamid (N-arachidonoiloetanoloamina)

**Rycina 1.** Schemat procesu rekrutacyjnego w badaniach

Źródło: opracowanie własne.

Rekrutacja i utrzymanie uczestnictwa tancerek okazały się dużym wyzwaniem z uwagi na specyfikę ich trybu życia i harmonogramów pracy. Zajęcia, intensywne treningi fizyczne, próby choreograficzne, często od rana do wieczora (8:00–20:00), czy wieczorne występy skutkowały późnymi porami snu, co utrudniało stawianie się na czczo we wczesnych godzinach porannych na pobranie krwi. Koordynacja pobierania i dostarczania próbek kału do laboratorium w określonym czasie również nastroczała trudności. Ponadto należało utrzymać względnie stałe nawyki żywieniowe przez 3 miesiące trwania eksperymentu, co wobec zmiennego obciążenia treningami i występami dla niektórych osób nie było łatwe do kontrolowania. Do badania zgłosiło się zaledwie 2 mężczyzn, więc doboru próby dokonano wyłącznie wśród kobiet. Niewprowadzanie pojedynczych danych od

mężczyzn mogłoby zakłócić wyniki, ponieważ obserwuje się różnice płciowe pod względem działania mikrobioty jelitowej. W praktyce tylko studentki Akademii Wychowania Fizycznego (kierunku taniec) zdołały sprostać wymogom udziału i wygospodarować czas na procedury badawcze. Próby rekrutowania tancerek spoza Akademii Wychowania Fizycznego (np. prywatnych szkół tańca czy publicznych teatrów) okazały się bezskuteczne, gdyż kobiety nie były w stanie pogodzić udziału w badaniu z obowiązkami zawodowymi lub zniechęcała je perspektywa licznych pobrań krwi i kału oraz rygor protokołu badania. Wszystkie te czynniki sprawiły, że zaplanowana liczebność próby nie została w pełni osiągnięta, a rekrutacja musiała zostać zamknięta z taką liczbą uczestniczek, jaka była dostępna i zdolna dotrwać do końca projektu.

Przeprowadzono eksploracyjne badanie interwencyjne w układzie randomizowanym, podwójnie zaślepionym, kontrolowanym placebo (RCT). Uczestniczki przydzielono losowo (blokowa randomizacja o wielkości bloków 4, przeprowadzona przez producenta preparatu) do grupy probiotyku lub placebo. Zarówno badane, jak i personel badawczy nie znali przydziału (zaślepienie podwójne). Interwencja polegała na 12-tygodniowej suplementacji probiotykiem zawierającym dwa szczepy: *Lactobacillus helveticus* R0052 (Rosell-52, CNCM I-1722) oraz *Bifidobacterium longum* R0175 (Rosell-17, CNCM I-3470), komercyjnie dostępnym jako preparat Sanprobi Stress (Sanprobi, Polska). Dawka wynosiła  $3 \times 10^9$  jednostek tworzących kolonie (CFU) w kapsułce przyjmowanej raz dziennie rano. Grupie kontrolnej podawano kapsułki placebo identyczne w wyglądzie (masa i kształt), zawierające obojętny nośnik (maltodekstrynę i skrobię kukurydzianą). Suplementację prowadzono od marca do czerwca, w czasie pełnych 12 tygodni treningów tanecznych w semestrze akademickim. Uczestniczki były monitorowane pod kątem przestrzegania protokołu – każda prowadziła dziennik przyjmowania kapsułek oraz zwracała niewykorzystane dawki podczas wizyt kontrolnych. Obie grupy poinformowano, by w trakcie trwania eksperymentu nie zmieniać nawyków żywieniowych ani treningowych. Uczestniczki miały utrzymywać swój zwyczajowy plan dietetyczno-treningowy, zgłaszać ewentualne odstępstwa (np. zmianę diety, nowe dolegliwości czy przyjmowanie leków) oraz powstrzymać się od intensywnych ćwiczeń na 2–3 dni przed badaniami kontrolnymi. Na tej podstawie potwierdzono pełne przyleganie do zastosowanej interwencji (wszystkie uczestniczki objęte analizą zażyły komplet przewidzianych 84 dawek preparatu).

## 4.2. Opis zastosowanych metod badawczych

Tydzień przed rozpoczęciem interwencji u uczestniczek zmierzono podstawowe parametry antropometryczne: masę ciała (kg), wysokość ciała z obliczeniem BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), a także skład ciała, w tym procentową zawartość tkanki tłuszczowej oraz masy mięśniowej i beztłuszczowej za pomocą bioelektrycznej analizy impedancji (BIA). Pomiaru te wykonano w spoczynku. Stanowiły one punkt odniesienia (pomiar wyjściowy) do ujednoczenia badanej grupy i wykluczenia czynników potencjalnie zaburzających wyniki.

W celu oceny stanu krwi obwodowej wykonano analizę morfologiczną krwi. Badanie przeprowadzono bezpośrednio po pobraniu krwi (na czczo, w godzinach porannych, dzień przed rozpoczęciem oraz dzień po zakończeniu 12-tygodniowej interwencji). Liczbę leukocytów (WBC) oraz limfocytów (LYM) oznaczono metodą cytometrii przepływowej na analizatorze Synergy 2 SIAFRT (BioTek, Winooski, VT, USA). Pozwoliło to wykluczyć ewentualne nieprawidłowości (np. infekcje) mogące wpływać na wyniki badanych markerów oraz ocenić ogólny status immunologiczny uczestniczek. Dane hematologiczne wykorzystano także jako jeden ze wskaźników stanu odżywienia i zdrowia badanych.

Wszystkie uczestniczki były czynnymi tancerkami zawodowymi lub studentkami tańca, spełniającymi kryterium odbywania co najmniej 8 godzin treningu tanecznego tygodniowo. Informacje o poziomie aktywności fizycznej zebrano na podstawie deklaracji uczestniczek. Dane te posłużyły do scharakteryzowania badanej populacji i upewnienia się, że grupy nie różniły się pod względem obciążeń treningowych, co mogłoby wpływać na badane wskaźniki. Uzupełniająco oceniono siłę mięśniową dłoni. Pomiaru dokonano za pomocą dynamometru ręcznego, według standardowej procedury: badana osoba stała w pozycji wyprostowanej, z ręką wzdłuż tułowia i dłonią zwróconą do uda. Każdą dłoń badano trzykrotnie, a za wynik przyjmowano średnią z trzech pomiarów maksymalnej siły chwytu (wyrażonej w kg). Dodatkowo oceniono próg bólu mechanicznego metodą algometrii uciskowej: przyłożono algometr do mięśnia zginacza kciuka, a próg bólu (wyrażany w kg) wyznaczono jako średnią z trzech kolejnych pomiarów nacisku, przy którym osoba badana zgłaszała ból.

Ocena sposobu żywienia została przeprowadzona za pomocą dzienniczek dietetycznych. Uczestniczki prowadziły dzienniczek żywieniowy przez 3 kolejne dni (typowo 2 dni robocze i 1 dzień weekendowy) poprzedzające rozpoczęcie badania. Dane zostały następnie przeanalizowane przy użyciu oprogramowania NUVERO w celu wyliczenia średniego dziennego pobrania energii (liczba kcal) oraz makroskładników (białka, tłuszcze, węglowodany w gramach). Analizie poddano także zawartość błonnika pokarmowego oraz cholesterolu w diecie, gdyż składniki te mogą modulować zarówno mikrobiotę jelitową (błonnik zwiększa produkcję SCFA), jak i układ endokannabinoidowy (produkty bogate w cholesterol dostarczają kwas arachidonowy, czyli prekursor anandamidu). Oprócz analizy ilościowej diety przeprowadzono ocenę jakościową wzorca żywienia. Zastosowano 14-elementowy kwestionariusz przestrzegania założeń diety śródziemnomorskiej MDAT, oceniający stopień przestrzegania diety śródziemnomorskiej bogatej w warzywa, owoce, rośliny strączkowe, pełnoziarniste produkty zbożowe, ryby i oliwę z oliwek, a ograniczającej produkty wysokoprzetworzone, cukry i tłuszcze trans. MDAT został przeprowadzony w formie wywiadu z uczestniczkami, zebrane dzienniczki żywieniowe były natomiast weryfikowane wspólnie z badanymi w celu zwiększenia rzetelności danych. Nie stwierdzono istotnych różnic w spożyciu energii ani głównych składników odżywczych między grupą probiotyku a grupą placebo.

Do oceny poziomów wskaźników układu endokannabinoidowego oraz stanu zapalnego pobrano próbki krwi żyłnej (10 ml) od każdej uczestniczki na czczo, w godzinach porannych, bezpośrednio przed rozpoczęciem suplementacji probiotykiem/placebo oraz po 12 tygodniach interwencji. Po odpoczynku próbki zostały odwirowane, a uzyskane surowice zamrożono aż do momentu analizy. Stężenia wybranych biomarkerów w surowicy oznaczono metodą testów immunoenzymatycznych ELISA w układzie podwójnych przeciwciał (*sandwich* ELISA). W publikacji 1 opisano poziomy CB2 oraz FAAH. Do ich oznaczenia wykorzystano zestawy ELISA (SunRed Biotechnology, Szanghaj, Chiny) o czułości ok. 0,285 ng/ml dla CB2 (zakres detekcji 0,3–90 ng/ml) oraz 0,116 ng/ml dla FAAH (zakres 0,15–30 ng/ml). W publikacji 2 opisano stężenia AEA oraz LPS. Również w tym przypadku użyto zestawów ELISA; czułość testu dla AEA wynosiła ok. 7,125 ng/ml (zakres pomiarowy 8–2000 ng/ml), a dla LPS ok. 10,725 jednostek endotoksynowych EU/l (zakres 12–4000 EU/l). Dla oceny odpowiedzi zapalnej oznaczono także cytokiny prozapalne TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  oraz cytokinę przeciwzapalną IL-10 w surowicy z czułością na poziomach odpowiednio ok. 2,827 ng/ml dla TNF- $\alpha$ , 15,013 pg/ml dla IL-1 $\beta$  i 9,012 pg/ml dla IL-10 oraz zakresami pomiarowymi dostosowanymi do fizjologicznych stężeń, odpowiednio: TNF- $\alpha$ : 3–900 ng/ml, IL-1 $\beta$ : 20–8000 pg/ml, IL-10: 10–3000 pg/ml. Wszystkie pomiary wykonywano zgodnie z protokołami producenta zestawów, przy czym każdy test zawie-

rał próby kontrolne. Producent deklarował precyzję oznaczeń CV *intra-assay* na poziomie <10%, a *inter-assay* <12%, zatem niewielkie wahania stężeń mogły mieścić się w granicach błędu metody.

W ostatnim z badań cyklu dokonano zaawansowanej niecelowanej analizy metabolomicznej w celu oceny wpływu probiotyku na profil metabolitów jelitowych. Analizowano próbki kału uczestniczek (pobrane samodzielnie przez badane, ~10–30 g, zabezpieczone i przechowywane w domowych zamrażarkach w temp. –18°C, a następnie –80°C do czasu badania). Zastosowano podejście metabolomiki niekierowanej (*untargeted*) oparte na chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC–MS). Analizy chromatograficzno-masowe przeprowadzono na układzie UHPLC Sciex ExionLC połączonym z wysokorozdzielczym spektrometrem mas TripleTOF 6600+ (Sciex, USA). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie Phenomenex Luna® Omega Polar C18 (1,6 µm, 150 × 2,1 mm) w gradiencie faz mobilnych przez 45 minut. Widma mas zbierano w szerokim zakresie m/z 50–850 z wykorzystaniem trybu SWATH-MS (Sequential Window Acquisition of All Theoretical Mass Spectra), który umożliwia jednoczesne zbieranie danych MS/MS dla wielu przedziałów m/z. Identyfikacja metabolitów opierała się na analizie uzyskanych widm fragmentacyjnych w porównaniu z wzorcowymi danymi z baz referencyjnych. Wykorzystano oprogramowanie Sciex OS (v.3.3.1) z zintegrowaną biblioteką wysokorozdzielczych widm MS/MS (Sciex All-In-One) oraz komercyjną bazą NIST, uzupełnionymi o własną bazę laboratorium Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Identyfikację potwierdzano na podstawie zgodności jonów macierzystych i ich fragmentów (analiza spektrometrii tandemowej) z tolerancją błędów masowego ok. 2 ppm.

W ramach cyklu badawczego wykorzystano standaryzowane kwestionariusze do oceny wybranych aspektów funkcjonalnych i psychospołecznych uczestników. Dzięki wykorzystaniu tych narzędzi uzyskano wielowymiarową ocenę stanu tancerek, obejmującą zarówno obiektywne wskaźniki fizjologiczne, jak i subiektywne odczucia, co umożliwiło całościową analizę wpływu suplementacji probiotykiem.

Pittsburski Indeks Jakości Snu (PSQI) posłużył do oceny subiektywnej jakości snu. Kwestionariusz ten mierzy jakość i wzorce snu z ostatniego miesiąca (obejmuje m.in. komponenty takie, jak latencja snu, czas trwania snu, efektywność snu, zaburzenia snu). Łączny PSQI jest wyrażony w punktach (0–21) – niższy wynik oznacza lepszą jakość snu, a wyższy gorszą.

Skalę Oceny Zmęczenia (FAS) zastosowano w celu ilościowej oceny zmęczenia odczuwanego przez uczestniczki. FAS składa się z szeregu stwierdzeń dotyczących objawów zmęczenia fizycznego i psychicznego; odpowiedzi są sumowane i dają wynik od 0 do 32 punktów – wyższy wynik wskazuje na większe nasilenie zmęczenia. Pomiar zmęczenia FAS pozwoliły określić, czy suplementacja probiotykiem wpłynęła na subiektywne odczucie zmęczenia w porównaniu z placebo.

Do oceny strategii radzenia sobie ze stresem zastosowano kwestionariusz Mini-COPE, będący polską adaptacją skróconej wersji testu COPE. Narzędzie to zawiera 28 pytań dotyczących typowych reakcji i zachowań w sytuacjach stresowych, na które badani odpowiadali w skali od 0 („prawie nigdy”) do 3 („prawie zawsze”). Mini-COPE pozwala wyróżnić 14 strategii radzenia sobie ze stresem, pogrupowanych w trzy główne style: aktywne radzenie sobie, unikanie (behawioralne i psychiczne) oraz poszukiwanie wsparcia emocjonalnego, przy czym maksymalne możliwe sumy punktów dla tych stylów wynoszą odpowiednio 18, 30 i 36 punktów. Uzyskane wyniki Mini-COPE posłużyły do porównania, czy 12-tygodniowa suplementacja wpłynęła na zmianę dominujących strategii radzenia sobie (np. czy zmniejszyła skłonność do zachowań unikowych).

Objawy ze strony przewodu pokarmowego oceniono za pomocą ankiety opartej na kryteriach Rome IV dla zaburzeń czynnościowych jelit. Kwestionariusz ten zawierał pytania dotyczące częstości i nasilenia dolegliwości jelitowych typowych dla zespołu jelita nadwrażliwego, m.in. częstotliwości bólów brzucha, dyskomfortu po posiłkach (uczucie pełności), epizodów biegunki i zaparć. Pozyskane odpowiedzi pozwoliły ocenić, czy probiotyk wpłynął na subiektywne samopoczucie w zakresie funkcjonowania układu pokarmowego tancerek w porównaniu z placebo (jednak w badaniu nie odnotowano istotnej poprawy tych objawów).

### 4.3. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wyników biochemicznych oraz pozostałych testów i kwestionariuszy przeprowadzono w programie Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., USA). Na etapie wstępnym oceniono rozkład zmiennych z wykorzystaniem testu Shapiro–Wilka, co umożliwiło wybór właściwych procedur statystycznych. Porównania wartości początkowych między grupą probiotyczną a grupą placebo wykonywano przy użyciu testu t-Studenta dla prób niezależnych, natomiast w przypadku naruszenia założeń normalności rozkładu alternatywnie za pomocą testu Manna–Whitneya U.

Do oceny zmian w czasie w ramach poszczególnych grup (przed suplementacją i po niej) zastosowano test t-Studenta dla prób zależnych lub – gdy rozkład odbiegał od normalnego – test Wilcozona. Ponadto przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji dla pomiarów powtarzanych (ANOVA), która pozwalała ocenić efekty głównego czasu (przed vs po) i grupy (probiotyk vs placebo), a także ich interakcję. Wielkość efektów wyrażano w postaci  $\eta^2$ . W przypadku wykrycia istotnych efektów głównych lub interakcji stosowano testy *post-hoc* z korektą Bonferroniego w celu kontroli błędu pierwszego rodzaju wynikającego z wielokrotnych porównań.

Dodatkowo przeanalizowano powiązania korelacyjne pomiędzy wybranymi parametrami, tj. stężeniami AEA i LPS, wykorzystując współczynniki korelacji Pearsona (dla rozkładów normalnych) lub Spearmana (dla rozkładów nienormalnych). We wszystkich analizach przyjęto poziom istotności  $p < 0,05$ .

Opracowanie danych metabolomicznych obejmowało wstępne przetwarzanie. Dane poddano filtracji i usuwano sygnały o niskiej stabilności (współczynnik zmienności między próbkami QC > 25%) oraz odstające skrajne wartości (poza 5. percentylem i 95. percentylem), aby wyeliminować szum i artefakty pomiarowe. Następnie dane logarytmowano ( $\log_{10}$ ). Do analiz wykorzystano pakiet MetaboAnalystR 4.0 (Xia Lab, McGill University). W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA) w celu wizualizacji ogólnych wzorców zmian w metabolomie oraz oceny ewentualnych odchyłeń jakości danych. Następnie zastosowano analizę jednoczesną składowych ANOVA (ASCA), która łączy analizę wariancji z analizą czynnikową, aby wyodrębnić wpływ czynnika grupy (probiotyk vs placebo) i czasu (przed vs po suplementacji) na profil metabolomiczny. Istotność efektów w ASCA weryfikowano testem permutacyjnym (1000 permutacji). Dla poszczególnych metabolitów przeanalizowano zmiany w układzie podłużnym (*before–after*) za pomocą modeli mieszanych dla danych powtarzanych, z uwzględnieniem interakcji czynnikowej (grupa  $\times$  czas). Estymację prowadzono metodą najwiarygodniejszych estymatorów z korekcją Kenwarda–Rogera dla liczby stopni swobody. Równocześnie dokonano porównań między grupami na poszczególnych punktach czasowych (przed interwencją i po niej) w celu wyłonienia metabolitów różniących się istotnie między grupą probiotyczną a placebo. Wykorzystano do tego testy t-Studenta dla każdej zmiennej z osobna,

a otrzymane wartości p skorygowano o kontrolę wielokrotnych porównań metodą FDR Benjaminiego–Hochberga. W interpretacji wyników istotnych statystycznie uwzględniano także wielkość efektu. Ze względu na eksploracyjny charakter badania metabolomicznego uzyskane wyniki traktowano jako wstępne, do dalszej weryfikacji, nie zaś ostateczne dowody.

### **4.3. Zgody etyczne**

Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z Deklaracją helsińską i zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr 412/22, wcześniej 494/21) z 19 maja 2022 r. Uczestnicy wyrazili świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu przed rozpoczęciem interwencji, mogli zrezygnować w dowolnym momencie bez podawania przyczyny. Protokół został zarejestrowany w bazie [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) pod numerem NCT05567653. Badania realizowano na podstawie wytycznych do raportowania badań klinicznych CONSORT 2010; nie wprowadzono zmian do protokołu w trakcie jego trwania.

## 5. WYNIKI BADAŃ

### 5.1. Charakterystyka grupy

W badaniu wstępnym przed rozpoczęciem interwencji nie stwierdzono istotnych różnic między grupą probiotyczną (PRO) a grupą placebo (PLA) w żadnym z analizowanych wskaźników (tabela 1). Analizą objęto wyłącznie uczestniczki płci żeńskiej. Średnia masa ciała w PRO wyniosła  $60,10 \pm 7,31$  kg, a w PLA  $58,07 \pm 6,95$  kg ( $p = 0,99$ ); BMI, odpowiednio,  $20,80 \pm 2,29$  vs  $21,05 \pm 2,18$  kg/m<sup>2</sup> ( $p = 0,93$ ); zawartość tkanki tłuszczowej  $27 \pm 3\%$  w obu grupach ( $p = 0,84$ ). Aktywność fizyczna wyrażana w godzinach treningu na tydzień wyniosła w PRO  $16,00 \pm 9,77$  h/tydz., a w PLA  $17,11 \pm 6,98$  h/tydz. ( $p = 0,69$ ). Wskaźniki hematologiczne również były zbliżone: WBC  $5,94 \pm 1,17$  w PRO vs  $5,54 \pm 0,84$  w PLA ( $p = 0,50$ ) oraz LYM  $2,60 \pm 0,46$  vs  $2,34 \pm 0,79$  ( $p = 0,41$ ). W zakresie spożycia energii i składników odżywczych nie odnotowano różnic istotnych statystycznie. Spożycie energii wyniosło  $2325 \pm 425$  kcal w PRO vs  $1999 \pm 279$  kcal w PLA ( $p = 0,26$ ), białka –  $100 \pm 21$  g vs  $85 \pm 30$  g ( $p = 0,51$ ), tłuszczu –  $90 \pm 18$  g vs  $74 \pm 14$  g ( $p = 0,41$ ), węglowodanów –  $299 \pm 58$  g vs  $271 \pm 53$  g ( $p = 0,75$ ), błonnika –  $21 \pm 13$  g vs  $29 \pm 15$  g ( $p = 0,91$ ), a cholesterolu –  $330 \pm 141$  mg vs  $217 \pm 104$  mg ( $p = 0,40$ ). Wynik testu oceniającego przyleganie do diety śródziemnomorskiej wyniósł  $6,20 \pm 2,49$  w PRO i  $5,46 \pm 1,86$  w PLA ( $p = 0,42$ ). Siła chwytu osiągnęła średnio  $26,16 \pm 5,33$  kg w PRO i  $28,13 \pm 4,67$  kg w PLA ( $p = 0,73$ ). Grupy na etapie początkowym można uznać za jednorodne pod względem parametrów antropometrycznych, hematologicznych, dietetycznych oraz poziomu aktywności fizycznej.

**Tabela 1.** Wyniki pomiarów antropometrycznych i dietetycznych uczestniczek (na podstawie danych z publikacji 1–3)

Wskaźniki antropometryczne i dietetyczne	Placebo (n = 11) Średnia $\pm$ SD	Probiotyk (n = 5) Średnia $\pm$ SD	Wartość p*
Charakterystyka antropometryczna			
Wiek [lata]	20,55 $\pm$ 1,04	20,00 $\pm$ 1,30	0,55 <sup>b</sup>
Masa ciała [kg]	58,07 $\pm$ 6,95	60,10 $\pm$ 7,31	0,99 <sup>a</sup>
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	21,05 $\pm$ 2,18	20,80 $\pm$ 2,29	0,93 <sup>a</sup>
Tkanka tłuszczowa [% masy ciała]	27 $\pm$ 4	27 $\pm$ 3	0,84 <sup>a</sup>
Poziom aktywności fizycznej [godziny na tydzień]	17,11 $\pm$ 6,98	16,00 $\pm$ 9,77	0,69 <sup>b</sup>
Siła chwytu [kg]	28,13 $\pm$ 4,67	26,16 $\pm$ 5,33	0,73 <sup>a</sup>
Kompozycja diety			
Energia [kcal]	1999,23 $\pm$ 279,81	2325,54 $\pm$ 425,00	0,26 <sup>a</sup>
Białko [g]	85,29 $\pm$ 30,13	100,47 $\pm$ 21,09	0,51 <sup>a</sup>
Tłuszcz [g]	74,56 $\pm$ 13,93	90,47 $\pm$ 18,72	0,41 <sup>a</sup>
Cholesterol [mg]	216,73 $\pm$ 104,36	330,21 $\pm$ 140,77	0,40 <sup>a</sup>
Węglowodany [g]	271,12 $\pm$ 53,14	298,79 $\pm$ 57,98	0,75 <sup>a</sup>

Cukier [% węglowodanów]	10,27 ±3,89	6,75 ±2,81	0,09 <sup>a</sup>
Błonnik [g]	28,96 ±15,13	21,36 ±12,67	0,91 <sup>b</sup>
Przestrzeganie diety śródziemnomorskiej [0-14]	5,46 ±1,86	6,20 ±2,49	0,42 <sup>a</sup>
Owoce [porcje 150-200 g na dzień]	1,64 ±0,67	1,60 ±0,55	1,00 <sup>b</sup>
Warzywa [porcje 200 g na dzień]	2,36 ±0,92	3,20 ±0,84	0,10 <sup>b</sup>
Strączki [porcje 150 g na dzień]	1,55 ±1,51	2,40 ±2,51	0,60 <sup>b</sup>
Orzechy [porcje 30 g na dzień]	2,46 ±1,44	3,00 ±1,23	0,56 <sup>b</sup>
Wskaźniki hematologiczne			
Leukocyty (WBC) [ $\times 10^9/l$ ]	5,54 ±0,84	5,94 ±1,17	0,50 <sup>a</sup>
Limfocyty [ $\times 10^9/l$ ]	2,34 ±0,79	2,60 ±0,46	0,41 <sup>a</sup>

\* prawdopodobieństwo przy założeniu hipotezy zerowej, obliczone za pomocą testu t lub testu U Manna-Whitneya w przypadku braku założenia normalności rozkładu

<sup>a</sup> test t; <sup>b</sup> test U Manna-Whitneya

## 5.2. Wskaźniki biochemiczne z krwi (publikacje 1 i 2)

W analizie wskaźników biochemicznych przeprowadzonej przed rozpoczęciem interwencji nie wykazano istotnych różnic między PRO a PLA w żadnym z ocenianych wskaźników, co potwierdza ich początkową porównywalność (tabela 2). Średnie stężenie LPS wyniosło 505,05 ±170,77 EU/l w PRO i 579,36 ±118,50 EU/l w PLA ( $p = 0,34$ ), natomiast poziom AEA osiągnął 253,99 ±68,01 ng/ml w PRO i 292,59 ± 70,98 ng/ml w PLA ( $p = 0,33$ ). Wartości receptora kannabinoidowego CB2 były silnie zróżnicowane wewnątrz PRO (0,86 ±1,21 ng/ml;  $p < 0,01$ ), jednak bez istotnej różnicy względem PLA (0,55 ±0,32 ng/ml;  $p = 0,95$ ). W zakresie stężenia FAAH średnie poziomy wyniosły odpowiednio 6,46 ±0,68 ng/ml w PRO i 5,93 ±1,15 ng/ml w PLA ( $p = 0,28$ ). W odniesieniu do cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych również nie odnotowano statystycznie istotnych różnic, stężenia TNF- $\alpha$  wynosiły 87,52 ±24,40 pg/ml vs 105,89 ±22,23 pg/ml ( $p = 0,17$ ), IL-1 $\beta$  – 1300,42 ±298,48 pg/ml vs 1475,79 ±333,89 pg/ml ( $p = 0,34$ ), IL-10 – 490,03b ±110,89 pg/ml vs 515,46 ±96,86 pg/ml ( $p = 0,65$ ).

**Tabela 2.** Porównanie poziomów wskaźników biochemicznych z surowicy między grupami na początku badania (na podstawie danych z publikacji 1 i 2)

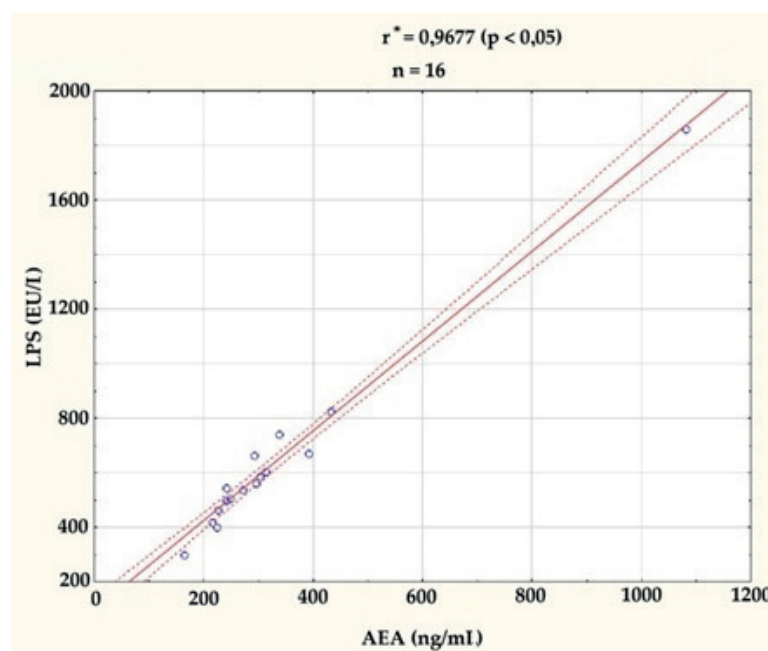
Wskaźnik	Probiotyki (n = 5)		Placebo (n = 10)		p testu t-Studenta
	Średnia ±SD (min-max)	p Shapiro-Wilka	Średnia ±SD (min-max)	p Shapiro-Wilka	
LPS [EU/l*]	505,05 ±170,77 (299,35-742,17)	0,9796	579,36 ±118,50 (416,63-826,21)	0,6987	0,3391
AEA [ng/ml]	253,99 ±68,01 (164,05-337,67)	0,8996	292,59 ±70,98 (214,40-432,66)	0,1966	0,3329
CB2 [ng/ml]	0,8642 ±1,21 (0,12-4,01)	0,0004	0,55 ±0,32 (0,20-0,90)	0,3923	0,9512*
FAAH [ng/ml]	6,46 ±0,68 (4,91-7,19)	0,9661	5,93 ±1,15 (4,49-7,61)	0,1703	0,2806
TNF- $\alpha$ [pg/ml]	87,52 ±24,40 (56,75-117,74)	0,9029	105,89 ±22,23 (72,16-139,53)	0,8120	0,1671

IL-1 $\beta$ [pg/ml]	1300,42 $\pm$ 298,48 (982,44–1689,51)	0,4774	1475,79 $\pm$ 333,89 (940,79–2090,87)	0,9272	0,3402
IL-10 [pg/ml]	490,03 $\pm$ 110,89 (393,35–679,28)	0,1302	515,46 $\pm$ 96,86 (397,89–709,14)	0,6118	0,6546

AEA – anandamid (N-arachidonoiloetanoloamina), CB2 – receptor kannabinoidowy typu 2, FAAH – hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych, IL-1 $\beta$  – interleukina 1 beta, IL-10 – interleukina 10, LPS – lipopolisacharyd, EU – jednostki endotoksynowe, TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworów alfa

\* test U Manna-Whitneya

Zgodnie z przewidywaniami, wynikającymi z przeglądu literatury, stwierdzono istotną korelację pomiędzy poziomami AEA i LPS ( $r = 0,9677$ ;  $p < 0,05$ ), ocenioną przy użyciu współczynnika korelacji rang Spearmana. Zależność tę przedstawiono na rycinie 2. Wyraźnie odstający punkt został wykluczony z dalszych analiz.



AEA – anandamid (N-arachidonoiloetanoloamina), LPS – lipopolisacharyd, EU – jednostki endotoksynowe

\*  $r$  – współczynnik korelacji Spearmana

**Rycina 2.** Analiza korelacji pomiędzy głównymi wskaźnikami biochemicznymi z krwi w badaniu ( $n = 16$ )

Źródło: opracowanie własne (publikacja 2).

W końcowej analizie porównawczej wewnątrzgrupowej nie odnotowano istotnych statystycznie różnic dla żadnego z badanych parametrów w PRO ani PLA (tabela 3). W PRO średnie zmiany (delta) poziomów markerów zapalnych i składników układu endokannabinoidowego były minimalne, m.in. wzrost TNF- $\alpha$  o 10,28 pg/ml ( $p = 0,1320$ ), spadek AEA o 1,11 ng/ml ( $p = 0,9538$ ) oraz niewielki wzrost FAAH (0,09 ng/ml;  $p = 0,2253$ ). Również zmiany w poziomie LPS (3,48 EU/l;  $p = 0,9361$ ) i CB2 (-0,26 ng/ml;  $p = 0,1439$ ) nie były statystycznie istotne. W PLA zaobserwowano większą, choć również nieistotną tendencję wzrostową poziomu LPS (56,98 EU/l;  $p = 0,0694$ ) i IL-1 $\beta$  (104,61 pg/ml;  $p = 0,0889$ ), przy jednoczesnym wzroście AEA (14,08 ng/ml;  $p = 0,4749$ ), TNF- $\alpha$  (7,15 pg/ml;  $p = 0,2336$ ) i IL-10 (24,95 pg/ml;  $p = 0,2640$ ). Statystycznie nieistotny spadek poziomu CB2 w PLA (-0,14 ng/ml;  $p = 0,1380$ ) oceniono dodatkowo za pomocą testu Wilcozona. Ogółem analiza wskazuje na brak istotnych zmian w badanych parametrach biochemicznych w obu grupach po 12 tygodniach suplementacji.

**Tabela 3.** Porównanie zmian badanych wskaźników w surowicy w obrębie obu grup po 12-tygodniowej interwencji probiotycznej lub placebo u tancerek (na podstawie danych z publikacji 1 i 2)

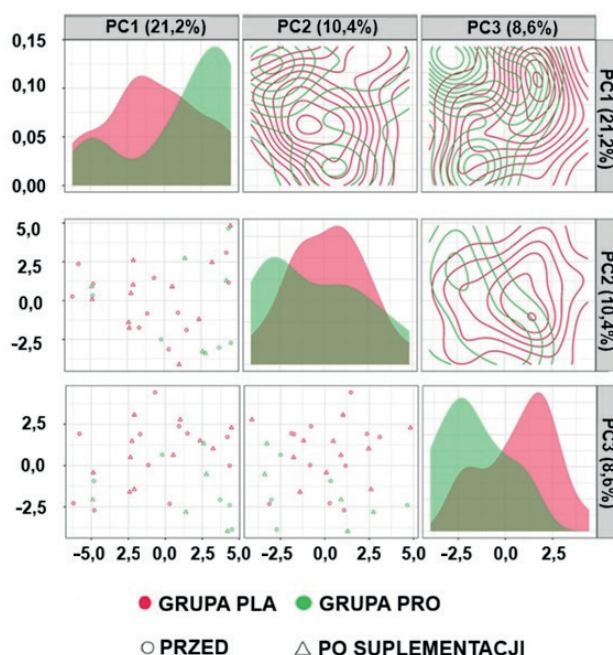
Wskaźnik	Probiotyk (n = 5)		Placebo (n = 10)	
	Średnie wartości różnic	t-test (t; p)	Średnie wartości różnic	t-test (t; p)
LPS [EU/l]	3,48	0,0853; 0,9361	56,98	2,0605; 0,0694
AEA [ng/ml]	-1,11	-0,0616; 0,9538	14,08	0,7457; 0,4749
CB2 [ng/ml]	-0,26	1,8140; 0,1439	-0,14	1,4832; 0,1380*
FAAH [ng/ml]	0,09	-1,3019; 0,2253	0,48	-0,2413; 0,8212
TNF- $\alpha$ [pg/ml]	10,28	1,8887; 0,1320	7,15	1,2768; 0,2336
IL-1 $\beta$ [pg/ml]	46,52	0,5646; 0,6025	104,61	1,9067; 0,0889
IL-10 [pg/ml]	66,17	-1,4251; 0,2273	24,95	1,1912; 0,2640

AEA – anandamid (N-arachidonoilietanolamina), CB2 – receptor kannabinoidowy typu 2, FAAH – hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych, IL-1 $\beta$  – interleukina 1 beta, IL-10 – interleukina 10, LPS – lipopolisacharyd, EU – jednostki endotoksynowe, TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworów alfa

\* test kolejności par Wilcoxon (Z; p)

### 5.3. Wskaźniki metabolomiczne z kału (publikacja 3)

PCA nie wykazała wyraźnego skupienia próbek w zależności od grupy interwencyjnej lub punktu czasowego (rycina 3), co wskazuje na nakładające się profile metabolomiczne

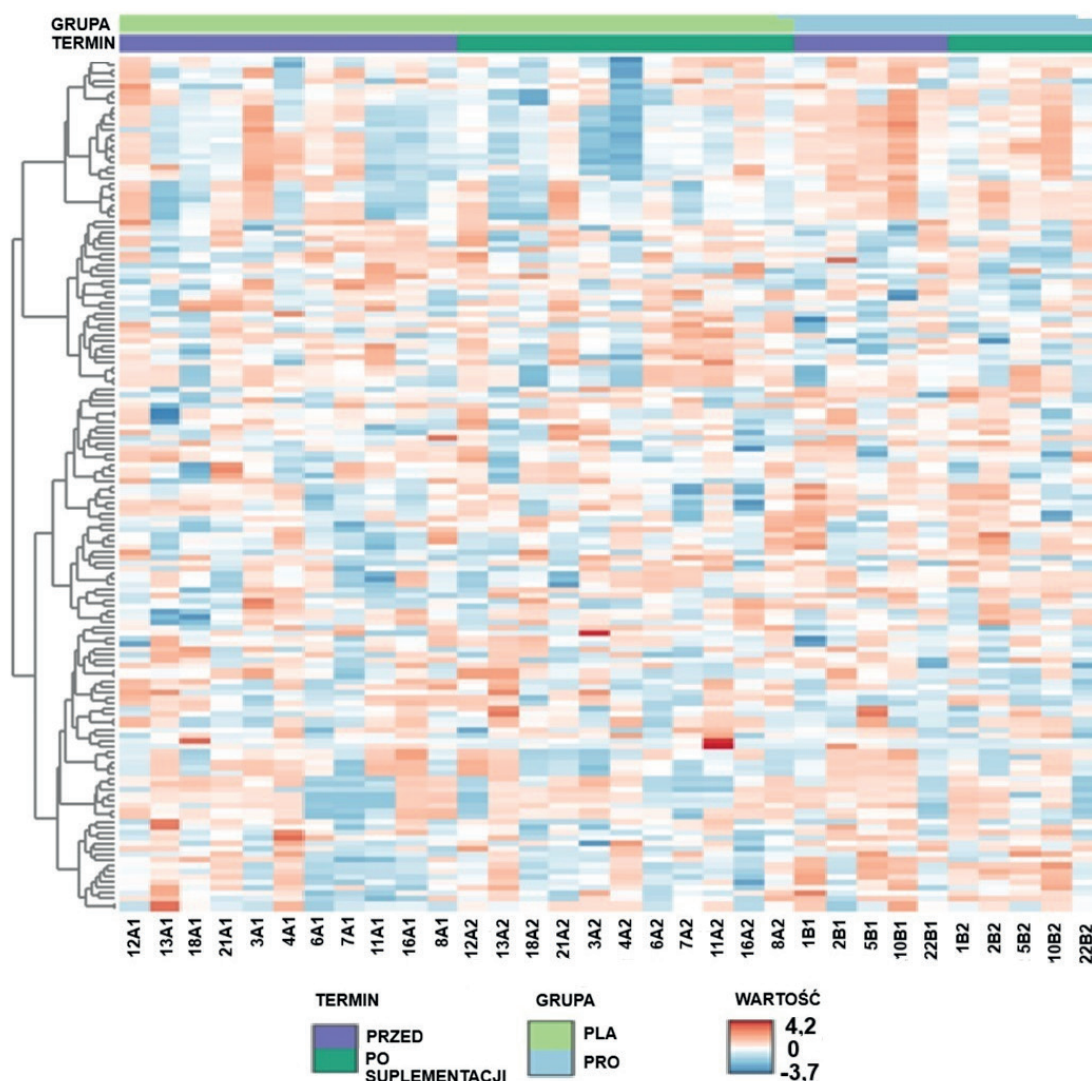


**Rycina 3.** Analiza głównych składowych (PCA) profili metabolomicznych z kału na początku badania (kółka) i po zakończeniu interwencji (trójkąty) w grupach placebo i probiotycznej (PLA – placebo, czerwony kolor, PRO – grupa probiotyczna, zielony kolor). Osi PC1–PC3 ukazują najważniejsze wzorce zmienności w poziomach metabolitów, tj. te kombinacje zmiennych, które w największym stopniu wyjaśniają różnice między próbkami. Wykresy gęstości na przekątnej przedstawiają rozkład wartości poszczególnych składowych w każdej grupie, a wykresy konturowe w górnym trójkącie obrazują obszary największej koncentracji próbek w przestrzeni dwuwymiarowej

Źródło: opracowanie własne (publikacja 3).

zarówno w punkcie początkowym, jak i po zakończeniu interwencji. Jednocześnie, mimo braku wyraźnej separacji próbek, nie można całkowicie wykluczyć istnienia subtelnych zmian w poziomach wybranych metabolitów, które mogły nie zostać uchwycone w analizie wielowymiarowej, potencjalnie wynikających z drobnych, niekontrolowanych różnic dietetycznych lub innych czynników środowiskowych.

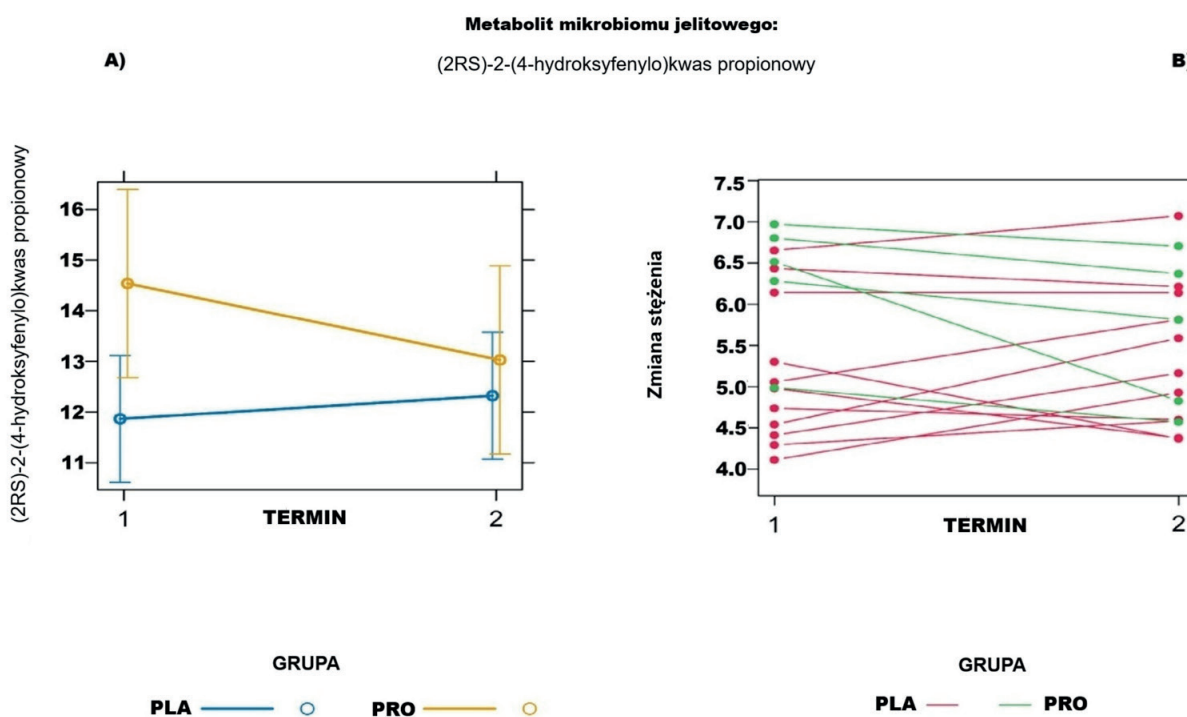
Mapa ciepła (*heatmap*) z logarytmicznie przekształconymi wartościami została sporządzona w celu wizualizacji różnic metabolicznych pomiędzy grupami. Różnice w stężeniach pomiędzy PRO a PLA mogą wskazywać na przesunięcie związane z interwencją, jednak nie oznacza to efektu jednokierunkowego (rycina 4). Lista wykrytych metabolitów objęła 140 substancji chemicznych. Test permutacyjny potwierdził istotny efekt interwencji ( $p = 0,026$ ), natomiast efekty czasu oraz interakcji nie osiągnęły istotności, co wskazuje na interwencję jako główny czynnik zmian.



**Rycina 4.** Mapa ciepła wartości metabolitów przekształconych logarytmicznie dla grup placebo (PLA) i probiotycznej (PRO). Wiersze odpowiadają metabolitom, kolumny – poszczególnym próbom indywidualnym. Kolorystyka odzwierciedla różnice stężeń (czerwony – wyższe, niebieski – niższe). Grupowanie (*clustering*) wskazuje na zmiany metaboliczne związane z interwencją. Mapa przedstawia przekształcone logarytmicznie intensywności sygnałów metabolitów; wartości ujemne odpowiadają cechom o niskim stężeniu, których wartość przed przekształceniem logarytmicznym była poniżej 1

Źródło: opracowanie własne (publikacja 3).

Zastosowano model efektów mieszanych w celu oceny, czy trajektorie zmian stężeń metabolitów w czasie różniły się pomiędzy dwiema grupami interwencyjnymi. Analiza wykazała, że metabolit (2RS)-2-(4-hydroksyfenylo)kwas propionowy wykazał najsilniejsze powiązanie statystyczne, przy niekorygowanym poziomie istotności  $p = 0,023$  obliczonym na podstawie przybliżenia Kenwarda–Rogera. Wyniki przedstawiono na rycinie 5A. Wykres efektów predykcyjnych ukazuje współczynniki efektów stałych obejmujących interwencję, czas oraz ich interakcję. Zaobserwowaną istotną interakcję należy prawdopodobnie przypisać przede wszystkim różnicom początkowym pomiędzy grupami. Oprócz modelu efektów mieszanych przeprowadzono również wielowymiarową analizę wariancji opartą na empirycznym podejściu bayesowskim (MEBA), której wyniki przedstawiono na rycinie 5B. Analiza MEBA również wskazała (2RS)-2-(4-hydroksyfenylo)kwas propionowy jako jeden z metabolitów o najwyraźniej zróżnicowanej odpowiedzi czasowej pomiędzy grupami interwencyjnymi.



PLA – grupa placebo, PRO – grupa probiotyku

**Rycina 5.** Wpływ interwencji i czasu na poziomy (2RS)-2-(4-hydroksyfenylo)kwasu propionowego w próbkach kału. Panel A przedstawia wizualizację współczynników efektów stałych (interwencja, czas, interakcja interwencji z czasem) w modelu mieszanym, natomiast panel B ukazuje wyniki wielowymiarowej analizy wariancji typu MEBA, identyfikującej ten związek jako jeden z najbardziej różnicujących profile metaboliczne w czasie między grupami badanymi

Źródło: opracowanie własne (publikacja 3).

Analiza ASCA wyodrębniła cztery metabolity jako „najsilniej różnicujące”, co oznacza, że miały one istotny wpływ na kształtowanie profilu metabolicznego charakterystycznego dla poszczególnych grup. Wśród nich szczególnie wyróżnił się metabolit (2RS)-2-(4-hydroksyfenylo)kwas propionowy, uznany za kluczowy dla interwencji, co potwierdzają również wyniki modelu efektów mieszanych. Uzyskane wyniki, w połączeniu z obserwacjami z mapy ciepła oraz analiz zmian względnych (tabela 2), sugerują, że interwencja mogła wywołać zmiany metaboliczne. W analizie przekrojowej uwzględniono jedynie te

metabolity, dla których logarytmiczna zmiana stężenia ( $\log_2$  fold change (FC) – logarytm ilorazu stężeń przed interwencją i po interwencji) przekraczała wartość 2 (tabela 4), co odpowiada co najmniej czterokrotnemu wzrostowi stężenia w grupie probiotycznej.

**Tabela 4.** Analiza przekrojowa na końcowym etapie badania wykazująca metabolity z kału o zmienionych stężeniach w grupie probiotycznej względem wartości wyjściowych ( $\log_2$  FC > 2, co odpowiada co najmniej czterokrotnej zmianie) (na podstawie danych z publikacji 3) [Nazwy metabolitów pozostawiono w języku angielskim, ponieważ dla wielu z nich nie funkcjonują utrwalone i jednoznaczne odpowiedniki w języku polskim, a zastosowanie tłumaczeń mogłoby prowadzić do nieścisłości w identyfikacji związków]

Metabolit	Krotność zmiany (FC)	$\log_2$ (FC)
Hippuric acid [M-H] <sup>-</sup> (kwas hipurowy)	8938,800000	13,1260
Curcumin (NIST EL) [M+H] <sup>+</sup> (kurkumina)	354,050000	8,4678
Hyocholic acid (microbiome) [M-H] <sup>-</sup>	0,036575	-4,7730
Quinic acid [M+AcO-H] <sup>-</sup>	23,103000	4,5300
Genistein [M-H] <sup>-</sup> (genisteina)	21,530000	4,4283
Estriol [M-H] <sup>-</sup>	18,119000	4,1795
Naringenin (microbiome) [M-H] <sup>-</sup> (naryngenina)	12,869000	3,6858
Taurine [M-H] <sup>-</sup> (tauryna)	0,119930	-3,0597
Alpha-linolenic acid [M-H] <sup>-</sup> (kwas $\alpha$ -linolenowy)	6,776500	2,7605
Alpha-linolenic acid [M+FA-H] <sup>-</sup>	6,574100	2,7168
3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-7-oxo-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid (microbiome) [M-H] <sup>-</sup>	0,172040	-2,5392
Peimine [M+H] <sup>+</sup>	5,497000	2,4586
Kaurenoic acid [M-H] <sup>-</sup>	0,202690	-2,3027
4-Methyl-5-thiazoleethanol (microbiome) [M+H] <sup>+</sup>	4,839600	2,2749
Cholic acid [M-H] <sup>-</sup> (kwas cholowy)	0,222740	-2,1666
Valproic acid [M-H] <sup>-</sup> (kwas walproinowy)	4,270200	2,0943

FC – iloraz stężenia po interwencji do stężenia początkowego

Analiza przekrojowa wykonana po zakończeniu interwencji wykazała istotne zmiany poziomów metabolitów w następstwie suplementacji probiotycznej, przy czym w przypadku kilku związków, takich jak kwas hipurowy czy kurkumina, odnotowano wyraźny wzrost ( $\log_2$  FC > 2). Niemniej jednak, ze względu na wysoką zmienność osobniczą, nie wszystkie obserwowane zmiany osiągnęły istotność statystyczną. Część wykrytych metabolitów, w tym kurkumina i naryngenina, mogła potencjalnie pochodzić z suplementów bogatych w związki fitochemiczne, jednak żadna z uczestniczek nie zadeklarowała ich stosowania w odpowiednich częściach dzienników żywieniowych. Ponadto ocena zgodności ze wzorcem diety śródziemnomorskiej nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami, co sugeruje porównywalność nawyków żywieniowych. W celu dalszej oceny wiarygodności wyników przeprowadzono test t (tabela 5), który pozwolił zidentyfikować podzbiór metabolitów różniących się istotnie pomiędzy grupą probiotyczną a placebo. Współczynnik fałszywych odkryć FDR na poziomie ~0,46 wskazuje, że po korekcji na wielokrotność porównań żaden z metabolitów nie osiągnął istotności statystycznej. Nie wyklucza to jednak znaczenia biologicznego uzyskanych efektów, ponieważ korekcja FDR jest metodą wysoce konserwatywną, szczególnie w badaniach z niewielką liczebnością próby, i może maskować istotne trendy, zwłaszcza w analizach eksploracyjnych.

**Tabela 5.** Metabolity wykazujące istotne różnice na końcowym etapie interwencji (wyniki testu t). Statystyka t ilustruje kierunek i wielkość zmiany – wartości ujemne wskazują na niższe stężenia w grupie probiotycznej. Wartość p oznacza istotność statystyczną przed korekcją, natomiast współczynnik FDR uwzględnia poprawkę na wielokrotność porównań (na podstawie danych z publikacji 3) [Nazwy metabolitów pozostawiono w języku angielskim, ponieważ dla wielu z nich nie funkcjonują utrwalone i jednoznaczne odpowiedniki w języku polskim, a zastosowanie tłumaczeń mogłoby prowadzić do nieścisłości w identyfikacji związków]

Metabolit	t-test	Wartość p	$-\log_{10}(p)$	FDR
Hyochoolic acid (microbiome) [M-H] <sup>-</sup>	-2,8552	0,012719	1,8955	0,45892
L-phenylalanine [M-H] <sup>-</sup> (L-fenylalanina)	-2,7714	0,015002	1,8239	0,45892
L-tryptophan [M-H] <sup>-</sup> (L-tryptofan)	-2,6018	0,020902	1,6798	0,45892
1-Aminocyclohexanecarboxylic acid (NIST EL) [M+H] <sup>+</sup>	2,5913	0,021336	1,6709	0,45892
L-phenylalanine [M+H] <sup>+</sup> (L-fenylalanina)	-2,4408	0,028545	1,5445	0,45892
3a,12a-dihydroxy-7-oxo-5b-cholan-24-oic acid (microbiome) [M-H] <sup>-</sup>	-2,4157	0,029951	1,5236	0,45892
Kaurenoic acid [M-H] <sup>-</sup>	-2,3055	0,036961	1,4323	0,45892
D-citramalic acid lithium salt (microbiome) [M-H] <sup>-</sup>	2,2485	0,041167	1,3855	0,45892
5-Aminopentanoic acid [M-H] <sup>-</sup> (kwas $\delta$ -aminowalerianowy)	-2,1452	0,049965	1,3013	0,45892

FDR – odsetek fałszywych odkryć

#### 5.4. Kwestionariusze dotyczące samopoczucia psychofizycznego (publikacje 1–3)

W ocenie subiektywnych dolegliwości żołądkowo-jelitowych przed 12-tygodniową interwencją i po jej zakończeniu nie stwierdzono istotnych zmian w żadnej z analizowanych kategorii w PRO ani PLA (tabela 6). W grupie otrzymującej probiotyk poziom odczuwanej pełności poposiłkowej, bólu brzucha, bólu menstruacyjnego, zaparc oraz biegunek pozostał na zbliżonym poziomie po interwencji ( $p > 0,05$  dla wszystkich parametrów). W PLA zaobserwowano nieistotne tendencje spadkowe dla większości objawów. Wyniki wskazują na brak jednoznacznych efektów interwencji probiotycznej lub placebo w kontekście subiektywnie zgłaszanych dolegliwości żołądkowo-jelitowych.

W zakresie kwestionariuszy dotyczących samopoczucia psychofizycznego oraz strategii radzenia sobie ze stresem przeprowadzona analiza nie wykazała istotnych zmian w żadnej z badanych grup po 12 tygodniach interwencji (tabela 7). W PRO nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w progu bólu mechanicznego, jakości snu, czasie zasypiania (PSQI), poziomie zmęczenia (FAS) ani w stosowanych strategiach radzenia sobie ze stresem (radzenie sobie aktywne, unikanie, poszukiwanie wsparcia i regulacja emocjonalna). W PLA odnotowano istotne wydłużenie czasu zasypiania ( $p = 0,0280$ ), natomiast pozostałe zmienne, w tym próg bólu, subiektywna jakość snu i poziom zmęczenia, nie uległy istotnym zmianom. Brak jednoznacznych efektów może wynikać z dużej zmienności indywidualnej oraz relatywnie małej liczby uczestników, co ogranicza moc statystyczną analizy.

**Tabela 6.** Ocena zmian dolegliwości żołądkowo-jelitowych na podstawie badania kwestionariuszowego przeprowadzonego przed 12-tygodniową interwencją i po niej w obu grupach (na podstawie danych z publikacji 3)

Wybrane pytania kwestionariusza ROME IV	Probiotyk (n = 5)				Placebo (n = 11)			
	przed (średnia ±SD)	p Shapiro- Wilka	po (średnia ±SD)	t-test (t; p)	przed (średnia ±SD)	p Shapiro- Wilka	po (średnia ±SD)	t-test (t; p)
Pełność poposiłkowa [0–10]	3,00 ±1,54	0,8109	3,00 ±1,83	0,0; 1,0	2,91 ±1,38	0,5163	2,32 ±1,31	0,9230; 0,3743
Bóle brzucha [0–10]	4,00 ±1,58	0,9672	3,80 ±1,79	0,5345; 0,6213	5,00 ±1,55	0,0006	4,45 ±1,37	1,6181; 0,1057*
Bóle menstruacyjne [0–10]	6,80 ±4,21	0,5657	5,60 ±4,28	1,6330; 0,1778	7,27 ±4,05	0,0214	5,55 ±3,21	1,1847; 0,2361*
Zaparcia [0–10]	3,92 ±0,95	0,3743	2,84 ±1,85	2,0323; 0,1119	4,16 ±1,39	0,7590	3,36 ±1,67	1,7330; 0,1138
Biegunki [0–10]	2,40 ±1,67	0,3140	2,20 ±0,84	0,4083; 0,7040	3,64 ±2,01	0,0020	2,73 ±1,42	1,4676; 0,1422*

\* test kolejności par Wilcoxon (Z; p)

**Tabela 7.** Ocena zmian subiektywnych wskaźników związanych z jakością życia przed interwencją i po niej według danych z kwestionariuszy oraz algometrii (na podstawie danych z publikacji 1 i 2)

Wskaźniki psychofizyczne	Probiotyk (n = 5)				Placebo (n = 10)			
	przed (średnia ±SD)	p Shapiro- Wilka	po (średnia ±SD)	t-test (t; p)	przed (średnia ±SD)	p Shapiro- Wilka	po (średnia ±SD)	t-test (t; p)
Próg bólu mechanicznego [niuton]	20,9 ±5,95	0,3024	19,9 ±5,46	0,3647; 0,7338	26,4 ±15,04	0,0004	22,5 ±7,04	1,3761; 0,1688*
Jakość snu (PSQI) [0–3 (najlepsza–najgorsza)]	1,4 ±0,55	0,0065	1 ±1,23	1,6036; 0,1088*	0,8 ±0,63	0,0123	1,2 ±0,42	0,9129; 0,3613*
Czas zasypiania (PSQI) [minuty]	15,2 ±13,52	0,0101	15 ±10,60	0,4472; 0,6547*	17,6 ±22,58	0,0000	27,6 ±36,24	2,1974; 0,0280*
Zmęczenie (FAS) [0–32]	18,6 ±2,70	0,9796	12,4 ±4,62	2,5227; 0,0652	15,9 ±8,03	0,7061	13,1 ±5,41	1,5245; 0,1617
Aktywne radzenie sobie ze stresem [0–18]	13 ±4,53	0,3946	12 ±3,94	0,9535; 0,3943	12,8 ±3,71	0,5996	12 ±3,97	0,7530; 0,4707
Zachowania unikowe w stresie [0–30]	14,6 ±2,61	0,0214	13 ±5	0,3652; 0,7150*	14,8 ±4,73	0,7620	13,2 ±5,07	0,9130; 0,3850
Szukanie wsparcia/emocjonalne radzenie sobie ze stresem [0–36]	16,4 ±1,67	0,3140	16 ±2,92	0,4313; 0,6885	16,7 ±4,45	0,3767	15,5 ±4,06	1,1078; 0,2967

FAS – Skala Oceny Zmęczenia, PSQI – Pittsburski Indeks Jakości Snu

\* test kolejności par Wilcoxon (Z; p)

## 6. DYSKUSJA

### 6.1. Układ endokannabinoidowy oraz markery stanu zapalnego (publikacje 1 i 2)

W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano istotnego wpływu 12-tygodniowej suplementacji probiotykiem zawierającym *Lactobacillus helveticus* R0052 i *Bifidobacterium longum* R0175 na poziomy receptora CB2 oraz enzymu FAAH w surowicy krwi tancerek, a także na stężenie anandamidu (AEA). Uzyskane wyniki wskazują na brak jednoznacznej modulacji układu endokannabinoidowego (ECS) przez zastosowany preparat. W literaturze przedmiotu dostępne są nieliczne prace kliniczne dotyczące tej problematyki, choć obserwacje z badań eksperymentalnych sugerują potencjalny wpływ probiotyków na ECS. W jednym z badań na modelu zwierzęcym wykazano, że suplementacja *Lactobacillus acidophilus* prowadzi do wzrostu ekspresji receptorów kannabinoidowych (w tym CB2) w tkankach jelitowych, co korelowało ze zmniejszeniem odczuwania bólu (Rousseaux i in. 2007). W badaniu klinicznym kobiet z przewlekłym bólem brzucha odnotowano natomiast spadek ekspresji CB2 po 21-dniowej terapii szczepem *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Ringel-Kulka i in. 2014). Z kolei w innym badaniu klinicznym suplementacja prebiotykiem i *Lactobacillus rhamnosus* spowodowała wzrost ekspresji CB2 u pacjentów z chorobą wieńcową (Liu i in. 2023). W modelu eksperymentalnym na psach z dysmotoryką jelitową zaobserwowano również zwiększoną liczbę komórek wykazujących ekspresję CB2 po suplementacji probiotycznej (Rossi i in. 2020). Z drugiej strony, badania na myszach z dysbiozą wywołaną antybiotykoterapią wykazały, że zaburzenia mikrobioty mogą indukować wzrost ekspresji receptora CB2 w tkance jelitowej (Aguilera i in. 2015). Brak istotnych zmian aktywności FAAH, enzymu degradującego anandamid, sugeruje, że w badanym okresie poziomy anandamidu mogły pozostawać względnie stabilne. W dostępnym piśmiennictwie nie ma jednak innych badań klinicznych analizujących bezpośredni wpływ probiotyków na poziom FAAH, co podkreśla nowatorskość i oryginalność uzyskanych wyników. W badaniach przedklinicznych zaobserwowano natomiast, że farmakologiczne zahamowanie FAAH skutkowało łagodzeniem objawów depresyjnych oraz korzystnymi zmianami w mikrobiocie jelitowej szczurów poddanych stresowi społecznemu (Barbetti i in. 2024). Podobnie, eksperymentalne badanie na hodowlach komórkowych pokazało, że składniki komórkowe *Akkermansia muciniphila* mogą modulować ekspresję genów ECS, w tym FAAH (Ghaderi i in. 2022). Biorąc pod uwagę zróżnicowane wyniki powyższych badań, brak istotnych zmian wskaźników ECS w przeprowadzonym eksperymencie może być związany ze specyfiką zastosowanych szczepów bakteryjnych, relatywnie krótkim czasem interwencji lub charakterystyką badanej grupy, obejmującej młode, zdrowe osoby aktywne fizycznie. W celu głębszego poznania zależności między suplementacją probiotykami a ECS konieczne są dalsze badania kliniczne z udziałem większych grup uczestników oraz różnorodnych szczepów probiotycznych.

Pomimo że w grupie placebo zaobserwowano większy średni wzrost poziomu LPS, a w grupie probiotycznej średni poziom AEA uległ obniżeniu (podczas gdy w grupie placebo nieznacznie wzrósł), różnice te nie osiągnęły istotności statystycznej. Tym samym postawiona we wstępie hipoteza nie została potwierdzona. Do tej pory nie opublikowano badań oceniających wpływ suplementacji probiotycznej na markery ECS u osób aktywnych

fizycznie. Istnieje jedna publikacja z randomizowanego, podwójnie zaślepionego badania z udziałem 92 pacjentów z chorobą wieńcową, w którym zastosowanie symbiotyku zawierającego inulinę i *Lactobacillus rhamnosus* GG skutkowało obniżeniem poziomu LPS i markerów zapalnych, a także wykazano korelację między ekspresją receptora CB2 a stężeniem LPS (Liu i in. 2023). Jednak zarówno populacja, jak i interwencja znacząco różniły się od zastosowanych w przeprowadzonym badaniu.

Wyniki metaanaliz potwierdzają przeciwzapalne właściwości probiotyków w różnych populacjach. Na przykład w 26 randomizowanych badaniach wykazano istotne obniżenie poziomu LPS oraz poprawę funkcjonowania bariery jelitowej i spadek stężenia markerów zapalnych, takich jak białko C-reaktywne (CRP), TNF- $\alpha$  i IL-6 (Zheng i in. 2023). Inna analiza, obejmująca 11 badań, wykazała spadek poziomu TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 i IL-4 oraz wzrost IL-10 (Milajerdi i in. 2020). Co istotne, przegląd obejmujący osoby aktywne fizycznie wykazał, że suplementacja probiotykami związana była z istotnym obniżeniem stężenia TNF- $\alpha$ , co sugeruje możliwe znaczenie takich interwencji u sportowców (Łagowska i Bajerska 2021). Niemniej zróżnicowanie zastosowanych szczepów i interwencji oraz wysoka heterogeniczność wyników utrudniają ich bezpośrednie odniesienie do przeprowadzonego w ramach pracy doktorskiej badania. Zbliżone wnioski wynikają z przeglądu systematycznego dotyczącego wpływu probiotyków na odporność, infekcje górnych dróg oddechowych oraz objawy ze strony układu pokarmowego u osób aktywnych fizycznie (Heimer i in. 2022). Podkreślono niejednoznaczność wyników oraz konieczność dalszych badań nad skutecznością i bezpieczeństwem probiotyków w tej populacji.

## 6.2. Skład metabolitów jelitowych (publikacja 3)

W niniejszym badaniu po raz pierwszy dokonano oceny niecelowanego metabolomu jelitowego u tancerek po 3-miesięcznej suplementacji probiotykiem zawierającym *Lactobacillus helveticus* R0052 i *Bifidobacterium longum* R0175. Uzyskane wyniki wskazują, że interwencja taka może prowadzić do modyfikacji profilu metabolitów jelitowych u profesjonalnych tancerzy. Dotychczasowe dane z badań z udziałem ludzi na temat metabolomicznych efektów tych konkretnych szczepów probiotycznych są ograniczone, choć istnieją przesłanki sugerujące ich aktywność metaboliczną. W badaniu na modelu SHIME® z udziałem dorosłych z łagodnymi objawami lękowymi wykazano, że dwutygodniowa suplementacja tymi szczepami zwiększała poziomy kwasu octowego i ogólnie SCFA, równocześnie zwiększając liczebność *Lactobacillus* i *Olsenella* oraz redukując *Lachnospira* i *Escherichia / Shigella* (De Oliveira i in. 2023).

Jednym z kluczowych metabolitów wyodrębnionych w analizie był 2-(4-hydroksyfenylo)kwas propionowy (2-HPP), pochodna mikrobiologicznego rozkładu izoflawonoidów, takich jak genisteina i daidzeina. Związek ten, obecny w osoczu i moczu, identyfikowany jest jako wskaźnik aktywności metabolicznej mikrobioty w odpowiedzi na obecność polifenoli roślinnych (Neveu i in. 2010). Probiotyki mogą modulować aktywność enzymów, m.in.  $\beta$ -glukuronidazy, które odpowiadają za dekoniugację izoflawonów i ich dalszy metabolizm (Hu i in. 2023). Taka aktywność sprzyja zwiększonej produkcji 2-HPP (Murota i in. 2018), który wraz z dihydrogenisteiną powstaje w wyniku mikrobiologicznego rozszczepienia pierścieni izoflawonoidowych (Hou 2022). Zarówno genisteina, jak i 2-HPP mogą wpływać na metabolizm adipocytów, potencjalnie hamując sekrecję leptyny, przy czym 2-HPP wykazuje słabsze działanie (Niwa i in. 2013). Związek ten łączono również

z poprawą metabolizmu lipidów, w tym hamowaniem ich akumulacji oraz wspieraniem procesów przetwarzania (Guo i in. 2023). Obserwacje te poczyniono na modelach zwierzęcych. Istotnym uczestnikiem tych przemian jest *Eubacterium ramulus* – bakteria bez-tlenowa powszechnie zasiedlająca przewód pokarmowy człowieka, która metabolizuje flawonoidy do 2-HPP i O-desmetylangolenzyny (Katanić Stanković i in. 2023). Jej zdolności do rozkładu flawonoidów potwierdzono zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, np. u szczurów karmionych kwercetyną (Blaut i in. 2003). Deglikozylacja flawonoidów przez mikrobiotę zwiększa stężenie ich aglikonów (np. kwercetyny, kemferolu), a tym samym ich biodostępność i aktywność biologiczną. Wzrost stężenia takich metabolitów jak 2-HPP może świadczyć o katabolizmie fenoli przez bakterie jelitowe (Landete 2022). Ponadto 2-HPP może wspierać wzrost liczebności *Bifidobacterium*, co zaobserwowano u szczurów po długoterminowej suplementacji związkami fenolowymi (Chacar i in. 2018). Obniżony poziom 2-HPP po interwencji probiotycznej może odzwierciedlać jego większe wchłanianie lub dalszy mikrobiologiczny rozkład do wtórnych metabolitów. Wyniki te wspierają hipotezę, że probiotyki wywierają istotny wpływ na metabolom jelitowy, zwłaszcza w zakresie przemian antyoksydantów roślinnych. Dotychczas nie prowadzono badań nad znaczeniem 2-HPP dla zdrowia lub wydolności fizycznej sportowców, choć wiadomo, że metabolity polifenoli ogólnie wspierają wytrzymałość tlenową i oksydację tłuszczów podczas wysiłku (Cao i in. 2024).

Wysoka wartość wskaźnika zmiany względnej (FC) w zakresie wybranych wykrytych metabolitów, sięgająca niekiedy kilku rzędów wielkości, sugeruje silną odpowiedź biologiczną na suplementację probiotyczną. Szczególnie istotne było wyraźne zwiększenie poziomu kwasu hipurowego w grupie probiotycznej po interwencji. Kwas hipurowy to znany produkt wspólnego metabolizmu gospodarza i mikrobioty, powstający w wyniku bakteryjnego rozkładu polifenoli i aromatycznych aminokwasów, takich jak fenyloalania. Jego podwyższone stężenie zwykle koreluje z większą aktywnością mikrobiologiczną, dietą bogatą w polifenole i większą różnorodnością mikrobioty jelitowej (Pallister i in. 2017; Ticinesi i in. 2023). Wyniki przeprowadzonego badania sugerują, że interwencja mogła nasilić mikrobiologiczne szlaki prowadzące do produkcji kwasu hipurowego, prawdopodobnie poprzez zwiększoną biotransformację związków fenolowych i aminokwasów aromatycznych. W grupie probiotycznej odnotowano również wzrost stężeń naryngeniny i genisteiny, co może świadczyć o nasilonym uwalnianiu tych związków przez mikroorganizmy lub poprawie ich biodostępności. Choć wpływ probiotyku jest tutaj możliwy, nie można wykluczyć, że zmiany te wynikają również z niekontrolowanego spożycia określonych składników diety mimo zaleceń utrzymania niezmiennych nawyków żywieniowych przez cały okres badania.

Uzyskane wyniki wskazują również na możliwość wpływu interwencji na metabolizm kwasów żółciowych. Obserwowany obniżony poziom niektórych pochodnych, takich jak kwas hiocholowy, może być wynikiem aktywności enzymatycznej bakterii probiotycznych, zwłaszcza hydrolaz soli żółciowych (BSH), które rozkładają sprzężone kwasy żółciowe, uwalniając wolne kwasy, taurynę i glicynę (Ahmadi i in. 2020; Sivamaruthi i in. 2020). Kwasy żółciowe, takie jak HCA, oddziałują z receptorami gospodarza (FXR, TGR5), regulując stan zapalny i integralność bariery jelitowej (Yang i in. 2021). Spadek poziomu tryptofanu i fenyloalaniny po probiotykoterapii może wynikać z nasilonego katabolizmu tych aminokwasów przez mikrobiotę. W literaturze potwierdzono, że probiotyki mogą wpływać na szlaki metaboliczne tryptofanu (np. przez szlak kynureninowy) i fenyloalaniny, co może prowadzić do ich większego zużycia i obniżenia dostępności systemowej (de Oliveira Filho i in. 2022; Strasser i in. 2016).

### 6.3. Dolegliwości jelitowe, ból, zmęczenie, sen i radzenie sobie ze stresem (publikacje 1–3)

W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w zakresie objawów żołądkowo-jelitowych, takich jak bóle brzucha czy wzdęcia, ocenianych zgodnie z kryteriami ROME IV, po 12 tygodniach suplementacji probiotykiem. Brak poprawy może wynikać z niskiego nasilenia objawów już na początku interwencji, zwłaszcza w porównaniu z populacją o wyższym ryzyku, jak biegacze długodystansowi czy pacjenci z IBD. W obu grupach odnotowano jednak spadek częstości zapać, co może sugerować nie tylko efekt placebo, lecz również wpływ zwiększonej samoobserwacji i stosowania się do zaleceń behawioralnych związanych z udziałem w badaniu, takich jak odpowiednie nawodnienie i regularność posiłków (Chhabra i Szabo 2024). Choć skuteczność probiotyków w łagodzeniu bólu brzucha u dzieci z zespołem jelita nadwrażliwego (IBS) została potwierdzona w kilku metaanalizach, to wyniki dotyczące osób dorosłych są mniej jednoznaczne (Didari i in. 2015; Fatahi i in. 2022; Wallace i in. 2023) ze względu na dużą heterogeniczność metodologiczną oraz szczepozależność efektów (Konstantis i in. 2023).

Wcześniejsze badania nad wpływem probiotyków na progi bólu mechanicznego były prowadzone wyłącznie na modelach zwierzęcych. Wykazano w nich, że zarówno myszy z otyłością indukowaną dietą (DIO), jak i ich szczupłe odpowiedniki wykazywały istotnie mniejszą wrażliwość na bodźce mechaniczne po suplementacji szczepem *Lactobacillus rhamnosus* PB01 (Alipour i in. 2021; Dardmeh i in. 2016).

W metaanalizie z 2023 r., obejmującej 18 prac, oceniono dwukierunkowe relacje między mikrobiotą jelitową a rytmemi okołodobowymi, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu interwencji probiotycznych i prebiotycznych na jakość i długość snu. Wyniki nie wykazały istotnej poprawy ani w jakości snu, ani w jego długości po zastosowaniu modulacji mikrobioty (Gil-Hernández i in. 2023). W innym badaniu klinicznym, z 2024 r., mimo że wskaźniki PSQI dotyczące jakości snu nie uległy istotnej zmianie po 9 tygodniach suplementacji probiotykiem wieloszczepowym, to czas potrzebny na zaśnięcie skrócił się w porównaniu z grupą placebo. Randomizowane, podwójnie zaślepienie badanie objęło 70 zdrowych osób (Kerksick i in. 2024). Z kolei w czterotygodniowym badaniu klinicznym z udziałem 40 uczestników cierpiących na bezsenność indukowaną stresem suplementacja *Bifidobacterium breve* CCFM1025 doprowadziła do istotnej poprawy sumarycznego wyniku PSQI, podczas gdy grupa placebo odnotowała jedynie nieznaczny spadek (Lan i in. 2023). Natomiast w randomizowanym, podwójnie zaślepionym badaniu klinicznym z udziałem 53 kobiet z zespołem fibromialgii (FMS) porównano efekty suplementacji probiotykiem ( $4 \times 10^{10}$  jednostek tworzących kolonie dziennie, 18 uczestniczek) oraz prebiotykiem (10 g inuliny dziennie, 17 uczestniczek) przez 8 tygodni. W grupie probiotycznej odnotowano istotne zmniejszenie nasilenia objawów depresji i lęku (Beck), poprawę jakości snu (PSQI) oraz zmniejszenie bólu (VAS) (Aslan Çın i in. 2024).

W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano również zmian w strategiach radzenia sobie ze stresem (Mini-COPE) w żadnej z grup. Przewlekły stres prowadzi do zaburzeń mikrobioty jelitowej, dysbiozy oraz uszkodzenia bariery jelitowej, co może nasilać odpowiedź stresową poprzez mechanizmy zapalne i neuroimmunologiczne (Johnson i in. 2023). W niniejszym badaniu poziom stresu u uczestniczek był jednak najprawdopodobniej niższy niż u zawodowych sportowców wytrzymałościowych lub u osób z rozpoznanymi zaburzeniami nastroju bądź chorobami przewlekłymi, co mogło ograniczyć nasilenie obserwowanych efektów. W jednym badaniu randomizowanym (łączącym dane z eksperymentu na zwierzętach i ludzi) wykazano, że wybrane probiotyki łagodziły zachowania lękowe u szczurów oraz poprawiały stan psychiczny i strategie radzenia

sobie u ludzi (Messaoudi i in. 2011). Kolejne badanie z udziałem pacjentów z depresją wykazało spadek objawów depresji oraz zmiany w metabolizmie tryptofanu, sugerując możliwą modulację neuroimmunologiczną wybranych szczepów (Kazemi i in. 2019). W badaniu z udziałem osób z obniżonym nastrojem nie stwierdzono istotnych zmian ani w parametrach psychologicznych, ani w markerach zapalnych po zastosowaniu interwencji probiotycznej (Romijn i in. 2017).

## 7. OGRANICZENIA BADAŃ I ICH ZNACZENIE

Najważniejszym ograniczeniem przeprowadzonego badania była niewielka liczba uczestniczek ( $n = 16$ ), wynikająca z trudności rekrutacyjnych oraz restrykcyjnych kryteriów włączenia. Niewielka próba istotnie ogranicza moc statystyczną badania, zwiększa ryzyko nierozpoznania istniejącego efektu oraz utrudnia generalizację wyników na szerszą populację. Ze względu na losowy przydział i rezygnacje części uczestniczek grupy badawcze były nierównoliczne (5 osób w grupie probiotycznej vs 11 w grupie placebo). Nierówna liczebność mogła wpłynąć na wyniki analiz statystycznych i ich interpretację, zwłaszcza w przypadku zmiennych o dużej wariancji wewnątrzgrupowej.

W badaniach skupiono się na niecelowanej analizie metabolitów kałowych, pomijając bezpośrednią analizę składu mikrobioty jelitowej (np. przy użyciu sekwencjonowania 16S rRNA). Chociaż zmiany metabolomiczne mogą sugerować modyfikacje mikrobioty, brak bezpośrednich danych o taksonomii bakterii ogranicza możliwość pełnej interpretacji mechanizmów działania probiotyku.

Chociaż grupy zostały dobrane tak, aby zachować jak największą jednorodność w zakresie cech antropometrycznych, żywieniowych i aktywności fizycznej, nie można wykluczyć, że część obserwowanych różnic końcowych (np. w poziomach metabolitów) wynikała z niekontrolowanych zmiennych początkowych. Badanie zakończono po 12 tygodniach suplementacji bez oceny utrzymywania się efektów po zakończeniu interwencji (*follow-up*). Nie wiadomo więc, czy ewentualne zmiany (np. w metabolomie czy jakości snu) miały charakter przejściowy, czy trwałe.

Mimo powyższych ograniczeń uzyskane wyniki badań mogą stanowić punkt wyjścia dla przyszłych badań z udziałem większych grup, zróżnicowanych populacji i rozszerzonych metodologii (w tym analizy „omiczne” i długoterminowe obserwacje). Wskazane jest także zastosowanie zróżnicowanych dawek probiotyków czy zastosowanie synbiotyków, a także analiza powiązań metabolitów w kale z profilem w surowicy, co pozwoli pełniej zrozumieć mechanizmy działania osi jelito–mózg.

## 8. WNIOSKI

W niniejszym badaniu nie wykazano istotnych efektów 12-tygodniowej suplementacji probiotykiem zawierającym szczepy *Lactobacillus helveticus* R0052 i *Bifidobacterium longum* R0175 na stężenia markerów układu endokannabinoidowego (AEA, CB2, FAAH), poziom LPS ani profil cytokin pro- i przeciwzapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10) u tancerek. Nie odnotowano również istotnych zmian w zakresie objawów gastroenterologicznych ocenianych według kryteriów ROME IV (ból brzucha, wzdęcia, rytm wypróżnień), jakości snu (PSQI), poziomu zmęczenia (FAS) ani strategii radzenia sobie ze stresem (Mini-COPE). Zidentyfikowano jednak istotną korelację pomiędzy poziomami LPS i AEA, co potwierdza potencjalny związek między aktywacją układu endokannabinoidowego a endotoksemią w warunkach obciążenia fizycznego i psychicznego. Zaobserwowano także trend wzrostowy stężenia LPS w grupie placebo oraz tendencję do poprawy jakości snu w grupie probiotycznej, co może sugerować subtelny efekt neuromodulacyjny, choć obserwacje te nie osiągnęły istotności statystycznej.

Analiza metabolomiczna wykazała zmiany w profilu metabolitów kałowych w odpowiedzi na interwencję, w tym obniżenie poziomu 2-(4-hydroksyfenylo)kwasu propionowego. Zjawisko to mogło jednak wynikać z różnic początkowych pomiędzy grupami oraz braku równoległych oznaczeń w surowicy i danych mikrobiologicznych, co ogranicza jednoznaczną interpretację tych wyników. Ponadto wysoki wskaźnik fałszywych odkryć (FDR) sugeruje możliwość wystąpienia błędu typu I.

### *Praktyczne implikacje*

Suplementacja była bezpieczna i dobrze tolerowana – nie odnotowano żadnych działań niepożądanych. Mimo braku jednoznacznych efektów w zakresie badanych wskaźników biochemicznych i psychofizycznych uzyskane wyniki wskazują na możliwość subtelnego wpływu probiotyku na wybrane aspekty funkcjonowania organizmu, zwłaszcza w świetle przytoczonej literatury. Obserwowane trendy wymagają jednak potwierdzenia w badaniach obejmujących większe i bardziej zróżnicowane populacje, z rozszerzonym panelem analitycznym (m.in. równoległe oznaczenia metabolitów w kale i osoczu) oraz z uwzględnieniem indywidualnych profili mikrobioty i uwarunkowań biologicznych, które mogą modulować odpowiedź na suplementację.

## 9. PIŚMIENICTWO

- Aguilera M., Cerdà-Cuellar M., Martínez V. (2015) Antibiotic-induced dysbiosis alters host-bacterial interactions and leads to colonic sensory and motor changes in mice. *Gut Microbes*, 6 (1), 10–23. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.990790>
- Ahmadi S., Wang S., Nagpal R., Wang B., Jain S., Razazan A., Mishra S.P., Zhu X., Wang Z., Kavanagh K., Yadav H. (2020) A human-origin probiotic cocktail ameliorates aging-related leaky gut and inflammation via modulating the microbiota/taurine/tight junction axis. *JCI Insight*, 5 (9), e132055. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.132055>
- Ait-Belgnaoui A., Payard I., Rolland C., Harkat C., Braniste V., Théodorou V., Tompkins T.A. (2018) *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus helveticus* Synergistically Suppress Stress-related Visceral Hypersensitivity Through Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Modulation. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 24 (1), 138–146. <https://doi.org/10.5056/jnm16167>
- Alipour H., Gazerani P., Heidari M., Dardmeh F. (2021) Modulatory Effect of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* PB01 on Mechanical Sensitivity in a Female Diet-Induced Obesity Model. *Pain Research & Management*, 2021, 5563959. <https://doi.org/10.1155/2021/5563959>
- Aparicio-Pascual D., Clemente-Suárez V.J., Tornero-Aguilera J.F., Rubio-Zarapuz A. (2025) The Effect of Probiotic Supplementation on Cytokine Modulation in Athletes After a Bout of Exercise: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Medicine – Open*, 11 (1), 58. <https://doi.org/10.1186/s40798-025-00860-7>
- Arseneault-Bréard J., Rondeau I., Gilbert K., Girard S.A., Tompkins T.A., Godbout R., Rousseau G. (2012) Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *The British Journal of Nutrition*, 107 (12), 1793–1799. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005137>
- Aslan ÇİN N.N., Açık M., Tertemiz O.F., Aktan Ç., Akçali D.T., Çakiroğlu F.P., ÖzçelİK A.Ö. (2024) Effect of prebiotic and probiotic supplementation on reduced pain in patients with fibromyalgia syndrome: a double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial. *Psychology, Health & Medicine*, 29 (3), 528–541. <https://doi.org/10.1080/13548506.2023.2216464>
- Barbetti M., Mancabelli L., Vacondio F., Longhi G., Ferlenghi F., Viglioli M., Turrone F., Carnevali L., Mor M., Ventura M., Sgoifo A., Rivara S. (2024) Social stress-induced depressive-like symptoms and changes in gut microbial and lipidomic profiles are prevented by pharmacological inhibition of FAAH activity in male rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 131, 110963. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2024.110963>
- Berg B.B., Linhares A.F.S., Martins D.M., Rachid M.A., Cau S.B.A., Souza G.G., Carvalho J.C.S., Sorgi C.A., Romero T.R.L., Pinho V., Teixeira M.M., Castor M.G.M.E. (2023) Anandamide reduces the migration of lymphocytes to the intestine by CB2 activation and reduces TNF- $\alpha$  in the target organs, protecting mice from graft-versus-host disease. *European Journal of Pharmacology*, 956, 175932. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175932>
- Berndt C., Strahler J., Kirschbaum C., Rohleder N. (2012) Lower stress system activity and higher peripheral inflammation in competitive ballroom dancers. *Biological Psychology*, 91 (3), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2012.08.006>

- Bhatia R., Sharma S., Bhadada S.K., Bishnoi M., Kondepudi K.K. (2022) Lactic Acid Bacterial Supplementation Ameliorated the Lipopolysaccharide-Induced Gut Inflammation and Dysbiosis in Mice. *Frontiers in Microbiology*, 13, 930928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.930928>
- Biernacki M., Skrzydlewska E. (2016) Metabolism of endocannabinoids. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (online), 70, 830–843. <https://phmd.hirszfeld.pl/wp-content/uploads/2023/07/1213898.pdf>
- Blaut M., Schoefer L., Braune A. (2003) Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73 (2), 79–87. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.73.2.79>
- Brierley S.M., Greenwood-Van Meerveld B., Sarnelli G., Sharkey K.A., Storr M., Tack J. (2023) Targeting the endocannabinoid system for the treatment of abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 20 (1), 5–25. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00682-y>
- Cani P.D., Plovier H., Van Hul M., Geurts L., Delzenne N.M., Druart C., Everard A. (2016) Endocannabinoids – at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nature Reviews. Endocrinology*, 12(3), 133–143. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.211>
- Cao G., Zuo J., Wu B., Wu Y. (2024) Polyphenol supplementation boosts aerobic endurance in athletes: systematic review. *Frontiers in Physiology*, 15, 1369174. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1369174>
- Chacar S., Tarighi M., Fares N., Faivre J.-F., Louka N., Maroun R.G. (2018) Identification of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace Extracts Urine Metabolites and Correlation with Gut Microbiota Modulation. *Antioxidants*, 7 (6), 75. <https://doi.org/10.3390/antiox7060075>
- Chhabra B., Szabo A. (2024) Placebo and Nocebo Effects on Sports and Exercise Performance: A Systematic Literature Review Update. *Nutrients*, 16 (13), 1975. <https://doi.org/10.3390/nu16131975>
- Clark A., Mach N. (2016) Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 13, 43. <https://doi.org/10.1186/s12970-016-0155-6>
- Clauss M., Gérard P., Mosca A., Leclerc M. (2021) Interplay Between Exercise and Gut Microbiome in the Context of Human Health and Performance. *Frontiers in Nutrition*, 8, 637010. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.637010>
- Cristofori F., Dargenio V.N., Dargenio C., Miniello V.L., Barone M., Francavilla R. (2021) Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. *Frontiers in Immunology*, 12, 578386. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.578386>
- Dardmeh F., Nielsen H.I., Alipour H., Kjærgaard B., Brandsborg E., Gazerani P. (2016) Potential Nociceptive Regulatory Effect of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* PB01 (DSM 14870) on Mechanical Sensitivity in Diet-Induced Obesity Model. *Pain Research & Management*, 5080438. <https://doi.org/10.1155/2016/5080438>
- De Oliveira F.L., Salgaço M.K., de Oliveira M.T., Mesa V., Sartoratto A., Peregrino A.M., Ramos W.S., Sivieri K. (2023) Exploring the Potential of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 as Promising Psychobiotics Using SHIME. *Nutrients*, 15 (6), 1521. <https://doi.org/10.3390/nu15061521>
- Didari T., Mozaffari S., Nikfar S., Abdollahi M. (2015) Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 21 (10), 3072–3084. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i10.3072>

- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz J.C., Piomelli D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372 (6507), 686–691. <https://doi.org/10.1038/372686a0>
- Dowling L.R., Strazzari M.R., Keely S., Kaiko G.E. (2022) Enteric nervous system and intestinal epithelial regulation of the gut-brain axis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 150 (3), 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.07.015>
- Dziewiecka H., Buttar H.S., Kasperska A., Ostapiuk-Karolczuk J., Domagalska M., Cichoń J., Skarpańska-Stejnborn A. (2022) Physical activity induced alterations of gut microbiota in humans: a systematic review. *BMC Sports Science, Medicine & Rehabilitation*, 14 (1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13102-022-00513-2>
- Edebol Carlman H.M.T., Rode J., König J., Repsilber D., Hutchinson A.N., Thunberg P., Persson J., Kiselev A., Pruessner J.C., Brummer R.J. (2022) Probiotic Mixture Containing *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum* and *Lactiplantibacillus plantarum* Affects Brain Responses to an Arithmetic Stress Task in Healthy Subjects: A Randomised Clinical Trial and Proof-of-Concept Study. *Nutrients*, 14 (7), 1329. <https://doi.org/10.3390/nu14071329>
- Fatahi S., Hosseini A., Sohoul M.H., Sayyari A., Khatami K., Farsani Z.F., Amiri H., Dara N., de Souza I.G.O., Santos H.O. (2022) Effects of probiotic supplementation on abdominal pain severity in pediatric patients with irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *World Journal of Pediatrics*, 18 (5), 320–332. <https://doi.org/10.1007/s12519-022-00516-6>
- Ghaderi F., Sotoodehnejadnematalahi F., Hajebrahimi Z., Fateh A., Siadat S.D. (2022) Effects of active, inactive, and derivatives of *Akkermansia muciniphila* on the expression of the endocannabinoid system and PPARs genes. *Scientific Reports*, 12 (1), 10031. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13840-8>
- Ghosh S.S., Wang J., Yannie P.J., Ghosh S. (2020) Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *Journal of the Endocrine Society*, 4 (2), bvz039. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvz039>
- Gil-Hernández E., Ruiz-González C., Rodriguez-Arrastia M., Ropero-Padilla C., Rueda-Ruzafa L., Sánchez-Labraca N., Roman P. (2023) Effect of gut microbiota modulation on sleep: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Nutrition Reviews*, 81 (12), 1556–1570. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuad027>
- Guo J., Wang P., Cui Y., Hu X., Chen F., Ma C. (2023) Protective Effects of Hydroxyphenyl Propionic Acids on Lipid Metabolism and Gut Microbiota in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*, 15 (4), 1043. <https://doi.org/10.3390/nu15041043>
- Heimer M., Teschler M., Schmitz B., Mooren F.C. (2022) Corrigendum: Health benefits of probiotics in sport and exercise – Non-existent or a matter of heterogeneity? A systematic review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1051918. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1051918>
- Hendry D., Campbell A., Smith A., Hopper L., Straker L., O’Sullivan P. (2022) Movement quantity and quality: How do they relate to pain and disability in dancers?. *PloS ONE*, 17 (5), e0268444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268444>
- Hou S. (2022) Genistein: Therapeutic and Preventive Effects, Mechanisms, and Clinical Application in Digestive Tract Tumor. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5957378. <https://doi.org/10.1155/2022/5957378>
- Hu S., Ding Q., Zhang W., Kang M., Ma J., Zhao L. (2023) Gut microbial beta-glucuronidase: a vital regulator in female estrogen metabolism. *Gut Microbes*, 15 (1), 2236749. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2236749>
- Jansma J., Brinkman F., van Hemert S., El Aidy S. (2021) Targeting the endocannabinoid system with microbial interventions to improve gut integrity. *Progress in Neuro-Psy-*

- chopharmacology & Biological Psychiatry, 106, 110169. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110169>
- Jarrett H., Medlin S., Morehen J.C. (2025) The Role of the Gut Microbiome and Probiotics in Sports Performance: A Narrative Review Update. *Nutrients*, 17 (4), 690. <https://doi.org/10.3390/nu17040690>
- Johnson D., Letchumanan V., Thum C.C., Thurairajasingam S., Lee L.-H. (2023) A Microbial-Based Approach to Mental Health: The Potential of Probiotics in the Treatment of Depression. *Nutrients*, 15 (6), 1382. <https://doi.org/10.3390/nu15061382>
- Katanić Stanković J.S., Mihailović N., Mihailović V. (2023) Genistein: Advances on Resources, Biosynthesis Pathway, Bioavailability, Bioactivity, and Pharmacology. W: Xiao J. (ed.) *Handbook of Dietary Flavonoids*. Cham: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-94753-8\\_45-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-94753-8_45-1)
- Katona I., Freund T.F. (2012) Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 35, 529–558. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150420>
- Kazemi A., Noorbala A.A., Azam K., Eskandari M.H., Djafarian K. (2019) Effect of probiotic and prebiotic vs placebo on psychological outcomes in patients with major depressive disorder: A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*, 38 (2), 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.04.010>
- Kerksick C.M., Moon J.M., Walden K.E., Hagele A.M., Allen L.E., Gaije C.J., Krieger J.M., Jäger R., Pane M., Mumford P. (2024) Multi-strain probiotic improves subjective sleep quality with no impact on body composition, hemodynamics, and physical activity. *Beneficial Microbes*, 15 (2), 179–194. <https://doi.org/10.1163/18762891-bja00002>
- Khan R.N., Maner-Smith K., Owens J.A., Barbian M.E., Jones R.M., Naudin C.R. (2021) At the heart of microbial conversations: endocannabinoids and the microbiome in cardio-metabolic risk. *Gut Microbes*, 13 (1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1911572>
- Kinashi Y., Hase K. (2021) Partners in Leaky Gut Syndrome: Intestinal Dysbiosis and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 12, 673708. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.673708>
- Konstantis G., Efstathiou S., Pourzitaki C., Kitsikidou E., Germanidis G., Chourdakis M. (2023) Efficacy and safety of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials using ROME IV criteria. *Clinical Nutrition*, 42 (5), 800–809. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2023.03.019>
- Konturek P.C., Brzozowski T., Konturek S.J. (2011) Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62 (6), 591–599.
- Koutedakis Y., Jamurtas A. (2004) The dancer as a performing athlete: physiological considerations. *Sports Medicine*, 34 (10), 651–661. <https://doi.org/10.2165/00007256-200434100-00003>
- Lan Y., Lu J., Qiao G., Mao X., Zhao J., Wang G., Tian P., Chen W. (2023) *Bifidobacterium breve* CCFM1025 Improves Sleep Quality via Regulating the Activity of the HPA Axis: A Randomized Clinical Trial. *Nutrients*, 15 (21), 4700. <https://doi.org/10.3390/nu15214700>
- Landete J.M. (2022) Flavone, flavanone and flavonol metabolism from soybean and flaxseed extracts by the intestinal microbiota of adults and infants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102 (6), 2575–2583. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11599>
- Leonel A.J., Alvarez-Leite J.I. (2012) Butyrate: implications for intestinal function. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 15 (5), 474–479. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32835665fa>

- Ligresti A., Cascio M.G., Di Marzo V. (2005) Endocannabinoid metabolic pathways and enzymes. *Current Drug Targets. CNS & Neurological Disorders*, 4 (6), 615–623. <https://doi.org/10.2174/156800705774933104>
- Liu J., Batkai S., Pacher P., Harvey-White J., Wagner J.A., Cravatt B.F., Gao B., Kunos G. (2003) Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (45), 45034–45039. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306062200>
- Liu M., Tandorost A., Moludi J., Dey P. (2023) Prebiotics Plus Probiotics May Favorably Impact on Gut Permeability, Endocannabinoid Receptors, and Inflammatory Biomarkers in Patients with Coronary Artery Diseases: A Clinical Trial. *Food Science & Nutrition*, 12 (2), 1207–1217. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3835>
- Łagowska K., Bajerska J. (2021) Probiotic Supplementation and Respiratory Infection and Immune Function in Athletes: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of Athletic Training*, 56 (11), 1213–1223. <https://doi.org/10.4085/592-20>
- Mach N., Fuster-Botella D. (2017) Endurance exercise and gut microbiota: A review. *Journal of Sport and Health Science*, 6 (2), 179–197. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2016.05.001>
- Maccarrone M., De Petrocellis L., Bari M., Fezza F., Salvati S., Di Marzo V., Finazzi-Agrò A. (2001) Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393 (2), 321–328. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2500>
- Malek N., Popiolek-Barczyk K., Mika J., Przewlocka B., Starowicz K. (2015) Anandamide, Acting via CB2 Receptors, Alleviates LPS-Induced Neuroinflammation in Rat Primary Microglial Cultures. *Neural Plasticity*, 130639. <https://doi.org/10.1155/2015/130639>
- Martin-Gallausiaux C., Marinelli L., Blottière H.M., Larraufie P., Lapaque N. (2021) SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 80 (1), 37–49. <https://doi.org/10.1017/S0029665120006916>
- Martinen M., Ala-Jaakkola R., Laitila A., Lehtinen M.J. (2020) Gut Microbiota, Probiotics and Physical Performance in Athletes and Physically Active Individuals. *Nutrients*, 12 (10), 2936. <https://doi.org/10.3390/nu12102936>
- Matei D., Trofin D., Iordan D.A., Onu I., Condurache I., Ionite C., Buculei I. (2023) The Endocannabinoid System and Physical Exercise. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (3), 1989. <https://doi.org/10.3390/ijms24031989>
- McBride C., Bronner S. (2022) Injury characteristics in professional modern dancers: A 15-year analysis of work-related injury rates and patterns. *Journal of Sports Sciences*, 40 (7), 821–837. <https://doi.org/10.1080/02640414.2021.2021030>
- Messaoudi M., Violle N., Bisson J.F., Desor D., Javelot H., Rougeot C. (2011) Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes*, 2 (4), 256–261. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.4.16108>
- Milajerdi A., Mousavi S.M., Sadeghi A., Salari-Moghaddam A., Parohan M., Larijani B., Esmaillzadeh A. (2020) The effect of probiotics on inflammatory biomarkers: a meta-analysis of randomized clinical trials. *European Journal of Nutrition*, 59 (2), 633–649. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01931-8>
- Misera A., Liśkiewicz P., Łoniewski I., Skonieczna-Żydecka K., Samochowicz J. (2021) Effect of Psychobiotics on Psychometric Tests and Inflammatory Markers in Major Depressive Disorder: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials with Meta-Regression. *Pharmaceuticals*, 14 (10), 952. <https://doi.org/10.3390/ph14100952>

- Mohammadi G., Dargahi L., Peymani A., Mirzanejad Y., Alizadeh S.A., Naserpour T., Nasiri-Asl M. (2019) The Effects of Probiotic Formulation Pretreatment (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) on a Lipopolysaccharide Rat Model. *Journal of the American College of Nutrition*, 38 (3), 209–217. <https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1487346>
- Mohr A.E., Jäger R., Carpenter K.C., Kerksick C.M., Purpura M., Townsend J.R., West N.P., Black K., Gleeson M., Pyne D.B., Wells S.D., Arent S.M., Kreider R.B., Campbell B.I., Bannock L., Scheiman J., Wissent C.J., Pane M., Kalman D.S., Pugh J.N., Antonio J. (2020) The athletic gut microbiota. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 17 (1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00353-w>
- Monda V., Villano I., Messina A., Valenzano A., Esposito T., Moscatelli F., Viggiano A., Cibelli G., Chieffi S., Monda M., Messina G. (2017) Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3831972. <https://doi.org/10.1155/2017/3831972>
- Murota K., Nakamura Y., Uehara M. (2018) Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82 (4), 600–610. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>
- Neveu V., Perez-Jiménez J., Vos F., Crespy V., du Chaffaut L., Mennen L., Knox C., Eisner R., Cruz J., Wishart D., Scalbert A. (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, bap024. <https://doi.org/10.1093/database/bap024>
- Ney L.M., Wipplinger M., Grossmann M., Engert N., Wegner V.D., Mosig A.S. (2023) Short chain fatty acids: key regulators of the local and systemic immune response in inflammatory diseases and infections. *Open Biology*, 13 (3), 230014. <https://doi.org/10.1098/rsob.230014>
- Nieman D.C. (1994) Exercise, infection, and immunity. *International Journal of Sports Medicine*, 15 Suppl 3, S131–S141. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1021128>
- Niwa T., Yokoyama S., Osawa T. (2013) Effect of the genistein metabolite on leptin secretion in murine adipocytes in vitro. *Food Chemistry*, 138 (1), 122–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.108>
- Nunes A.C., Mendes L.A., Mota L.A., Lima P.O., Almeida G.P. (2022) Training Load, Pain Intensity, and Functioning Can Explain Injuries in Dancers: A Classification and Regression Tree (CART) Analysis. *Medical Problems of Performing Artists*, 37 (2), 73–77. <https://doi.org/10.21091/mppa.2022.2012>
- Ohno-Shosaku T., Tanimura A., Hashimoto-dani Y., Kano M. (2012) Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *The Neuroscientist*, 18 (2), 119–132. <https://doi.org/10.1177/1073858410397377>
- Oliveira Filho J.G. de, Carvalho A.S.E.S., Alves J.D.S., Egea M.B. (2022) Next-generation probiotics as a therapeutic strategy for the treatment of phenylketonuria: a review. *Nutrition Reviews*, 80 (10), 2100–2112. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuac024>
- O'Mahony S.M., Clarke G., Borre Y.E., Dinan T.G., Cryan J.F. (2015) Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, 277, 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.027>
- Pallister T., Jackson M.A., Martin T.C., Zierer J., Jennings A., Mohny R.P., MacGregor A., Steves C.J., Cassidy A., Spector T.D., Menni C. (2017) Hippurate as a metabolomic marker of gut microbiome diversity: Modulation by diet and relationship to metabolic syndrome. *Scientific Reports*, 7 (1), 13670. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13722-4>
- Partrick K.A., Rosenhauer A.M., Auger J., Arnold A.R., Ronczkowski N.M., Jackson L.M., Lord M.N., Abdulla S.M., Chassaing B., Huhman K.L. (2021) Ingestion of probiotic

- (*Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum*) alters intestinal microbial structure and behavioral expression following social defeat stress. *Scientific Reports*, 11 (1), 3763. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83284-z>
- Pertwee R.G. (2006) Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *British Journal of Pharmacology*, 147, S163–S171. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706406>
- Rahaman O., Ganguly D. (2021) Endocannabinoids in immune regulation and immunopathologies. *Immunology*, 164 (2), 242–252. <https://doi.org/10.1111/imm.13378>
- Raichlen D.A., Foster A.D., Seillier A., Giuffrida A., Gerdeman G.L. (2013) Exercise-induced endocannabinoid signaling is modulated by intensity. *European Journal of Applied Physiology*, 113 (4), 869–875. <https://doi.org/10.1007/s00421-012-2495-5>
- Ridaura V., Belkaid Y. (2015) Gut microbiota: the link to your second brain. *Cell*, 161 (2), 193–194. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.033>
- Ringel-Kulka T., Goldsmith J.R., Carroll I.M., Barros S.P., Palsson O., Jobin C., Ringel Y. (2014) *Lactobacillus acidophilus* NCFM affects colonic mucosal opioid receptor expression in patients with functional abdominal pain – a randomised clinical study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 40 (2), 200–207. <https://doi.org/10.1111/apt.12800>
- Ringham R., Klump K., Kaye W., Stone D., Libman S., Stowe S., Marcus M. (2006) Eating disorder symptomatology among ballet dancers. *The International Journal of Eating Disorders*, 39 (6), 503–508. <https://doi.org/10.1002/eat.20299>
- Rodes L., Khan A., Paul A., Coussa-Charley M., Marinescu D., Tomaro-Duchesneau C., Shao W., Kahouli I., Prakash S. (2013) Effect of probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on gut-derived lipopolysaccharides and inflammatory cytokines: an in vitro study using a human colonic microbiota model. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (4), 518–526. <https://doi.org/10.4014/jmb.1205.05018>
- Romijn A.R., Rucklidge J.J., Kuijter R.G., Frampton C. (2017) A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* for the symptoms of depression. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 51 (8), 810–821. <https://doi.org/10.1177/0004867416686694>
- Rossi G., Gioacchini G., Pengo G., Suchodolski J.S., Jergens A.E., Allenspach K., Gavazza A., Scarpona S., Berardi S., Galosi L., Bassotti G., Cerquetella M. (2020) Enterocolic increase of cannabinoid receptor type 1 and type 2 and clinical improvement after probiotic administration in dogs with chronic signs of colonic dysmotility without mucosal inflammatory changes. *Neurogastroenterology and Motility*, 32 (1), e13717. <https://doi.org/10.1111/nmo.13717>
- Rousseaux C., Thuru X., Gelot A., Barnich N., Neut C., Dubuquoy L., Dubuquoy C., Merour E., Geboes K., Chamailard M., Ouwehand A., Leyer G., Carcano D., Colombel J.F., Ardid D., Desreumaux P. (2007) *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nature Medicine*, 13 (1), 35–37. <https://doi.org/10.1038/nm1521>
- Rowland I., Gibson G., Heinken A., Scott K., Swann J., Thiele I., Tuohy K. (2018) Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*, 57 (1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>
- Scheiman J., Luber J.M., Chavkin T.A., MacDonald T., Tung A., Pham L.D., Wibowo M.C., Wurth R.C., Punthambaker S., Tierney B.T., Yang Z., Hattab M.W., Avila-Pacheco J., Clish C.B., Lessard S., Church G.M., Kostic A.D. (2019) Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nature Medicine*, 25 (7), 1104–1109. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0485-4>
- Shing C.M., Peake J.M., Lim C.L., Briskey D., Walsh N.P., Fortes M.B., Ahuja K.D., Vitetta L. (2014) Effects of probiotics supplementation on gastrointestinal permeability, inflam-

- mation and exercise performance in the heat. *European Journal of Applied Physiology*, 114 (1), 93–103. <https://doi.org/10.1007/s00421-013-2748-y>
- Silva Y.P., Bernardi A., Frozza R.L. (2020) The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 25. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
- Sivamaruthi B.S., Fern L.A., Rashidah Pg Hj Ismail D.S.N., Chaiyasut C. (2020) The influence of probiotics on bile acids in diseases and aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110310. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110310>
- Strandwitz P. (2018) Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research*, 1693 (Pt B), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>
- Strasser B., Geiger D., Schauer M., Gostner J.M., Gatterer H., Burtscher M., Fuchs D. (2016) Probiotic Supplements Beneficially Affect Tryptophan-Kynurenine Metabolism and Reduce the Incidence of Upper Respiratory Tract Infections in Trained Athletes: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*, 8 (11), 752. <https://doi.org/10.3390/nu8110752>
- Sullivan A., Nord C.E., Evengård B. (2009) Effect of supplement with lactic-acid producing bacteria on fatigue and physical activity in patients with chronic fatigue syndrome. *Nutrition Journal*, 8, 4. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-8-4>
- Tang H., Huang W., Yao Y.F. (2023) The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microbial Cell*, 10 (3), 49–62. <https://doi.org/10.15698/mic2023.03.792>
- Tantimonaco M., Ceci R., Sabatini S., Catani M.V., Rossi A., Gasperi V., Maccarrone M. (2014) Physical activity and the endocannabinoid system: an overview. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71 (14), 2681–2698. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1575-6>
- Teo W., Newton M.J., McGuigan M.R. (2011) Circadian rhythms in exercise performance: implications for hormonal and muscular adaptation. *Journal of Sports Science & Medicine*, 10 (4), 600–606.
- Ticinesi A., Guerra A., Nouvenne A., Meschi T., Maggi S. (2023) Disentangling the Complexity of Nutrition, Frailty and Gut Microbial Pathways during Aging: A Focus on Hippuric Acid. *Nutrients*, 15 (5), 1138. <https://doi.org/10.3390/nu15051138>
- Turcotte C., Blanchet M.R., Laviolette M., Flamand N. (2016) The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73 (23), 4449–4470. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2300-4>
- Varghese, Rao S., Khattak A., Zamir F., Chaari A. (2024) Physical Exercise and the Gut Microbiome: A Bidirectional Relationship Influencing Health and Performance. *Nutrients*, 16 (21), 3663. <https://doi.org/10.3390/nu16213663>
- Wallace C., Gordon M., Sinopoulou V., Akobeng A.K. (2023) Probiotics for management of functional abdominal pain disorders in children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2 (2), CD012849. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012849.pub2>
- Wang H., Lee I.S., Braun C., Enck P. (2016) Effect of Probiotics on Central Nervous System Functions in Animals and Humans: A Systematic Review. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 22 (4), 589–605. <https://doi.org/10.5056/jnm16018>
- Winden D. van, Rijn R.M. van, Savelsbergh G.J.P., Oudejans R.R.D., Stubbe J.H. (2021) The Association Between Stress and Injury: A Prospective Cohort Study Among 186 First-Year Contemporary Dance Students. *Frontiers in Psychology*, 12, 770494. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.770494>
- Yang M., Gu Y., Li L., Liu T., Song X., Sun Y., Cao X., Wang B., Jiang K., Cao H. (2021) Bile Acid-Gut Microbiota Axis in Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside. *Nutrients*, 13 (9), 3143. <https://doi.org/10.3390/nu13093143>

- Zanfirescu A., Nitulescu G., Mihai D.P., Nitulescu G.M. (2022) Identifying FAAH Inhibitors as New Therapeutic Options for the Treatment of Chronic Pain through Drug Repurposing. *Pharmaceuticals*, 15 (1), 38. <https://doi.org/10.3390/ph15010038>
- Zheng Y., Zhang Z., Tang P., Wu Y., Zhang A., Li D., Wang C.Z., Wan J.Y., Yao H., Yuan C.S. (2023) Probiotics fortify intestinal barrier function: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Frontiers in Immunology*, 14, 1143548. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1143548>

## **PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-ZAWODOWEJ**

### **Publikacje naukowe (spoza cyklu)**

Wiącek J., Karolkiewicz J. (2023) Different Approaches to Ergogenic, Pre-, and Probiotic Supplementation in Sports with Different Metabolism Characteristics: A Mini Review. *Nutrients*, 15 (6), 1541. <https://doi.org/10.3390/nu15061541>

punktacja MEiN: 140; Impact Factor 5,9

Wiącek J., Szurkowska J., Kryściak J., Galecka M., Karolkiewicz J. (2023). No changes in the abundance of selected fecal bacteria during increased carbohydrates consumption period associated with the racing season in amateur road cyclists. *PeerJ*, 11, e14594. <https://doi.org/10.7717/peerj.14594>

punktacja MEiN: 100; Impact Factor: 2,7

Szurkowska J., Wiącek J., Laparidis K., Karolkiewicz J. A Comparative Study of Selected Gut Bacteria Abundance and Fecal pH in Bodybuilders Eating High-Protein Diet and More Sedentary Controls. *Nutrients*. 2021 Nov 16; 13 (11): 4093. <https://doi.org/10.3390/nu13114093>

punktacja MEiN: 140; Impact Factor: 6,706

### **Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć**

Indeks Hirscha: 4

Liczba cytowań: 28 (25 bez autocytowania)

Sumaryczny Impact Factor: 29,306

Sumaryczna punktacja MNiSW/MEiN: 700

### **Udział w projektach badawczych**

*Ocena efektywności terapii hiperbarycznej (2021–2023)* – pobieranie próbek, analiza wyników, redakcja manuskryptu (współpraca: Zakład Lekkiej Atletyki i Przygotowania Motorycznego AWF Poznań).

### **Recenzje manuskryptów w czasopismach**

Microbiome (IF 12,7), Journal of the International Society of Sports Nutrition (IF 4,5), Probiotics and Antimicrobial Proteins (IF 4,4), International Journal of Sports Physiology and Performance (IF 4,3), Scientific Reports (IF 3,9), BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation (IF 2,8), Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology (IF 1,8), dwukrotnie: Discover Food (IF 3,7), dwukrotnie: TRENDS in Sport Science (czasopismo AWF Poznań).

## Dodatkowa działalność

- Edytor pomocniczy w Journal of Cannabis Research (BMC, Springer/Nature – IF 4,3).
- Popularyzator nauki: wystąpienia w telewizji (TVP3 Poznań), radiu (Radio Kierowców), internecie (webinar *Nauka z kulturą (fizyczną) na żywo* na kanale wideo AWF Poznań [www.youtube.com/@AWFPoznan](http://www.youtube.com/@AWFPoznan)); autor popularnonaukowego e-booka *Weganin wiedzieć winien. Kompendium wiedzy roślinożercy* (wyd. Jakub Wiącek Neurosport 2022), poradnika dotyczącego zagrożeń wynikających z diety wegańskiej, napisanego na podstawie 140 publikacji naukowych.
- Wnioskodawca: Rozwój Młodych Pracowników Nauki AWF Poznań – środki przyznane w konkursach w 2022 r. i 2023 r.; Narodowe Centrum Nauki – PRELUDIUM 20, 21, 22, 23 – brak przyznanych środków.
- Wiceprzewodniczący samorządu doktorantów AWF Poznań w latach 2022–2024.
- Stypendysta programu ERASMUS+ dla pracowników na Uniwersytecie Tesalii w Grecji (24–27.11.2025; prowadzenie zajęć dydaktycznych – 8 godzin).

## ZAŁĄCZNIK 1. OŚWIADCZENIA

Poznań, 26.08.2025r.  
miejsowość, data


**Jakub Wiącek**  
imię i nazwisko kandydatki/kandydata

### Oświadczenie autora o oryginalności rozprawy doktorskiej, samodzielności jej przygotowania i nienaruszeniu praw autorskich

Ja, niżej podpisany oświadczam, że:

- a) rozprawa doktorska pt. **Ocena neuro- i immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy** jest wynikiem mojej działalności twórczej i powstała bez niedozwolonego udziału osób trzecich;
- b) wszystkie wykorzystane przeze mnie materiały źródłowe i opracowania zostały w niej wymienione, a napisana przez mnie praca nie narusza praw autorskich osób trzecich;
- c) załączona wersja elektroniczna pracy jest tożsama z wydrukiem rozprawy;
- d) praca nie była wcześniej podstawą nadania stopnia innej osobie.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego/karnego.

  
.....  
podpis kandydata

Poznań, 26.08.2025  
miejsowość, data

**Jakub Wiącek**

imię i nazwisko kandydatki/kandydata

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Panu **Jakubowi Wiącek** stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

#### Oświadczenie kandydatki/kandydata

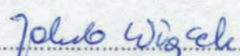
Oświadczam, że mój wkład w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt. **Ocena neuro- i immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy**

polegał na\*:

Publikacja 1 – koncepcja badań, opracowanie metodologii, analizy formalne i statystyczne, badania eksperymentalne, opracowanie i kuracja danych, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, recenzja i redakcja, wizualizacja wyników, walidacja danych.

Publikacja 2 – koncepcja badań, opracowanie metodologii, przeprowadzenie badań, opracowanie danych, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, recenzja i redakcja, wizualizacja wyników, analiza formalna, pozyskanie zasobów.

Publikacja 3 – koncepcja badań, opracowanie metodologii, przeprowadzenie badań, analiza formalna, opracowanie danych, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, recenzja i redakcja, wizualizacja wyników, administrowanie projektem, pozyskiwanie funduszy.

  
.....  
podpis kandydatki/kandydata

Poznań, 22.07.25.  
miejsowość, data

**prof. AWF dr hab. Joanna Karolkiewicz**  
imię i nazwisko współautorki/współautora

**Akademia Wychowania Fizycznego im. E. Piaseckiego w Poznaniu**  
**Zakład Żywności i Żywienia**  
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **Jakubowi Wiącek**  
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze  
fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

#### Oświadczenie współautorki/współautora

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. Ocena neuro- i immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy

#### polegał na\*:

##### - Publikacja 1:

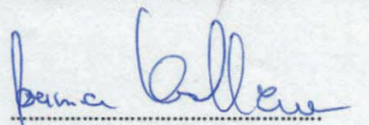
Koncepcja badania, metodologia, walidacja, analiza statystyczna, opracowanie danych, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, nadzór naukowy, zarządzanie projektem.

##### - Publikacja 2:

Koncepcja badania, metodologia, walidacja, prowadzenie badań, zapewnienie zasobów, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, korekta i redakcja, nadzór naukowy.

##### - Publikacja 3:

Koncepcja badania, metodologia, prowadzenie badań, walidacja, analiza statystyczna, zapewnienie zasobów, nadzór naukowy, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, korekta i redakcja.

  
.....  
podpis współautorki/współautora

2025.07.25  
.....  
miejsowość, data

**dr Igor Łoniewski**

imię i nazwisko współautorki/współautora

**Sanprobi Sp. z o.o. Sp.K.**

miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **Jakubowi Wiącek**

stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

#### Oświadczenie współautorki/współautora

**Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. Ocena neuro- i immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy**

**polegał na:**

- Publikacja 1:


Udział w opracowaniu metodologii, prowadzeniu badań i analizie statystycznej.

- Publikacja 2:

Współudział w opracowaniu metodologii, wykonanie analiz statystycznych i przygotowanie oprogramowania; udział w walidacji danych oraz współzarządzaniu projektem.

- Publikacja 3:

Udział w opracowaniu metodologii, administrowaniu projektem, przygotowaniu oprogramowania i nadzorze naukowym.

  
.....  
podpis współautorki/współautora

Szczecin, 27.07.2025  
.....  
miejsowość, data

**prof. dr hab. Karolina Skonieczna-Żydecka**  
imię i nazwisko współautorki/współautora

**Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie**  
**Zakład Badań Biochemicznych**  
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **Jakubowi Wiącek**  
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze  
fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

**Oświadczenie współautorki/współautora**

**Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. Ocena neuro- i immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy**

**polegał na:**

- Publikacja 1:

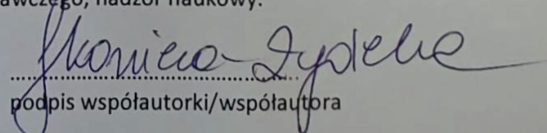
Współtworzenie koncepcji badania, opracowanie metodologii, udział w prowadzeniu badań, nadzór naukowy.

- Publikacja 2:

Współtworzenie koncepcji badania, opracowanie metodologii, prowadzenie badań, udział w administrowaniu projektem, zapewnienie zasobów, nadzór naukowy.

- Publikacja 3:

Współtworzenie koncepcji badania, opracowanie metodologii. Udział w opracowaniu metodologicznym, wspólne opracowanie projektu badawczego, nadzór naukowy.

  
.....  
podpis współautorki/współautora

.....  
miejsowość, data

**prof. AWF dr hab. Krzysztof Kusy**  
imię i nazwisko współautorki/współautora

**Akademia Wychowania Fizycznego im. E. Piaseckiego w Poznaniu**  
**Zakład Lekkiej Atletyki i Przygotowania Motorycznego**  
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **Jakubowi Wiącek**  
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze  
fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

#### **Oświadczenie współautorki/współautora**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. Ocena neuro- i immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy

**polegał na\*:**

- publikacja 1 -

- metodologia (weryfikacja poprawności metod),
- prowadzenie badań (udział w realizacji eksperymentów i zbieraniu danych),
- zapewnienie zasobów (obsługa sprzętu, dostęp do materiałów),
- opracowanie danych (przygotowanie danych do analizy).

.....  
podpis współautorki/współautora

Poznań, 22.07.2025  
.....  
miejsowość, data

**dr Tomasz Podgórski**  
imię i nazwisko współautorki/współautora

**Akademia Wychowania Fizycznego im. E. Piaseckiego w Poznaniu**  
**Zakład Biochemii**  
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **Jakubowi Wiącek**  
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze  
fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

#### Oświadczenie współautorki/współautora

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. Ocena neuro- i immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy

#### polegał na\*:

- publikacja 1 -

- walidacja (weryfikacja poprawności metod i wyników),
- prowadzenie badań (udział w realizacji eksperymentów i zbieraniu danych),
- zapewnienie zasobów (obsługa sprzętu, dostęp do materiałów),
- opracowanie danych (przygotowanie danych do analizy).

**Tomasz Podgórski**  
.....  
podpis współautorki/współautora

Trikala, Greece, 25.07.25  
miejscowość, dat.a  
[city, date]

**dr Chariklia K. Deli**

imię i nazwisko współautorki/współautora  
[Name of co-author]

**University of Thessaly, Department of Physical Education and Sport Science**

miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)  
[place of employment - institution, department]

**Dotyczy:** postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **Jakubowi Wiącek**

stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

**[Subject:** Proceedings concerning the awarding of the doctoral degree to Mr. **Jakub Wiącek**

in the field of medical and health sciences, in the discipline of physical culture sciences, at the Poznań University of Physical Education.]

**Oświadczenie współautorki/współautora**  
**[Statement of the Co-author]**

**Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt.** Ocena neuro- i

immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy **polegał na:**

- Publikacja 2:

Opracowanie metodologii, przygotowanie oprogramowania oraz krytyczna rewizja i redakcja manuskryptu.

**[I hereby declare that my contribution to the doctoral dissertation entitled:** Assessment of the neuro- and immunomodulatory effects of selected probiotic bacteria through the measurement of endocannabinoid system activation markers, gut microbiota metabolites, cytokine profiles, and fatigue symptoms in dancers **consisted of:**

– Publication 2:

Methodology, development of software tools, and critical revision of the manuscript.]



podpis współautorki/współautora  
[Signature of the co-author]

.....  
miejsce, data  
[city, date]

**prof. Ioannis G. Fatouros**

imię i nazwisko współautorki/współautora  
[Name of co-author]

**University of Thessaly, Department of Physical Education and Sport Science**

miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)  
[place of employment - institution, department]

**Dotyczy:** postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **Jakubowi Wiącek**

stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

**[Subject:** Proceedings concerning the awarding of the doctoral degree to Mr. **Jakub Wiącek**

in the field of medical and health sciences, in the discipline of physical culture sciences, at the Poznań University of Physical Education.]

**Oświadczenie współautorki/współautora**  
**[Statement of the Co-author]**

**Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. Ocena neuro- i immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy polegał na:**

- Publikacja 2:

Metodologia, analiza statystyczna, nadzór merytoryczny.

**[I hereby declare that my contribution to the doctoral dissertation entitled:** Assessment of the neuro- and immunomodulatory effects of selected probiotic bacteria through the measurement of endocannabinoid system activation markers, gut microbiota metabolites, cytokine profiles, and fatigue symptoms in dancers **consisted of:**

- Publication 2:

Methodology, scientific supervision.]



.....  
podpis współautorki/współautora  
[Signature of the co-author]

.....  
miejsowość, data  
[city, date]

**prof. Athanasios Z. Jamurtas**

imię i nazwisko współautorki/współautora  
[Name of co-author]

**University of Thessaly, Department of Physical Education and Sport Science**

miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)  
[place of employment - institution, department]

**Dotyczy:** postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **Jakubowi Wiącek**

stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

**[Subject:** Proceedings concerning the awarding of the doctoral degree to Mr. **Jakub Wiącek**

in the field of medical and health sciences, in the discipline of physical culture sciences,  
at the Poznań University of Physical Education.]

#### **Oświadczenie współautorki/współautora**

#### **[Statement of the Co-author]**

**Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt.** Ocena neuro- i

immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy **polegał na:**

- Publikacja 2:

Koncepcja badania, walidacja wyników, wizualizacja danych.

**[I hereby declare that my contribution to the doctoral dissertation entitled:** Assessment of the neuro- and immunomodulatory effects of selected probiotic bacteria through the measurement of endocannabinoid system activation markers, gut microbiota metabolites, cytokine profiles, and fatigue symptoms in dancers **consisted of:**

– Publication 2:

Conceptualization of the study, validation of the results, and data visualization.]



.....  
podpis współautorki/współautora  
[Signature of the co-author]

POZNAŃ, 30.09.2025  
miejsowość, data

**Dominika Moszczyńska**  
imię i nazwisko współautorki/współautora

**Akademia Wychowania Fizycznego im. E. Piaseckiego w Poznaniu**  
**Zakład Żywności i Żywienia**  
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

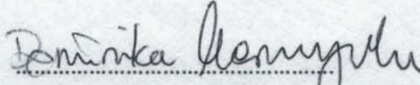
Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **Jakubowi Wiącek**  
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze  
fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

#### Oświadczenie współautorki/współautora

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. Ocena neuro- i immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy

#### polegał na\*:

- publikacja 2: Analiza statystyczna, prowadzenie badań, korekta i redakcja manuskryptu.

  
.....  
podpis współautorki/współautora

Szczecin 28.07.25  
miejsowość, data

**dr Daniel Styburski**

imię i nazwisko współautorki/współautora

**Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie**

**Zakład Badań Biochemicznych**

miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **Jakubowi Wiącek**  
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze  
fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

#### **Oświadczenie współautorki/współautora**

**Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt.** Ocena neuro- i

immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników  
aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin  
oraz objawów zmęczenia u tancerzy

**polegał na:**

- Publikacja 3:

Opracowanie koncepcji badania, metodologii, oprogramowania, nadzór merytoryczny oraz walidacja.

  
.....  
podpis współautorki/współautora

Szczecin, 18.08.2025

.....  
miejsowość, data

**dr hab. Mariusz Kaczmarczyk**  
imię i nazwisko współautorki/współautora

**Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie**  
**Zakład Badań Biochemicznych**  
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Pani/Panu **Jakubowi Wiącek**  
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze  
fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

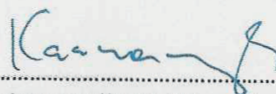
#### Oświadczenie współautorki/współautora

**Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. Ocena neuro- i immunomodulującego działania wybranych bakterii probiotycznych poprzez pomiar wskaźników aktywacji układu endokannabinoidowego, poziomu metabolitów mikrobioty jelitowej, profilu cytokin oraz objawów zmęczenia u tancerzy**

**polegał na:**

- Publikacja 3:

Planowanie badania (konceptualizacja), opracowanie metodologii, walidacja danych oraz nadzór merytoryczny nad przebiegiem projektu.



.....  
podpis współautorki/współautora



Article

# Evaluating the Impact of Probiotic Therapy on the Endocannabinoid System, Pain, Sleep and Fatigue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Dancers

Jakub Wiącek <sup>1,\*</sup>, Tomasz Podgórski <sup>2</sup>, Krzysztof Kusy <sup>3</sup>, Igor Łoniewski <sup>4</sup>, Karolina Skonieczna-Żydecka <sup>4</sup> and Joanna Karolkiewicz <sup>1,\*</sup><sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, Poznan University of Physical Education, 61-871 Poznan, Poland<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Physiology, Poznan University of Physical Education, 61-871 Poznan, Poland; podgorski@awf.poznan.pl<sup>3</sup> Department of Athletics, Strength and Conditioning, Poznan University of Physical Education, 61-871 Poznan, Poland; kusy@awf.poznan.pl<sup>4</sup> Department of Biochemical Science, Pomeranian Medical University in Szczecin, Broniewskiego 24, 71-460 Szczecin, Poland; sanprobi@sanprobi.pl (I.L.); karolina.skonieczna.zydecka@pum.edu.pl (K.S.-Ż.)

\* Correspondence: wiacek@awf.poznan.pl (J.W.); karolkiewicz@awf.poznan.pl (J.K.); Tel.: +48-6978-81422 (J.W.)

**Abstract:** Emerging research links the endocannabinoid system to gut microbiota, influencing nociception, mood, and immunity, yet the molecular interactions remain unclear. This study focused on the effects of probiotics on ECS markers—cannabinoid receptor type 2 (CB2) and fatty acid amide hydrolase (FAAH)—in dancers, a group selected due to their high exposure to physical and psychological stress. In a double-blind, placebo-controlled trial (ClinicalTrials.gov NCT05567653), 15 dancers were assigned to receive either a 12-week regimen of *Lactobacillus helveticus* Rosell-52 and *Bifidobacterium longum* Rosell-17 or a placebo (PLA:  $n = 10$ , PRO:  $n = 5$ ). There were no significant changes in CB2 (probiotic: 0.55 to 0.29 ng/mL; placebo: 0.86 to 0.72 ng/mL) or FAAH levels (probiotic: 5.93 to 6.02 ng/mL; placebo: 6.46 to 6.94 ng/mL;  $p > 0.05$ ). A trend toward improved sleep quality was observed in the probiotic group, while the placebo group showed a decline (PRO: from 1.4 to 1.0; PLA: from 0.8 to 1.2;  $p = 0.07841$ ). No other differences were noted in assessed outcomes (pain and fatigue). Probiotic supplementation showed no significant impact on CB2 or FAAH levels, pain, or fatigue but suggested potential benefits for sleep quality, suggesting an area for further research.

**Keywords:** gut microbiome; probiotics; sports nutrition; supplementation; endocannabinoid system



**Citation:** Wiącek, J.; Podgórski, T.; Kusy, K.; Łoniewski, I.; Skonieczna-Żydecka, K.; Karolkiewicz, J. Evaluating the Impact of Probiotic Therapy on the Endocannabinoid System, Pain, Sleep and Fatigue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Dancers. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 5611. <https://doi.org/10.3390/ijms25115611>

Academic Editor: Sunmin Park

Received: 26 April 2024

Revised: 16 May 2024

Accepted: 19 May 2024

Published: 21 May 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The endocannabinoid system (ECS) plays a critical role in modulating physiological processes such as nociception, mood, and immune responses. The ECS exerts its effects primarily through its bioactive lipids, anandamide (AEA; N-arachidonylethanolamine) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), which interact with cannabinoid receptors 1 (CB1) and 2 (CB2). CB1 receptors are predominantly expressed in the nervous system, where they influence pain perception, mood, and appetite. Conversely, CB2 receptors are more commonly found on immune cells [1].

Unlike classical neurotransmitters, endocannabinoids such as anandamide are not stored in vesicles but are synthesized on demand. This synthesis is triggered by cellular demand and occurs in response to increases in intracellular calcium levels, which activate the biosynthetic enzymes [2]. Another distinctive feature of cannabinoids is their ability to mediate retrograde signaling. This process involves cannabinoids being produced post-synaptically and then traveling back across the synapse to bind to cannabinoid receptors on pre-synaptic neurons. This mechanism allows them to modulate neurotransmitter release, effectively regulating synaptic transmission in a feedback loop [3].

In addition to well-known endocannabinoids like anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), other lipid-based molecules such as palmitoylethanolamide (PEA) and palmitoylglycerol (PAG) also function as endocannabinoid-like substances. These compounds, structurally similar to classic endocannabinoids, do not bind directly to cannabinoid receptors. Instead, PEA enhances AEA activity through an “entourage effect,” offering anti-inflammatory and analgesic effects by inhibiting AEA breakdown and affecting non-cannabinoid pathways like peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- $\alpha$ ) [4]. Additionally, these substances can interact with receptors such as the Transient Receptor Potential Vanilloid type-1 (TRPV1), a non-selective cation channel involved in pain and inflammation, which demonstrates the endocannabinoid system’s complex interactions with broader signaling networks [5].

Following its synthesis, the main endocannabinoid, anandamide, is primarily broken down by fatty acid amide hydrolase (FAAH), an enzyme that hydrolyzes anandamide into arachidonic acid and ethanolamine, thus regulating its availability and activity at cannabinoid receptors [6]. There has been substantial progress in understanding the biochemical and pharmacological characteristics of FAAH, including its structure and the interaction with inhibitors that could potentially treat conditions like inflammatory pain [7]. FAAH’s importance as a target for therapeutic intervention, especially for neuropsychiatric and neurological disorders like chronic pain, has led to innovative approaches in drug discovery (chemical graph mining, quantitative structure–activity relationship (QSAR) modeling, and molecular docking) to repurpose existing drugs as FAAH inhibitors [8].

Alongside the endocannabinoid system (ECS), the gut microbiota (GM) emerges as a critical factor capable of modulating immune functions and signaling pathways associated with daily well-being [9]. The complex ecosystem of the GM interacts with the body’s physiological processes through various mechanisms, including the production of neurotransmitters and the modulation of inflammatory responses. Studies have shown that changes in the composition and function of the GM can affect the central nervous system, thereby impacting emotional health, sleep patterns, and pain thresholds, suggesting a profound bi-directional communication within the gut–brain axis [10].

Regular exercise has been shown to increase the levels of endocannabinoids while also positively altering the composition of the GM [11,12]. However, overtraining and insufficient recovery can disrupt this beneficial balance, leading to dysregulation in both the ECS and gut microbiota. Such disturbances can manifest as increased inflammation, mood instability, and a weakened immune system, ultimately compromising physical and mental health [13,14].

The current experiment has been designed involving dancers, which is a group particularly vulnerable to significant physical and psychological stress due to their intensive training regimens. Psychological stress has been identified as a significant factor that increases the risk of injuries among dancers as observed in a study on first-year contemporary dance students [15]. Additionally, the habit of continuing to train despite experiencing pain, common among dancers, not only diminishes the quality of their movements but also exacerbates their psychological stress, further compounding their risk of injury. This behavior and its impacts on movement quality and stress levels were detailed in a separate study [16]. These dynamics highlight the necessity for a comprehensive approach to injury prevention and management tailored to dancers, who are exceptionally susceptible to both physical and psychological stress due to their demanding training schedules.

The primary outcomes of our study are the levels of cannabinoid receptor 2 (CB2) and fatty acid amide hydrolase (FAAH). We aimed to assess whether probiotic supplementation (Sanprobi Stress; *Lactobacillus helveticus* (Rosell-52) and *Bifidobacterium longum* (Rosell-17)) could reduce CB2 expression without affecting FAAH levels, suggesting a mechanism where the probiotic modulates the ECS by targeting CB2 receptors, which are involved mainly in immune responses. Alternatively, the probiotics could reduce inflammation through non-ECS pathways such as enhancing intestinal barrier integrity, modifying gut microbiota, or direct anti-inflammatory actions. If these mechanisms decrease FAAH activation, they would maintain higher levels of anandamide, which helps manage inflammation

and pain. This could reduce systemic inflammation, potentially improving the well-being and performance of dancers under high stress.

The secondary outcomes of our study include indirect indicators that could reflect the functioning of the endocannabinoid system. These encompassed the threshold for mechanical pain perception, the occurrence of abdominal pain, assessments of sleep quality and sleep onset latency, and evaluations of fatigue. These metrics were chosen to provide a comprehensive view of the physiological changes potentially influenced by alterations in the endocannabinoid system following probiotic therapy.

## 2. Results

### 2.1. Anthropometric Profile, Dietary Composition

Due to exclusions and the meticulous selection of participants based on anthropometric measurements and activity level, the required group size calculated for the study was not met. Recruitment began in October 2022 and concluded in March 2023. In the experimental protocol, from an initial pool of 51 volunteers, a selection process was conducted to identify participants who met the inclusion criteria. This resulted in the selection of 26 female individuals. However, when it came time for the collection of blood and stool samples, only 20 dancers attended. Additionally, three of these participants did not return to collect the study's supplement, and they did not provide reasons for their absence. Ultimately, 17 female dancers completed the study.

During the statistical analysis phase, two participants were excluded as outliers. This decision was based on the one participant's body mass index (BMI), which indicated overweight status and was significantly different from the BMI values of the other group members. Due to substantial discrepancies in the FAAH and CB2 results of another participant, which were over two times higher than those observed in the rest of the group, this individual was also excluded from further statistical analysis of blood markers and questionnaires.

The flow of participants' involvement in the study is presented in a diagram (Figure 1). During the course of the study, none of the participants reported any adverse effects or chose to withdraw due to such effects. This observation suggests that the interventions, including the probiotic supplementation and placebo treatments, were well tolerated among the participants.

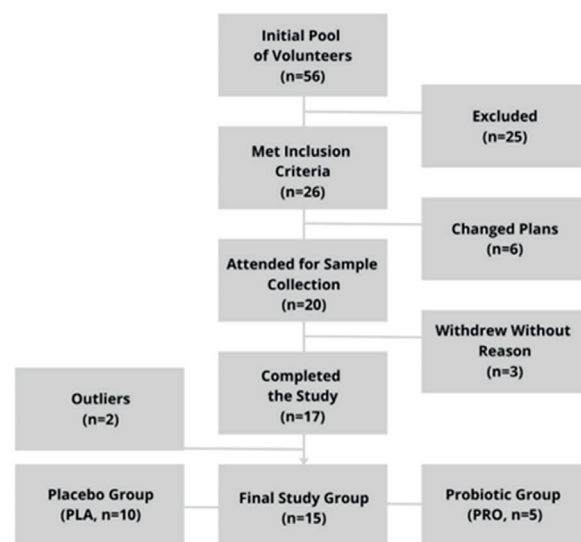


Figure 1. Study inclusion flow-diagram.

All participants were female. Based on the provided baseline characteristics in Table 1, the placebo group (PLA) and the probiotic group (PRO) appear to be well-matched across several parameters. The age range is similar between the groups with a mean age of approximately 21 for PLA and 20 for PRO. Both groups have nearly identical body fat percentages and display no significant differences in body mass index (mean 21 in both groups). The physical activity levels and hand-grip test results are also comparable between the two groups, suggesting that the study participants were likely to be homogeneous in terms of physical characteristics and fitness levels at the outset of the study.

**Table 1.** Baseline group characteristics.

	PLA (n = 11)	PRO (n = 5)	Total (n = 16)	PLA vs. PRO
	Mean ± SD (Min–Max)	Mean ± SD (Min–Max)	Mean ± SD (Min–Max)	t-Test/U Mann-Whitney (p Value)
Age [years]	20.55 ± 1.04 (19–22)	20.00 ± 1.30 (19–22)	20.44 ± 1.09 (19–22)	0.55
Body mass [kg]	58.07 ± 6.95 (49.40–68.70)	60.10 ± 7.31 (48.60–68.30)	58.08 ± 6.81 (48.60–68.70)	0.99
BMI (body mass index) [kg/m <sup>2</sup> ]	21.05 ± 2.18 (17.70–23.40)	20.80 ± 2.29 (18.10–25.10)	21.02 ± 2.13 (17.70–25.10)	0.93
Fat [% body mass]	27 ± 4 (21–31)	27 ± 3 (25–31)	27 ± 3 (21–31)	0.84
Physical activity level [hours per week]	17 h 7 min ± 6 h 59 min (8 h–33 h)	16 h ± 9 h 46 min (9 h 30 min–29 h)	16 h 46 min ± 7 h 38 min (8 h–33 h)	0.69
Hand-grip test [kg]	28.13 ± 4.67 (20.07–38.13)	26.16 ± 5.33 (17.5–30.2)	27.51 ± 4.80 (17.5–38.13)	0.73

Diet is a significant factor that modifies the gut microbiome and potentially the endocannabinoid system; therefore, an analysis of dietary habits was conducted. The comparative analysis of the participants' diets revealed no significant differences between the groups in energy and main nutrients. Both groups have overlapping ranges in their intake, suggesting there were no significant statistical differences in their diets. The estimated energy and fiber intakes shows some difference in mean values, yet the ranges still overlap, suggesting individual variation but no clear division between the groups. The characteristics of the diet are presented in Table 2.

**Table 2.** Baseline diet characteristics of study participants.

	PLA (n = 11)	PRO (n = 5)	Total (n = 16)	PLA vs. PRO
	Mean ± SD (Min–Max)	Mean ± SD (Min–Max)	Mean ± SD (Min–Max)	t-Test/U Mann-Whitney (p Value)
Energy [kcal]	1999.23 ± 279.81 (1588.93–2578.45)	2325.54 ± 425.00 (1835.0–2842.6)	2101.20 ± 353.22 (1588.93–2842.6)	0.26
Protein [g]	85.29 ± 30.13 (49.52–154.26)	100.47 ± 21.09 (79.42–130.92)	90.03 ± 27.87 (49.52–154.26)	0.51
Fat [g]	74.56 ± 13.93 (57.69–95.74)	90.47 ± 18.72 (67.02–115.73)	79.54 ± 16.76 (57.69–115.73)	0.41
Carbohydrates [g]	271.12 ± 53.14 (194.89–359.42)	298.79 ± 57.98 (240.54–376.75)	279.77 ± 54.36 (194.89–376.75)	0.75
Fiber [g]	28.96 ± 15.13 (16.69–47.68)	21.36 ± 12.67 (15.03–27.63)	26.59 ± 14.44 (15.03–47.68)	0.91

## 2.2. Endocannabinoid System, Pain, Sleep and Fatigue

In Table 3, changes in levels of the cannabinoid receptor 2 (CB2) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) before and after 3 months of supplementation with either probiotics

(PRO) or placebo (PLA) are presented. To evaluate the expression of proteins in the endocannabinoid system, the concentrations of cannabinoid receptor 2 (CB2) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) in the serum were measured using enzyme-linked immunosorbent assays (double-antibody sandwich ELISA).

**Table 3.** Markers related to endocannabinoid system before and after the 3 months of supplementation with probiotics or placebo (ELISA, serum—CB2, FAAH).

	PLA ( <i>n</i> = 10) Mean ± SD (Min–Max)		PRO ( <i>n</i> = 5) Mean ± SD (Min–Max)		2-Way ANOVA <i>p</i> -Value; ( $\eta^2$ )		
	Pre	Post	Pre	Post	GROUP	TIME	GROUP × TIME
CB2 [ng/mL]	0.86 ± 1.21	0.72 ± 0.75	0.55 ± 0.32	0.29 ± 0.11	0.4168 (0.0513)	0.1865 (0.1302)	0.7083 (0.0111)
FAAH [ng/mL]	6.46 ± 0.68	6.94 ± 1.13	5.93 ± 1.15	6.02 ± 0.97	0.1293 (0.1679)	0.3500 (0.0674)	0.5100 (0.0341)

$\eta^2$ —effect size; *p* < 0.05 was considered as significant.

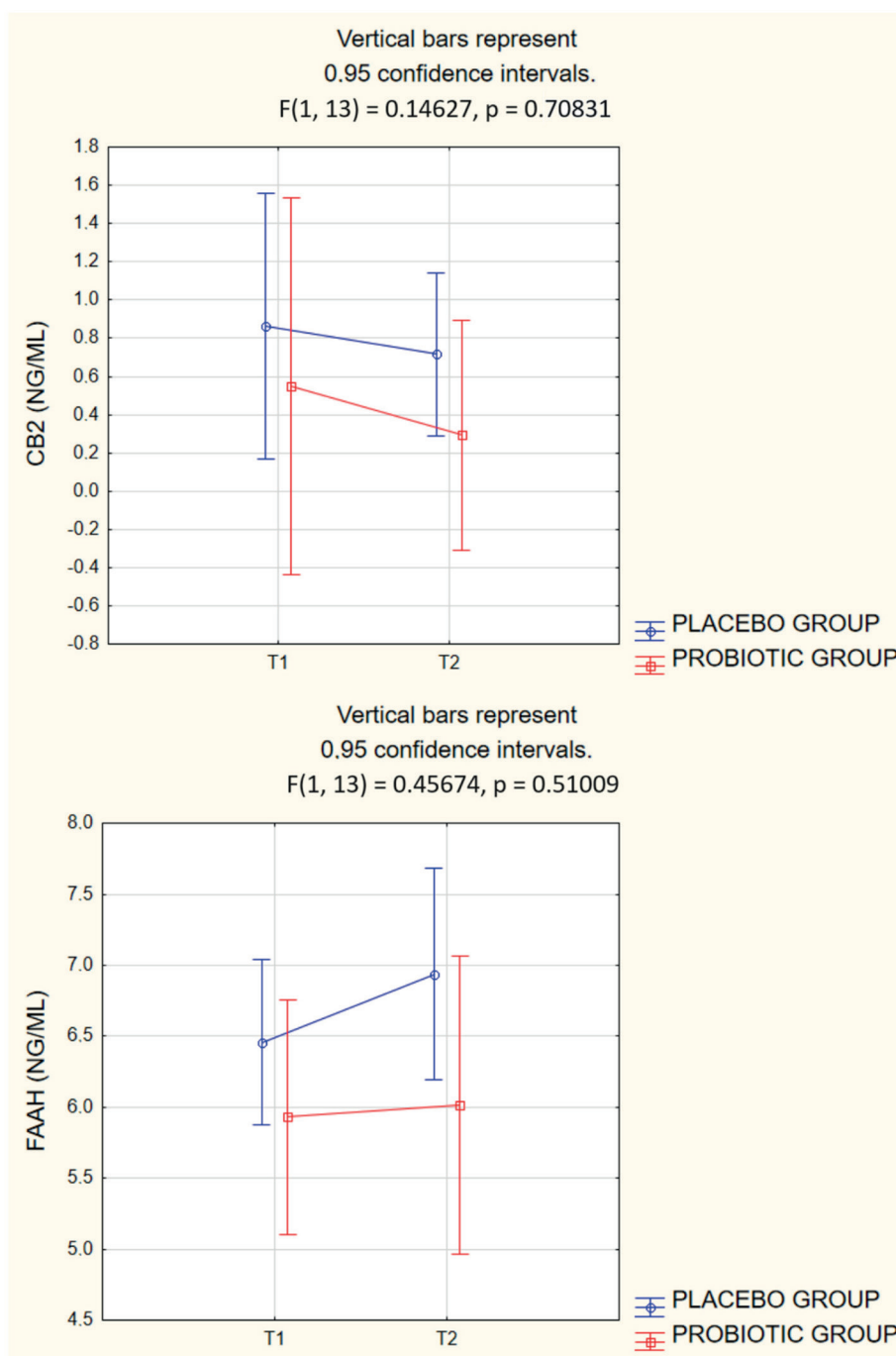
Figure 2 displays the comparative results of CB2 and FAAH levels before and after supplementation in the PLA and PRO groups, including 95% confidence intervals.

In Table 4, the data reflect an indirect assessment of the endocannabinoid system's activity following a three-month supplementation period with either probiotics or a placebo, encompassing several domains: pain, sleep and fatigue.

**Table 4.** Quality of life and behavioral indicators before and after three months of supplementation with probiotics or placebo.

	PLA ( <i>n</i> = 10) Mean ± SD (Min–Max)		PRO ( <i>n</i> = 5) Mean ± SD (Min–Max)		2-Way ANOVA <i>p</i> -Value; ( $\eta^2$ )		
	Pre	Post	Pre	Post	GROUP	TIME	GROUP × TIME
Abdominal pain (ROME IV) [0 (never)–10 (always)]	4.1 ± 1.60	3.5 ± 1.43	3 ± 1.58	2.8 ± 1.79	0.2896 (0.0857)	0.1710 (0.1391)	0.4815 (0.0388)
Pressure–pain test [N]	26.4 ± 15.04	22.5 ± 7.04	20.9 ± 5.95	19.9 ± 5.46	0.4317 (0.0482)	0.3696 (0.0623)	0.5781 (0.0244)
Sleep quality (PSQI) [0 (best)–3 (worst)]	0.8 ± 0.63	1.2 ± 0.42	1.4 ± 0.55	1 ± 1.23	0.5365 (0.0301)	1.000 (0.0000)	0.0784 (0.2192)
Sleep latency (PSQI) [min]	17.6 ± 22.58	27.6 ± 36.24	15.2 ± 13.52	15 ± 10.60	0.5920 (0.0227)	0.2511 (0.1000)	0.2333 (0.1073)
Fatigue (FAS) (0–32)	15.9 ± 8.03	13.1 ± 5.41	18.6 ± 2.70	12.4 ± 4.62	0.7387 (0.0089)	0.0130 (0.3888)	0.2970 (0.0832)
Active strategies (Mini-COPE) [0 (never)–4 (always)]	3.2 ± 0.75	2.9 ± 0.74	3.1 ± 0.89	2.8 ± 1.10	0.8171 (0.0043)	0.0977 (0.1967)	1.0000 (0.0000)

$\eta^2$ —effect size; *p* < 0.05 was considered as significant.



**Figure 2.** Graphs of two-way ANOVA for CB2 and FAAH levels in groups before and after probiotic therapy or placebo treatment.

### 3. Discussion

#### 3.1. Endocannabinoid System

To date, clinical trial results evaluating the levels of fatty acid amide hydrolase (FAAH) following probiotic supplementation have not been published. This represents an untapped area within clinical research that merits attention given the enzyme's role in degrading endocannabinoids. Although studies on cannabinoid receptor 2 (CB2) are beginning to appear, the effects of probiotics on FAAH have not been extensively explored.

For the PLA group, the CB2 levels were measured at 0.86 ng/mL before supplementation and 0.72 ng/mL after supplementation. In the PRO group, CB2 levels were recorded at 0.55 ng/mL before supplementation and 0.29 ng/mL after 3 months. The two-way ANOVA showed an F-value (1, 13) of 0.64612 and a *p*-value of 0.43595, suggesting no significant effects for group interaction, time, or group-by-time interaction.

In a landmark study from the field it was discovered that the administration of *Lactobacillus acidophilus* in mice could upregulate the intestinal expression of cannabinoid receptors, significantly mitigating visceral pain through a mechanism mediated by CB2 and opioid receptors, thereby underscoring the endocannabinoid system's (ECS) pivotal role in managing intestinal health [17]. Building on these and further insights, a recent comprehensive review elaborated on the ECS's regulatory functions across gastrointestinal physiology. This review methodically detailed the system's impact on gastrointestinal motility, secretion, inflammation, and its influence on visceral pain perception [18]. Inflammatory bowel disease (IBD), like Crohn's disease and ulcerative colitis, follows irritable bowel syndrome as another group of chronic gastrointestinal conditions where the endocannabinoid system modulates inflammation and homeostasis, suggesting cannabinoid-based therapies as promising potential treatments [19].

IBS, along with migraines and fibromyalgia, is considered part of the hypothesized "endocannabinoid deficiency syndrome" as proposed by researchers. This theory suggests that low endocannabinoid levels might contribute to the symptoms of these conditions, such as chronic pain and digestive issues. Addressing endocannabinoid deficiencies could, therefore, offer a new avenue for treatment. This concept supports the potential benefits of cannabinoid-based therapies in managing these disorders [20].

In the first clinical study of its kind, 20 Caucasian women with mild to moderate abdominal pain received *Lactobacillus acidophilus* NCFM either alone or combined with B-LBi07 for 21 days. While L-NCFM alone was associated with increased mu-opioid receptor (MOR) activity, it also led to a decrease in cannabinoid receptor 2 (CB2) expression [21]. In a study from 2024, it was discovered that combining the prebiotic inulin with the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* significantly increased the expression of the CB2 receptor while leaving CB1 receptor expression unchanged. This finding opens new avenues for exploring how dietary components can influence the endocannabinoid system, particularly in modulating specific receptor pathways without affecting others, in patients with coronary artery disease [22].

In dogs with colonic dysmotility, administration of the probiotic resulted in significant changes in the intestinal mucosa. Specifically, the treatment led to a decrease in the number of mucosal mast cells and an increase in cells expressing cannabinoid receptors CB1 and CB2, which are changes that correlated positively with improved clinical scores for canine chronic enteropathy activity index (CCECAI) post-treatment [23]. In a study examining the impact of antibiotic-induced intestinal dysbiosis on mice, significant shifts in gut microbiota were observed, including increases in *Bacteroides*, *Clostridium coccooides*, and *Lactobacillus* species, and a decrease in *Bifidobacterium*. This dysbiosis was linked to a notable upregulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) expression. An enhanced expression of CB2 was associated with reduced visceral pain and increased colonic contractility, highlighting the role of commensal microbiota in modulating gut neuro-immune sensory systems and potentially informing treatments for conditions like irritable bowel syndrome (IBS) [24].

It was not possible for us to conduct chromatography, which is considered the most sensitive method. However, the detection of CB2 protein in blood is still feasible due to its

expression on the surface of certain human peripheral blood leukocytes, specifically B cells. This is supported by findings showing CB2 protein localization at both extracellular and intracellular sites, enabling its measurement in blood samples [25].

For FAAH levels, the PLA group had levels of 6.46 ng/mL before supplementation and 6.94 ng/mL afterwards. In the PRO group, FAAH levels were 5.93 ng/mL before supplementation and 6.02 ng/mL after supplementation. These FAAH level measurements resulted in an F-value (1, 13) of 0.14627 and a *p*-value of 0.70831, reflecting no statistically significant differences between groups over time.

One of the earliest studies to investigate the interaction between probiotics and FAAH modulation demonstrated that inhibiting FAAH can alleviate depression-like symptoms in stressed rats. In this experiment, rats subjected to repeated social defeat were treated with the FAAH inhibitor URB694, which not only reduced depressive-like behaviors and neuroendocrine changes but also stabilized shifts in gut microbiota and lipid profiles [26]. In a molecular study, the effects of both active and heat-inactivated forms of *Akkermansia muciniphila*, along with its derived outer membrane vesicles (OMVs) and cell-free supernatant, were investigated on the gene expression related to the endocannabinoid system (ECS) in Caco-2 and HepG-2 cell lines. The study focused on key ECS components including cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), fatty acid amide hydrolase (FAAH), and various peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ , and  $\gamma$ ). Quantitative real-time PCR analysis demonstrated a significant modulation of these genes, suggesting that both bacterial forms and their derivatives might influence metabolic pathways, offering potential therapeutic strategies against obesity, metabolic disorders, and liver diseases [27].

Some sources suggest that FAAH may be undetectable in blood. Nonetheless, measurements were conducted according to the manufacturer's instructions for serum assays. Despite FAAH being an intracellular enzyme, there are two isoforms in humans: FAAH1, located on intracellular membranes, and FAAH2, which may be membrane-bound with a potentially extracellular orientation of the active site [28]. Additionally, studies on the detection of cell-free DNA in plasma indicate that physically active individuals, such as dancers, subjected to rigorous physical exertion and psychological stress, may experience cellular damage due to inflammatory responses [29,30]. These factors could potentially contribute to the presence of FAAH in the serum.

### 3.2. Pain, Sleep and Fatigue

Participants in the PLA group had abdominal pain scores of 4.1 before supplementation and 3.5 after supplementation with pressure-pain thresholds of 26.4 before supplementation and 22.5 after supplementation. Participants in the PRO group had abdominal pain scores of 3.1 before supplementation and 2.8 after supplementation with pressure-pain thresholds of 20.9 before supplementation and 19.9 after supplementation. The two-way ANOVA yielded an F-value (1, 13) of 0.52525 and a *p*-value of 0.48145 for abdominal pain. The analysis for pressure-pain thresholds reported an F-value (1, 13) of 0.32551 and a *p*-value of 0.57805.

While probiotics have shown some effectiveness in alleviating abdominal pain associated with irritable bowel syndrome (IBS) in children, results in older adult groups are not as conclusive. In our study, we did not observe significant differences between the probiotic and placebo groups, highlighting the variability in probiotic efficacy across different age groups and potentially different IBS symptoms [31–33].

Before our study, assessments of mechanical pain thresholds following probiotic administration were conducted in animal models by other researchers. These studies indicated that both diet-induced obese (DIO) mice and their normal weight (NW) counterparts showed significantly reduced sensitivity to mechanical stimulation when supplemented with a specific strain of probiotics [34,35].

For the PLA group, the sleep quality index scores were 0.8 before supplementation and 1.2 after supplementation. For the PRO group, these scores were 1.4 before supplementation and 1 after supplementation. The two-way ANOVA showed an F-value of 3.6491 and a

$p$ -value of 0.07841 (a trend toward quality increase). The sleep latency for the PLA group was 17.6 min before supplementation and 27.6 min after supplementation. For the PRO group, it was 15.2 min before supplementation and 15 min after supplementation. The two-way ANOVA reported an  $F$ -value of 1.5628 and a  $p$ -value of 0.23329.

A 2023 meta-analysis investigated the bidirectional relationship between gut microbiota and circadian rhythms, focusing on the impact of probiotic or prebiotic interventions on sleep quality and duration. Utilizing databases such as PubMed, Embase, CINAHL, and Web of Science, the study analyzed 18 articles from an initial pool of 219, concluding that gut microbiota modulation did not significantly improve sleep quality ( $p = 0.31$ ) or duration ( $p = 0.43$ ) [36]. In a 2024 clinical trial, it was observed that while the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) indicators of sleep quality did not significantly change after nine weeks of multi-strain probiotic (MSP) therapy, the time taken to fall asleep was reduced compared to placebo. The study, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, involved 70 healthy men and women who were supplemented daily with either multi-strain probiotic or a placebo [37]. In another clinical trial, 40 participants with stress-induced insomnia received either *B. breve* CCFM1025 or a placebo. Over four weeks, the probiotic group's Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) total scores significantly improved from 11.60 to 7.750, while the placebo group saw only minimal change from 10.10 to 8.650. This suggests *B. breve* CCFM1025 may effectively enhance sleep quality [38]. In a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial involving 53 female participants with fibromyalgia syndrome (FMS), the effects of probiotics ( $4 \times 10^{10}$  CFUs per day for 18 participants) and prebiotics (10 g of inulin per day for 17 participants) were compared over 8 weeks. The probiotics group showed significant improvements in Beck Depression Index, Beck Anxiety Index, PSQI, and pain (Visual Analogue Scale) scores compared to the placebo group, while the prebiotics group primarily saw significant improvements in subjective sleep quality [39].

In our study, dancers in the PRO group reported an activity level of approximately 16 h per week, and those in the PLA group reported about 17 h. These activity levels were maintained throughout the duration of the study, and participants were asked to report any changes in their activity levels. Epidemiological evidence suggests a positive correlation between the incidence of injury and the duration of dance training with a threshold identified at approximately 11.5 h per week. Gender-specific vulnerability is observed, wherein females display a heightened predisposition toward osseous injuries, whereas males exhibit a greater susceptibility to contusions and tendinopathies [40,41]. Fatigue levels for the PLA group were scored at 15.9 before supplementation and 13.1 after supplementation. In the PRO group, the scores were 18.6 before supplementation and 12.4 after supplementation. The two-way ANOVA showed an  $F$ -value (1,13) of 1.1803 and a  $p$ -value of 0.29702. A significant group interaction effect was observed in the assessment of fatigue; however, the reduction over time was similar across both groups. Active coping strategy scores for the PLA group were 3.2 before supplementation and 2.9 after supplementation. For the PRO group, these scores were 3.1 before supplementation and 2.8 after supplementation. The two-way ANOVA yielded an  $F$ -value (1, 13) of 0.00000 and a  $p$ -value of 1.0000. A recent systematic review highlighted that changes in the gut microbiota composition—particularly, reductions in pathogenic bacteria and increases in beneficial ones—are associated with diminished fatigue. These changes are thought to enhance gut barrier integrity, reduce inflammation, and adjust neurotransmitter levels that impact central nervous system function, thus influencing fatigue [42]. Research involving fecal microbiota transplantation (FMT) in patients with IBS has shown that altering the gut microbiota can inversely correlate with fatigue severity. Specifically, increases in beneficial bacteria such as *Alistipes* spp. and *Faecalibacterium prausnitzii* were associated with reduced IBS symptoms and fatigue [43]. Moreover, a pilot study with 70 patients suffering from post-infectious fatigue who received a multi-strain probiotic or placebo demonstrated that probiotics could significantly improve fatigue, mood, and quality of life with greater benefits observed in the probiotic group [44]. Additionally, a randomized controlled trial (RCT) highlighted that probiotics, particularly strains like *Lactobacillus casei* Shirota and

*Bifidobacterium infantis* 35624, can reduce anxiety and inflammation in patients with chronic fatigue syndrome (CFS), further supporting the role of the gut microbiota in managing fatigue-related disorders [45]. Another study evaluated the impact of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19, *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748, and *Bifidobacterium lactis* Bb12 on fatigue and physical activity in CFS patients. Initial findings indicated improvements in neurocognitive functions, although no significant changes were noted in fatigue or physical activity levels [46].

### 3.3. Limitations

Our study faced several limitations, including a sample size that was insufficient to attain the necessary statistical power. Additionally, the study lacked follow-up assessments which could have provided more comprehensive data over time. Diverse dosages and combinations, such as varying probiotic amounts or the inclusion of prebiotics, were not explored. Moreover, while immunoassay tests were utilized for measuring concentrations of endocannabinoid system indicators, chromatography would have been the preferred method for more precise and reliable results.

## 4. Conclusions

Although this study did not observe significant effects on cannabinoid receptor type 2 (CB2) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) levels through probiotic supplementation, the findings suggest the need for further investigations with a larger cohort and varied dosages or the use of synbiotics to explore the full potential of probiotics on the ECS. Additionally, the trend toward improved sleep quality in the probiotic group highlights the possibility that enhancing sleep among athletes could be a valuable approach to optimizing recovery. These preliminary insights advocate for expanded research to refine probiotic formulations and dosing strategies to maximize their therapeutic benefits, particularly in athletic and high-stress environments.

## 5. Materials and Methods

### 5.1. Study Group

The calculations using G-Power application indicated that to have a strong chance (80% power) of detecting a medium-sized effect (Cohen's  $d = 0.5$ ) in our study, we would need 63 participants (male and female) in each group. This applies to the main variable in this study, which was CB2. The study included participants who were aged between 18 and 36 years and engaged in professional dancing activities with more than 8 h of training per week. Individuals were excluded from the study if they were younger than 18 or older than 36 years, had sustained injuries within the three months leading up to the study, had consumed prebiotics and/or probiotics in the three months preceding the study, had been hospitalized in the four weeks before the study began, had traveled to tropical countries within four weeks prior to the study, or had taken antibiotics, cannabis products, steroids, and anabolic steroids in the four weeks leading up to the study.

### 5.2. Study Protocol

Fifteen participants were selected for the analysis of primary and secondary outcomes with 10 receiving a placebo (PLA) and 5 receiving the probiotic (PRO) treatment. The randomization scheme was generated using a computer-based algorithm (block randomization with block size of four). The randomization was generated by the manufacturer of the probiotic under study. The distribution of participants between the placebo group ( $n = 10$ ) and the treatment group ( $n = 5$ ) in the final study group was impacted by elevated dropout rates and the presence of outliers, which were predominantly in the treatment group. While our objective was to sustain equal group sizes, we prioritized preserving the integrity of the randomization process.

Blinding included both the authors of the study and the participants. The randomized group of participants consumed a probiotic containing strains of *Lactobacillus helveticus* (Rosell-52) and *Bifidobacterium longum* (Rosell-17), at doses of  $3 \times 10^9$  CFU (colony-forming units) per capsule, in the mornings for 12 weeks (March–June, 2022), while another group received a placebo. Maltodextrin

and cornstarch, which are carriers of the probiotic, were used as placebos in capsules identical to the probiotic in terms of mass and appearance. Supplemented probiotics were considered safe and well-tolerated in the healthy population, and the tested product held the necessary safety certificates. The research procedures were conducted twice: before the intervention and after its completion. The study was registered as a clinical trial in the [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) database under the number NCT05567653. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and with the approval of the Bioethics Committee of the Poznan University of Medical Sciences (approval No. 412/22, 19 May 2022). To create the report, the CONSORT 2010 guidelines were used. No changes were made to the trial outcomes after the trial commenced.

### 5.3. Methods

In preparation for the clinical trial, detailed anthropometric measurements and dietary information were collected from the participants one week prior to the scheduled blood sampling. At the informational meeting, participants were instructed to maintain their usual dietary habits throughout the duration of the study while meticulously reporting any changes in diet, the occurrence of exclusion factors, and potential adverse effects. Additionally, they were advised to attend the blood sampling session in a rested state, after a light dinner, and following a 2–3 day break from training activities.

To evaluate the expression of proteins in the endocannabinoid system, the concentrations of cannabinoid receptor 2 (CB2) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) in the serum were measured using enzyme-linked immunosorbent assays. FAAH and CB2 protein levels were measured using a double-antibody sandwich ELISA kits from SunRed Biotechnology Company. The assay range for FAAH was 0.15–30 ng/mL with a sensitivity of 0.116 ng/mL, and for CB2, it was 0.3–90 ng/mL with a sensitivity of 0.285 ng/mL. The procedure included negative control samples to ensure the specificity of detection for the proteins of interest. Blood samples (10 mL) were collected fasting, one day before the initiation of supplementation with either the probiotic or placebo, and then again after 3 months (12 weeks) from the start of the study. The blood samples were immediately frozen and stored until analysis ELISA could be conducted. A morphological analysis was also performed (flow cytometry) directly after the blood collection. The morphological analysis was conducted to exclude individuals with atypical results regarding specific blood cell populations, primarily leukocytes and lymphocytes, which are more specific to CB2 expression than other cells.

Nutritional status was assessed through analysis of dietary records and evaluation of blood morphology. Nutritional intake was assessed using the NUVERO software (2023 version, available for use in the browser, continuously updated), which was based on three-day dietary records. Supplementary to these tests, the pain threshold in response to mechanical pressure was assessed using an algometer applied to the thumb flexor, and grip strength was measured using a hand dynamometer. The mechanical pain threshold was tested through the three-time application of an algometer on the thumb adductor after adaptation to room temperature. The result is the average of three measurements. Grip strength was measured in a standing position with the arm directed downwards and the palm facing the thigh. The result is the average of three measurements.

Data were collected using measuring devices and the study leader's computer (.xls format). Statistical analysis was performed using the STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) package. For comparing baseline data between groups, the *t*-test or Mann–Whitney U-test was used if the normality condition was not met. The Shapiro–Wilk test was used to check the data for normality of distribution. To compare variables after 3 months of supplementation with either probiotic or placebo, the *t*-test or Wilcoxon test was used if the normality condition was not met. A two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used to analyze the differences in the effect of time, group and time by group. For all statistical tests, a *p* value less than 0.05 was interpreted as statistically significant. For statistically significant results, the coefficients  $\eta^2$  are presented as an indicator of the effect size.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.W., K.S.-Ż. and J.K.; Methodology, J.W., K.K., I.L., K.S.-Ż. and J.K.; Validation, T.P. and J.K.; Formal analysis, J.W., I.L. and J.K.; Investigation, J.W., T.P., K.K., I.L. and K.S.-Ż.; Resources, T.P. and K.K.; Data curation, J.W., T.P., K.K. and J.K.; Writing—original draft, J.W. and J.K.; Writing—review and editing, J.W.; Visualization, J.W.; Supervision, K.S.-Ż. and J.K.; Project administration, J.W. and J.K.; Funding acquisition, J.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Poznan University of Medical Sciences (approval No. 412/22, 19 May 2022) for studies involving humans.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Rahaman, O.; Ganguly, D. Endocannabinoids in immune regulation and immunopathologies. *Immunology* **2021**, *164*, 242–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Alger, B.E.; Kim, J. Supply and Demand for Endocannabinoids. *Trends Neurosci.* **2011**, *34*, 304–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wilson, R.I.; Nicoll, R.A. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* **2002**, *296*, 678–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. LoVerme, J.; La Rana, G.; Russo, R.; Calignano, A.; Piomelli, D. The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci.* **2005**, *77*, 1685–1698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Di Marzo, V.; De Petrocellis, L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2012**, *367*, 3216–3228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J.C.; Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **1994**, *372*, 686–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Fowler, C.J.; Jonsson, K.O.; Tiger, G. Fatty acid amide hydrolase: Biochemistry, pharmacology, and therapeutic possibilities for an enzyme hydrolyzing anandamide, 2-arachidonoylglycerol, palmitoylethanolamide, and oleamide. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 517–526. [[CrossRef](#)]
8. Zaniculescu, A.; Nitulescu, G.; Mihai, D.P.; Nitulescu, G.M. Identifying FAAH Inhibitors as New Therapeutic Options for the Treatment of Chronic Pain through Drug Repurposing. *Pharmaceuticals* **2021**, *15*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Cani, P.D.; Plovier, H.; Van Hul, M.; Geurts, L.; Delzenne, N.M.; Druart, C.; Everard, A. Endocannabinoids--at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 133–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Cryan, J.F.; Dinan, T.G. Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* **2012**, *13*, 701–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Meeusen, R.; De Meirleir, K. Exercise and brain neurotransmission. *Sports Med.* **1995**, *20*, 160–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Clarke, S.F.; Murphy, E.F.; O'Sullivan, O.; Lucey, A.J.; Humphreys, M.; Hogan, A.; Hayes, P.; O'Reilly, M.; Jeffery, I.B.; Wood-Martin, R.; et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* **2014**, *63*, 1913–1920. [[CrossRef](#)]
13. Armstrong, L.E.; VanHeest, J.L. The unknown mechanism of the overtraining syndrome: Clues from depression and psychoneuroimmunology. *Sports Med.* **2002**, *32*, 185–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. JanssenDuijghuijsen, L.M.; Mensink, M.; Lenaerts, K.; Fiedorowicz, E.; Protégé study group; van Dartel, D.A.; Mes, J.J.; Luiking, Y.C.; Keijer, J.; Wichers, H.J.; et al. The effect of endurance exercise on intestinal integrity in well-trained healthy men. *Physiol. Rep.* **2016**, *4*, e12994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Van Winden, D.; van Rijn, R.M.; Savelsbergh, G.J.P.; Oudejans, R.R.D.; Stubbe, J.H. The Association Between Stress and Injury: A Prospective Cohort Study Among 186 First-Year Contemporary Dance Students. *Front. Psychol.* **2021**, *12*, 770494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hendry, D.; Campbell, A.; Smith, A.; Hopper, L.; Straker, L.; O'Sullivan, P. Movement quantity and quality: How do they relate to pain and disability in dancers? *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0268444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Rousseaux, C.; Thuru, X.; Gelot, A.; Barnich, N.; Neut, C.; Dubuquoy, L.; Dubuquoy, C.; Merour, E.; Geboes, K.; Chamailard, M.; et al. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 35–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Brierley, S.M.; Greenwood-Van Meerveld, B.; Sarnelli, G.; Sharkey, K.A.; Storr, M.; Tack, J. Targeting the endocannabinoid system for the treatment of abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2023**, *20*, 5–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Hryhorowicz, S.; Kaczmarek-Ryś, M.; Zielińska, A.; Scott, R.J.; Słomski, R.; Pławski, A. Endocannabinoid System as a Promising Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease—A Systematic Review. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 790803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. Russo, E.B. Clinical endocannabinoid deficiency (CECD): Can this concept explain therapeutic benefits of cannabis in migraine, fibromyalgia, irritable bowel syndrome and other treatment-resistant conditions? *Neuro Endocrinol. Lett.* **2004**, *25*, 31–39.
21. Ringel-Kulka, T.; Goldsmith, J.R.; Carroll, I.M.; Barros, S.P.; Palsson, O.; Jobin, C.; Ringel, Y. *Lactobacillus acidophilus* NCFM affects colonic mucosal opioid receptor expression in patients with functional abdominal pain—A randomised clinical study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2014**, *40*, 200–207. [[CrossRef](#)]
22. Liu, M.; Tandorost, A.; Moludi, J.; Dey, P. Prebiotics Plus Probiotics May Favorably Impact on Gut Permeability, Endocannabinoid Receptors, and Inflammatory Biomarkers in Patients with Coronary Artery Diseases: A Clinical Trial. *Food Sci. Nutr.* **2023**, *12*, 1207–1217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rossi, G.; Gioacchini, G.; Pengo, G.; Suchodolski, J.S.; Jergens, A.E.; Allenspach, K.; Gavazza, A.; Scarpona, S.; Berardi, S.; Galosi, L.; et al. Enterococcal increase of cannabinoid receptor type 1 and type 2 and clinical improvement after probiotic administration in dogs with chronic signs of colonic dysmotility without mucosal inflammatory changes. *Neurogastroenterol. Motil.* **2020**, *32*, e13717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Aguilera, M.; Cerdà-Cuellar, M.; Martínez, V. Antibiotic-induced dysbiosis alters host-bacterial interactions and leads to colonic sensory and motor changes in mice. *Gut Microbes* **2015**, *6*, 10–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Castaneda, J.T.; Harui, A.; Kiertscher, S.M.; Roth, J.D.; Roth, M.D. Differential expression of intracellular and extracellular CB(2) cannabinoid receptor protein by human peripheral blood leukocytes. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* **2013**, *8*, 323–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Barbetti, M.; Mancabelli, L.; Vacondio, F.; Longhi, G.; Ferlenghi, F.; Viglioli, M.; Turrone, F.; Carnevali, L.; Mor, M.; Ventura, M.; et al. Social stress-induced depressive-like symptoms and changes in gut microbial and lipidomic profiles are prevented by pharmacological inhibition of FAAH activity in male rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2024**, *131*, 110963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ghaderi, F.; Sotoodehnejadnematollahi, F.; Hajebrahimi, Z.; Fateh, A.; Siadat, S.D. Effects of active, inactive, and derivatives of *Akkermansia muciniphila* on the expression of the endocannabinoid system and PPARs genes. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 10031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Steve, P.H. Alexander, Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH). In *Bylund, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*; Enna, S.J., David, B., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2009; pp. 1–7. ISBN 9780080552323. [[CrossRef](#)]
29. Atamaniuk, J.; Vidotto, C.; Tschan, H.; Bachl, N.; Stuhlmeier, K.M.; Müller, M.M. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 1668–1670. [[CrossRef](#)]
30. Fatouros, I.G.; Destouni, A.; Margonis, K.; Jamurtas, A.Z.; Vrettou, C.; Kouretas, D.; Mastorakos, G.; Mitrakou, A.; Taxildaris, K.; Kanavakis, E.; et al. Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 1820–1824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Fatahi, S.; Hosseini, A.; Sohoul, M.H.; Sayyari, A.; Khatami, K.; Farsani, Z.F.; Amiri, H.; Dara, N.; de Souza, I.G.O.; Santos, H.O. Effects of probiotic supplementation on abdominal pain severity in pediatric patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *World J. Pediatr.* **2022**, *18*, 320–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wallace, C.; Gordon, M.; Sinopoulou, V.; Akobeng, A.K. Probiotics for management of functional abdominal pain disorders in children. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2023**, *2*, CD012849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Didari, T.; Mozaffari, S.; Nikfar, S.; Abdollahi, M. Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 3072–3084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Dardmeh, F.; Nielsen, H.I.; Alipour, H.; Kjærgaard, B.; Brandsborg, E.; Gazerani, P. Potential Nociceptive Regulatory Effect of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* PB01 (DSM 14870) on Mechanical Sensitivity in Diet-Induced Obesity Model. *Pain Res. Manag.* **2016**, *2016*, 5080438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Alipour, H.; Gazerani, P.; Heidari, M.; Dardmeh, F. Modulatory Effect of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* PB01 on Mechanical Sensitivity in a Female Diet-Induced Obesity Model. *Pain Res. Manag.* **2021**, *2021*, 5563959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gil-Hernández, E.; Ruiz-González, C.; Rodríguez-Arrastia, M.; Roperio-Padilla, C.; Rueda-Ruzafa, L.; Sánchez-Labraca, N.; Roman, P. Effect of gut microbiota modulation on sleep: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Nutr. Rev.* **2023**, *81*, 1556–1570. [[CrossRef](#)]
37. Kerkick, C.M.; Moon, J.M.; Walden, K.E.; Hagele, A.M.; Allen, L.E.; Gaige, C.J.; Krieger, J.M.; Jäger, R.; Pane, M.; Mumford, P. Multi-strain probiotic improves subjective sleep quality with no impact on body composition, hemodynamics, and physical activity. *Benef. Microbes* **2024**, *15*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lan, Y.; Lu, J.; Qiao, G.; Mao, X.; Zhao, J.; Wang, G.; Tian, P.; Chen, W. *Bifidobacterium breve* CCFM1025 Improves Sleep Quality via Regulating the Activity of the HPA Axis: A Randomized Clinical Trial. *Nutrients* **2023**, *15*, 4700. [[CrossRef](#)]
39. Aslan Çın, N.N.; Açı, M.; Tertemiz, O.F.; Aktan, Ç.; Akçali, D.T.; Çakiroğlu, F.P.; Özçelk, A.Ö. Effect of prebiotic and probiotic supplementation on reduced pain in patients with fibromyalgia syndrome: A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial. *Psychol. Health Med.* **2024**, *29*, 528–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. McBride, C.; Bronner, S. Injury characteristics in professional modern dancers: A 15-year analysis of work-related injury rates and patterns. *J. Sports Sci.* **2022**, *40*, 821–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Nunes, A.C.; Mendes, L.A.; Mota, L.A.; Lima, P.O.; Almeida, G.P. Training Load, Pain Intensity, and Functioning Can Explain Injuries in Dancers: A Classification and Regression Tree (CART) Analysis. *Med. Probl. Perform. Artist.* **2022**, *37*, 73–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Li, Y.; Li, J.; Xu, F.; Liu, G.; Pang, B.; Liao, N.; Li, H.; Shi, J. Gut microbiota as a potential target for developing anti-fatigue foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2023**, *63*, 3065–3080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. El-Salhy, M. Intestinal bacteria associated with irritable bowel syndrome and chronic fatigue. *Neurogastroenterol. Motil.* **2023**, *35*, e14621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Obermoser, K.; Brigo, N.; Schroll, A.; Monfort-Lanzas, P.; Gostner, J.M.; Engl, S.; Geisler, S.; Knoll, M.; Schennach, H.; Weiss, G.; et al. Positive Effects of Probiotic Therapy in Patients with Post-Infectious Fatigue. *Metabolites* **2023**, *13*, 639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Roman, P.; Carrillo-Trabalón, F.; Sánchez-Labraca, N.; Cañadas, F.; Estévez, A.F.; Cardona, D. Are probiotic treatments useful on fibromyalgia syndrome or chronic fatigue syndrome patients? A systematic review. *Benef. Microbes* **2018**, *9*, 603–611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sullivan, A.; Nord, C.E.; Evengård, B. Effect of supplement with lactic-acid producing bacteria on fatigue and physical activity in patients with chronic fatigue syndrome. *Nutr. J.* **2009**, *8*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



## Article

# *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 Supplementation: An Exploratory, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Endocannabinoid and Inflammatory Responses in Female Dancers

Jakub Wiącek <sup>1</sup>, Karolina Skonieczna-Żydecka <sup>2</sup>, Igor Łoniewski <sup>3</sup>, Chariklia K. Deli <sup>4</sup>, Ioannis G. Fatouros <sup>4</sup>, Athanasios Z. Jamurtas <sup>4</sup>, Dominika Moszczyńska <sup>1</sup> and Joanna Karolkiewicz <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, Poznan University of Physical Education, 61-871 Poznan, Poland; wiacek@awf.poznan.pl (J.W.); moszczynska@awf.poznan.pl (D.M.)
  - <sup>2</sup> Department of Biochemical Research, Pomeranian Medical University, 70-204 Szczecin, Poland; karolina.skonieczna.zydecka@pum.edu.pl
  - <sup>3</sup> Sanprobi Sp. z o.o. Sp.K., 70-535 Szczecin, Poland; sanprobi@sanprobi.pl
  - <sup>4</sup> Department of Physical Education and Sport Science, University of Thessaly, 38221 Trikala, Greece; delixar@pe.uth.gr (C.K.D.); ifatouros@pe.uth.gr (I.G.F.); ajamurt@uth.gr (A.Z.J.)
- \* Correspondence: karolkiewicz@awf.poznan.pl



Academic Editors: Haruki Kitazawa and Pramod Gopal

Received: 17 April 2025  
Revised: 21 May 2025  
Accepted: 29 May 2025  
Published: 30 May 2025

**Citation:** Wiącek, J.; Skonieczna-Żydecka, K.; Łoniewski, I.; Deli, C.K.; Fatouros, I.G.; Jamurtas, A.Z.; Moszczyńska, D.; Karolkiewicz, J. *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 Supplementation: An Exploratory, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Endocannabinoid and Inflammatory Responses in Female Dancers. *Microorganisms* **2025**, *13*, 1284. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13061284>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The anandamide (AEA) and lipopolysaccharide (LPS) interaction is gaining attention, but evidence on the influence of probiotics on endocannabinoid system (ECS) biomarkers remains limited. This study (NCT05567653) investigated the effects of 12-week supplementation with *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 on AEA (main outcome) and inflammatory biomarkers in female dancers. Fifteen participants (5 probiotic, 10 placebo) were included in the final analysis. Serum levels of AEA, LPS, and cytokines (tumor necrosis factor-alpha—TNF- $\alpha$ , interleukin-1 beta—IL-1 $\beta$ , and interleukin-10—IL-10) were measured using an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), and the psychological stress responses were evaluated using the Mini-COPE questionnaire. At the baseline, a correlation between AEA and LPS was observed (Spearman's  $r = 0.9677$ ,  $p < 0.05$ ). After 12 weeks, no statistically significant differences in the AEA, LPS, cytokine levels, or stress-coping strategies were observed between the probiotic and placebo groups (LPS–probiotic: +3.48 EU/L,  $p = 0.9361$ ; placebo: +56.98 EU/L,  $p = 0.0694$ ; AEA–probiotic: –1.11 ng/mL,  $p = 0.9538$ ; placebo: +14.08 ng/mL,  $p = 0.4749$ ). The direction of change may indicate a trend toward increased inflammation in the absence of probiotics, consistent with patterns described in previous literature. However, these results should be viewed as hypothesis generating and warrant confirmation in larger trials.

**Keywords:** endocannabinoid system; gut microbiome; anandamide; lipopolysaccharide; probiotics; dancers

## 1. Introduction

The endocannabinoid system (ECS) functions via bioactive lipids, mainly anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), which activate cannabinoid receptors type 1 (CB1) and type 2 (CB2). CB1 receptors, located primarily in the nervous system, influence pain, mood, sleep, and appetite, whereas CB2 receptors, found mainly on immune cells, are involved in immune regulation [1]. Unlike classical neurotransmitters, endocannabinoids are synthesized on demand in postsynaptic neurons and modulate presynaptic activity by

binding to cannabinoid receptors, thus influencing neurotransmitter release [2]. They are not stored in vesicles; instead, their production and degradation rely on tightly regulated enzymatic processes and membrane transporters [3]. Anandamide generally maintains tonic functions, such as emotional stability and appetite regulation under normal conditions, while 2-AG acts in a phasic manner, with levels increasing in response to acute stressors such as injury or public speaking. [4]. Physical activity has been shown to significantly affect ECS activity, particularly by elevating AEA levels [5], which may contribute to the phenomenon known as the ‘runner’s high’, a state of enhanced mood and reduced anxiety following exercise [6].

Physical activity significantly impacts the gut microbiota, microorganisms essential for metabolic regulation, immune function, and neurological processes. Regular exercise can alter microbial composition and abundance [7]. Moderate physical activity enhances gut health by stimulating the production of short-chain fatty acids (SCFAs), particularly butyrate, which supports immune balance and systemic homeostasis [8]. In contrast, excessive exercise without adequate recovery may disrupt the microbial equilibrium, increasing gut permeability and allowing lipopolysaccharide (LPS) translocation into the bloodstream, which can initiate systemic inflammation [9]. LPS, an endotoxin from Gram-negative bacteria, serves as a critical biomarker for microbial translocation and inflammation, reflecting the integrity of the gut barrier. Professional dancers, or artistic athletes, undergo intense training that is linked to a higher injury risk, especially beyond 11.5 h per week. Women are more prone to bone injuries, while men face more contusions and tendinopathies [10,11]. Dancers represent a physiologically and psychologically demanding population, who are frequently exposed to chronic stress. Training sessions are often long and repetitive due to the need to perfect choreography, while performances typically take place in the evening hours and must be reconciled with early morning academic or occupational responsibilities. This irregular schedule contributes to circadian rhythm disruption, which can adversely affect hormonal regulation, immune function, and recovery. Furthermore, performances often involve travel, which increases their exposure to novel pathogens and elevates infection risk. In addition to physical strain, dancers face cognitive demands associated with learning complex motor sequences, as well as performance-related pressure linked to external evaluation by audiences and adjudication panels. Psychological stress has been shown to further increase susceptibility to injury [12], and certain dance forms, such as classical ballet, have been associated with an elevated risk of systemic inflammation [13]. Training despite pain is common in this environment, leading to compensatory movement patterns and reinforcing both biomechanical stress and the psychophysiological burden [14].

The endocannabinoid system (ECS) and gut microbiota interact bidirectionally: microbiota alterations affect ECS-regulated processes, such as inflammation, energy balance, and gut barrier function, while ECS activity can shape microbial composition [15]. This relationship is increasingly studied for its therapeutic potential in gastrointestinal disorders like irritable bowel syndrome (IBS). Rousseaux et al. (2007) found that *Lactobacillus acidophilus* NCFM, at  $10^9$  CFU/day, increased cannabinoid receptor expression in intestinal epithelial cells and reduced visceral pain in rats, with effects comparable to morphine [16]. Building on this, Brierley et al. (2023) reviewed the roles of ECS in regard to gastrointestinal function, including motility, secretion, inflammation, and pain perception, and identified it as a target for IBS treatment. However, they noted a lack of robust clinical trials and the limited tolerability of some patients to cannabinoid therapies [17]. Animal studies support a link between anandamide (AEA) and lipopolysaccharide (LPS), suggesting ECS involvement in controlling intestinal permeability and inflammation. Elevated LPS stimulates AEA production in immune cells, highlighting ECS’s regulatory role [18–24]. Recent studies emphasize the joint influence of ECS, microbiota, and cardiometabolic risk factors [25]. Probiotics,

particularly *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, may reduce colonic LPS levels and systemic inflammation, offering a non-pharmacological approach to modulating ECS–microbiota interactions [26,27].

This study used *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175, strains increasingly noted for modulating the nervous system via anti-inflammatory and gut–brain axis pathways [28]. In LPS-challenged rats, they reduced systemic and hippocampal inflammation, improved memory through brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulation, and protected against neurodegeneration by influencing Bax/Bcl-2 expression [29,30]. In stressed Syrian hamsters, these strains shifted gut microbiota and increased IL-10, although anxiety-like behavior remained, possibly due to reduced microbial diversity [31]. In IBS models, their combination reduced visceral hypersensitivity and regulated the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis more effectively than single strains [32]. Early life administration impacted behavior and metabolism in rats on a Western diet, showing sex-specific effects on weight, caloric intake, and leptin levels [33]. In pubertal mice, they mitigated sickness behaviors and LPS-induced immune activation, reducing cytokines in plasma, the prefrontal cortex, and hippocampus in a sex-dependent manner [34]. These strains are among the most studied in regard to mental health and sleep modulation [35–37]. With ECS activity closely linked to mood and cognition, current research continues to investigate probiotics with targeted effects on this system. Physical activity, under appropriate recovery conditions, may reduce LPS levels, whereas excessive exertion can have the opposite effect [38,39]. Therefore, our study was conducted during the period of highest physical, mental, and psychological strain for the participants. Although dancers do not train as intensively as elite athletes, such as marathon runners or rugby players, the nature of their workload aligns with the study’s objectives. The study included only female participants, due to a 20-fold higher enrollment rate compared to males. Additionally, probiotic effects may be sex dependent, and including both genders could have introduced variability, complicating data interpretation [40].

Given the limited evidence on cannabinoid-based therapies, particularly among individuals with poor tolerability, alternative approaches to modulating the endocannabinoid system (ECS) warrant investigation. This study examines the effects of probiotic supplementation on anandamide and lipopolysaccharide in physically active individuals. Due to its tonic function and baseline stability, AEA was selected as the primary ECS marker. The secondary outcomes include concentrations of LPS, tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-10 (IL-10), as well as stress-coping strategies, assessed using the Mini-COPE questionnaire. It was hypothesized that probiotic supplementation would enhance gut barrier integrity and attenuate systemic inflammation, resulting in a smaller increase in circulating lipopolysaccharide (LPS) and pro-inflammatory cytokines compared to the placebo. In parallel, the maintenance of gut homeostasis was expected to reduce anandamide (AEA) levels in the probiotic group, in contrast to potential stress-related elevations in the placebo group. In contrast to earlier probiotic studies focused on general inflammation or clinical cohorts, the present trial is the first to directly evaluate probiotic effects on endocannabinoid markers in a physically active population. By examining female dancers, a unique athletic cohort under high training and stress load, our study extends previous research in regard to a new context, linking probiotic supplementation to the endocannabinoid–inflammation axis in a way that has not been explored before.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Participants

The sample size calculations were conducted using G\*Power software (version 3.1.9.7; Heinrich Heine University Düsseldorf, Germany). To achieve 80% statistical power to detect a medium effect size (Cohen's  $d = 0.5$ ) in the primary outcome variable (anandamide, AEA), with a two-tailed  $\alpha$  set at 0.05 and based on the expected variability, approximately 51 participants per group was required. The remaining biomarkers, including LPS, IL-1 $\beta$ , IL-10, and TNF- $\alpha$ , were measured at the same time points (before and after the 12-week intervention), as secondary outcomes. There were no changes in the trial methodology or outcomes throughout the study.

The study included participants aged 18 to 36 years, who were actively engaged in professional dancing, with their training exceeding 8 h per week. Individuals were excluded if, within the three months preceding the study, they had sustained injuries, consumed prebiotics and/or probiotics, been hospitalized, traveled to tropical countries, or used antibiotics, cannabis products, steroids, or anabolic steroids. Individuals with chronic diseases requiring ongoing pharmacological treatment, including metabolic, inflammatory, autoimmune, or psychiatric conditions, were excluded from participation to minimize confounding influences on inflammatory and neuroimmune markers.

The study included female dance students from the Academy of Physical Education, conducted during the busiest period of the semester, with the highest academic workload. Their schedule consisted of theoretical lectures, motor preparation training, recreational movement classes, gym sessions, choreography training, and teaching practice in dance schools. Furthermore, some participants worked professionally in theaters, including weekend performances. The demanding and irregular timetable (sometimes from 8 AM to 8 PM), combined with the stress of learning choreography, public performances, and exam preparation, contributed to the overall physical and psychological burden experienced.

Despite careful participant selection based on anthropometric measurements and activity levels, the target group size was not achieved. In addition to the dropout reasons listed below, several challenges contributed to recruitment difficulties, including a lack of male participants (only two men volunteered), the evening training and performance schedules of the dancers, which often led to late wake-up times, conflicting with morning sample collection hours, logistical difficulties related to fecal sample collection required for other procedures, and the inability to ensure participants would maintain a consistent diet throughout the intervention.

### 2.2. Intervention

Blinding was applied to both the study authors and the participants. Randomization (block randomization with a block size of four) was conducted using a computer-generated algorithm ([www.randomizer.org](http://www.randomizer.org) (accessed on 25 September 2022)) by the probiotic manufacturer. The randomization was performed by the manufacturer of the probiotic and placebo used in the study. The probiotic group received *Lactobacillus helveticus* R0052 (CNCM strain I-1722) and *Bifidobacterium longum* R0175 (CNCM strain I-3470) (trade name: Sanprobi Stress; manufacturer: Sanprobi sp. z o. o. sp. k., Szczecin, Poland; lyophilisate: Lallemand Health Solutions Inc., Mirabel, Quebec, Canada) at a dose of  $3 \times 10^9$  colony forming units (CFUs)/active fluorescent units (AFU) per capsule, taken daily, in the morning, for 12 weeks. The placebo capsules, identical in terms of mass and appearance to the probiotic capsules, contained maltodextrin and corn starch as carriers. Both types of capsules were identical in appearance.

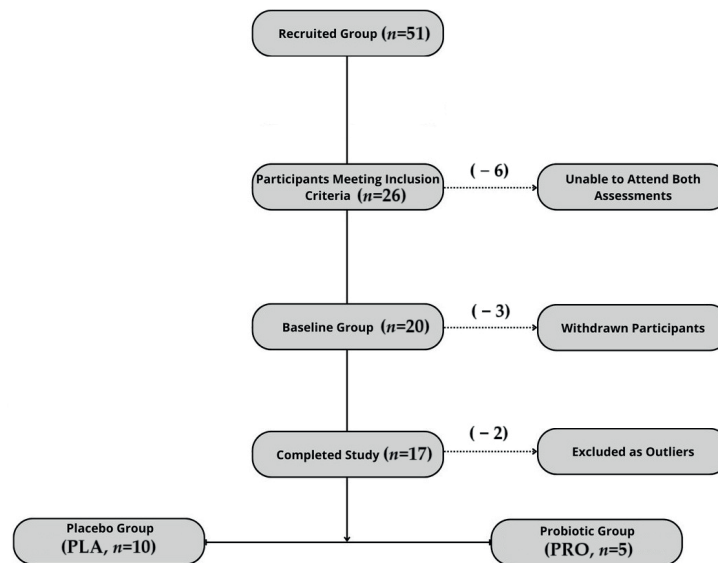
The interventions were well-tolerated, with no adverse effects reported, and the probiotic product adhered to safety certifications. From an initial pool of 51 volunteers,

26 female participants met the inclusion criteria. However, only twenty attended the blood and stool sample collection, and three subsequently failed to collect the study supplement, providing no explanation for their absence. Seventeen female dancers completed the study; however, one participant was excluded during the statistical analysis due to an outlier body mass index (BMI) indicative of overweight status, significantly differing from other group members. This exclusion ensured sample homogeneity and the validity of the results, as BMI is a potential confounding factor in probiotic health studies. Sixteen participants proceeded to the final analysis, with eleven receiving the placebo (PLA) and five receiving the probiotic (PRO) treatment. During the preliminary statistical analysis of the primary outcome, anandamide (AEA) levels, an additional outlier was identified. One data point exhibited a substantial deviation from the overall distribution, resulting in the final group having 15 participants. We conducted our analysis on a per-protocol basis, including only those participants who completed the trial ( $N = 15$ ). To monitor adherence to the probiotic/placebo regimen, participants were asked to maintain daily logs of their capsule intake and return all the unused capsules at their follow-up visit. Compliance was verified by counting the returned capsules. Adherence to the intervention was 100%, with participants consuming the doses corresponding to the full 12-week period (84 days).

### 2.3. Study Protocol

All the procedures were conducted in the laboratories at Poznan University of Physical Education, in accordance with established research protocols and ethical guidelines. Recruitment began in October 2022 and concluded in March 2023. Further sample collection was not possible due to the limited number of willing participants who met the study criteria. The study would have been discontinued if a significant number of participants had chosen to withdraw from the intervention. During an informational session, the participants were instructed to maintain their habitual dietary patterns throughout the study, while diligently reporting any dietary changes, the emergence of exclusion criteria, or potential adverse effects. The participants were also advised to attend the blood sampling session in a rested state, following a light dinner and a 2–3 day pause from training activities. One week prior to the trial, anthropometric measurements were conducted using bioelectrical impedance analysis (BIA), and dietary data were collected. Fasting blood samples (10 mL) were collected one day prior to the initiation of supplementation with either the probiotic or placebo and again after 3 months (12 weeks). Blood samples were centrifuged to separate the serum. The serum samples were immediately frozen and stored for subsequent analysis using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), while morphological analysis was performed directly following collection.

The study was registered as a clinical trial ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (accessed on 22 September 2022); NCT05567653—Effects of Probiotics on Gut Microbiota, Endocannabinoid and Immune Activation and Symptoms of Fatigue in Dancers), complied with the Declaration of Helsinki, and received approval from the Bioethics Committee at the Poznan University of Medical Sciences (approval no. 412/22). All the study participants provided their written informed consent. The report follows the CONSORT 2010 guidelines, with a flowchart of the participant inclusion process presented in Figure 1.



**Figure 1.** Flowchart illustrating participant recruitment, inclusion, dropout, and final allocation to study groups.

## 2.4. Methods

### 2.4.1. Outcome Measures

To investigate the interaction between the endocannabinoid system and immune function, serum concentrations of anandamide (AEA) and lipopolysaccharides (LPS) were quantified using enzyme-linked immunosorbent assays (double-antibody sandwich ELISA; SunRed Biotechnology Co., Ltd., Shanghai, China). The assay sensitivity and detection range were as follows: AEA (7.125 ng/mL; 8–2000 ng/mL) and LPS (10.725 EU/L; 12–4000 EU/L). The inflammatory status was assessed by measuring the serum concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10 using an ELISA (SunRed Biotechnology Company), with assay sensitivity and detection ranges of TNF- $\alpha$  (2.827 ng/mL; 3–900 ng/mL), IL-1 $\beta$  (15.013 pg/mL; 20–8000 pg/mL), and IL-10 (9.012 pg/mL; 10–3000 pg/mL). According to the manufacturer, the intra-assay coefficient of variation (CV) is less than 10%, and the inter-assay CV is below 12%. Therefore, minor fluctuations in biomarker concentrations may lie within the assay’s variability range, potentially masking subtle effects of the intervention.

The Mini-COPE questionnaire was used to assess dispositional stress-coping mechanisms, evaluating typical emotional and behavioral responses under high-stress conditions. It consists of 28 items, adapted from the original 60-item COPE inventory, designed to measure habitual ways of reacting to difficult situations. The participants responded using a four-point Likert scale, ranging from “almost never” to “almost always”. The tool distinguishes 14 coping strategies, grouped into three major factors: Active Coping, Avoidance Behaviors, and Seeking Support/Emotion-Focused Coping, with maximum scores of 18, 30, and 36 points, respectively. Body composition was assessed using bioelectrical impedance analysis with a Seca analyzer (Seca GmbH & Co., Hamburg, Germany), providing detailed metrics on body mass, fat percentage, and lean body mass. Nutritional status was evaluated through the analysis of 3-day dietary records, assessing energy intake, macronutrient distribution, and dietary patterns. Nutritional status was also evaluated using 3-day dietary records and the 14-Item Mediterranean Diet Assessment Tool (MDAT), which measures adherence to a diet high in fruits, vegetables, legumes, whole grains, fish, and olive oil, while restricting refined grains, sugar-sweetened beverages, and trans fats.

These factors are particularly relevant as a person's BMI may influence components of the endocannabinoid system (ECS); cholesterol-rich foods are a source of arachidonic acid, a precursor for anandamide (AEA), and dietary fiber modulates the gut microbiome. Blood morphology, including white blood cell (WBC) and lymphocyte counts, was analyzed using flow cytometry with the Synergy 2 SIAFRT analyzer (BioTek, Winooski, VT, USA), providing insights into immune function and systemic health. These data on body composition, dietary habits, and blood morphology were used to ensure the homogeneity of the study group.

Statistical calculations and primary outcome data, including group characteristics, dietary intake, biomarker measurements, Mediterranean diet adherence scores, and Mini-COPE responses, are provided in the Supplementary Materials.

#### 2.4.2. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) package. For comparing the baseline data between the groups, the *t*-test or Mann–Whitney U test was used if the normality condition was not met. The Shapiro–Wilk test was used to check the data for the normality of the distribution. To evaluate the correlation between the levels of AEA and LPS, Spearman's rank-order correlation was employed. To compare variables after 3 months of supplementation with either the probiotic or the placebo, the *t*-test or Wilcoxon test was used if the normality condition was not met. A two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used to analyze the differences in regard to the effect of time, group and time x group. For all the statistical tests, a *p* value of less than 0.05 was interpreted as statistically significant. For statistically significant results, the coefficients  $\eta^2$  are presented as an indicator of the effect size. If statistically significant results had been observed, post hoc analyses with Bonferroni correction would have been used to adjust for multiple comparisons, ensuring robustness against Type I errors. Moreover, effect size measures (e.g., Cohen's *d* for parametric tests or rank-biserial correlation for non-parametric tests) would have been calculated to better interpret the magnitude of the observed effects.

### 3. Results

#### 3.1. No Baseline Differences in Anthropometric or Dietary Variables Between the Groups

The baseline measurements (BMI, fat percentage, white blood cells, and lymphocyte counts), used to standardize the study groups, are presented in Table 1. The dancers were recruited from two groups with similar skill levels, following an identical training regimen. The comparative analysis of the participants' diets revealed no significant differences between the groups. The characteristics of the diet are also presented in Table 1.

**Table 1.** Baseline characteristics (anthropometrics and diet). All participants were female.

	Probiotic ( <i>n</i> = 5)	Placebo ( <i>n</i> = 11)	Total ( <i>n</i> = 16)	Placebo vs. Probiotic ( <i>p</i> Value)
	Mean ± SD (Min–Max)	Mean ± SD (Min–Max)	Mean ± SD (Min–Max)	
Dancing activity [hours per week]	16.00 ± 9.77 (9.50–29.00)	17.11 ± 6.98 (8.00–33.00)	16.77 ± 7.63 (8.00–33.00)	0.69 <sup>b</sup>
Age [years]	20.00 ± 1.30 (19–22)	20.55 ± 1.04 (19–22)	20.44 ± 1.09 (19–22)	0.55 <sup>b</sup>
Body mass [kg]	60.10 ± 7.31 (48.60–68.30)	58.07 ± 6.95 (49.40–68.70)	58.08 ± 6.81 (48.60–68.70)	0.99 <sup>a</sup>

Table 1. Cont.

	Probiotic ( <i>n</i> = 5)	Placebo ( <i>n</i> = 11)	Total ( <i>n</i> = 16)	Placebo vs. Probiotic ( <i>p</i> Value)
	Mean ± SD (Min–Max)	Mean ± SD (Min–Max)	Mean ± SD (Min–Max)	
BMI (body mass index) [kg/m <sup>2</sup> ]	20.80 ± 2.29 (18.10–25.10)	21.05 ± 2.18 (17.70–23.40)	21.02 ± 2.13 (17.70–25.10)	0.93 <sup>a</sup>
Fat [% body mass]	27 ± 3 (25–31)	27 ± 4 (21–31)	27 ± 3 (21–31)	0.84 <sup>a</sup>
WBC [×10 <sup>9</sup> /L]	5.94 ± 1.17 (4.5–6.6)	5.54 ± 0.84 (4.0–7.5)	5.66 ± 1.07 (4.0–7.5)	0.50 <sup>a</sup>
Lymphocytes [×10 <sup>9</sup> /L]	2.60 ± 0.46 (1.6–3.3)	2.34 ± 0.79 (1.8–3.4)	2.42 ± 0.57 (1.6–3.4)	0.41 <sup>a</sup>
Energy [kcal]	2325.54 ± 425.00 (1835.0–2842.6)	1999.23 ± 279.81 (1588.93–2578.45)	2101.20 ± 353.22 (1588.93–2842.6)	0.26 <sup>a</sup>
Protein [g]	100.47 ± 21.09 (79.42–130.92)	85.29 ± 30.13 (49.52–154.26)	90.03 ± 27.87 (49.52–154.26)	0.51 <sup>a</sup>
Fat [g]	90.47 ± 18.72 (67.02–115.73)	74.56 ± 13.93 (57.69–95.74)	79.54 ± 16.76 (57.69–115.73)	0.41 <sup>a</sup>
Cholesterol [mg]	330.21 ± 140.77 (178.32–490.73)	216.73 ± 104.36 (9–372.03)	252.19 ± 124.49 (9–490.73)	0.40 <sup>a</sup>
Carbohydrates [g]	298.79 ± 57.98 (240.54–376.75)	271.12 ± 53.14 (194.89–359.42)	279.77 ± 54.36 (194.89–376.75)	0.75 <sup>a</sup>
Fiber [g]	21.36 ± 12.67 (15.03–27.63)	28.96 ± 15.13 (16.69–47.68)	26.59 ± 14.44 (15.03–47.68)	0.91 <sup>b</sup>
Mediterranean diet adherence [0–14]	5.46 ± 1.86 (3.00–10.00)	6.20 ± 2.49 (3.00–10.00)	5.69 ± 2.02 (3.00–10.00)	0.42 <sup>a</sup>

Note: <sup>a</sup>—*t* test/<sup>b</sup>—Mann–Whitney U test.

The baseline data collected indicate favorable and methodologically sound conditions for conducting comparative analyses between the study groups and minimizing the potential confounding effects in subsequent analyses.

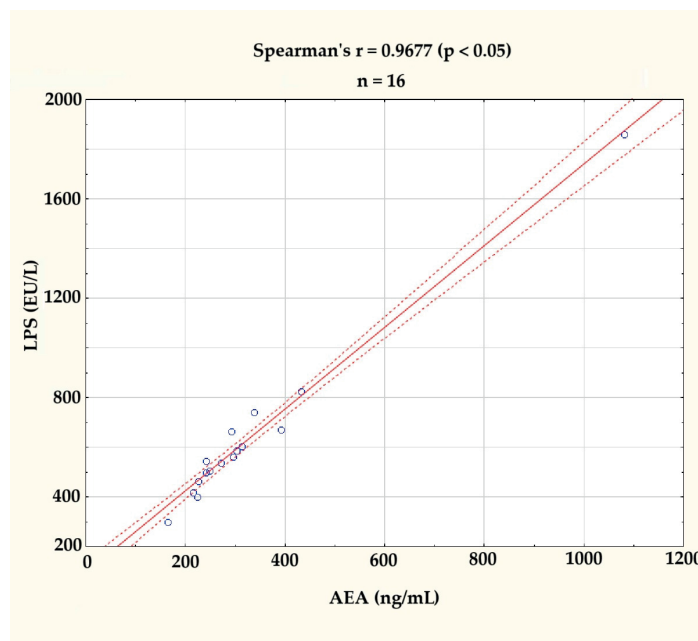
### 3.2. No Statistically Significant Changes in AEA, LPS, or Cytokine Levels Following Supplementation

#### 3.2.1. Strong Positive Correlation Between AEA and LPS at the Baseline

In accordance with the expectations derived from the literature review available on the discussion, the levels of AEA and LPS were found to be correlated ( $r = 0.9677$ ;  $p < 0.05$ ), as assessed by Spearman's rank-order correlation. This correlation is illustrated in Figure 2. The clearly visible outlier on the graph was excluded from further analyses.

#### 3.2.2. Directional Trends Observed, but Between- and Within-Group Changes Were Not Significant

After homogenizing the groups by excluding the outliers, the normality of the data distribution was assessed using the Shapiro–Wilk test, confirming that there were no significant deviations from normality ( $p > 0.05$ ) for all the variables ( $n = 5$  for the probiotic group;  $n = 10$  for the placebo group). At the baseline, the probiotic and placebo groups did not differ significantly in regard to any of the measured biomarkers (LPS (505.05 vs. 579.36 EU/L,  $p = 0.3391$ ), AEA (253.99 vs. 292.59 ng/mL,  $p = 0.3329$ )). A comparison of the baseline levels of the analyzed indicators between the groups is presented in Table 2.



**Figure 2.** Correlation between serum anandamide (AEA, ng/mL) and lipopolysaccharide (LPS, EU/L) levels at the baseline ( $n = 16$ ). A strong positive correlation was observed (Spearman’s  $r = 0.9677$ ,  $p < 0.05$ ). The figure displays individual values (blue circles), a fitted regression line (solid red line), and a 95% confidence interval (dashed red lines). One outlier, identified visually and statistically, was excluded from further analysis.

**Table 2.** Between-group analysis at the baseline.

Mean	Probiotic Group ( $n = 5$ )		Placebo Group ( $n = 10$ )		(Independent $t$ -Test $p$ )
	Baseline (Mean $\pm$ SD) (Min–Max)	(Shapiro–Wilk $p$ )	Baseline (Mean $\pm$ SD) (Min–Max)	(Shapiro–Wilk $p$ )	
LPS [EU/L*]	505.05 $\pm$ 170.77 299.35–742.17	0.9796	579.36 $\pm$ 118.50 416.63–826.21	0.6987	0.3391
AEA [ng/mL]	253.99 $\pm$ 68.01 164.05–337.67	0.8996	292.59 $\pm$ 70.98 214.40–432.66	0.1966	0.3329
TNF- $\alpha$ [pg/mL]	87.52 $\pm$ 24.40 56.75–117.74	0.9029	105.89 $\pm$ 22.23 72.16–139.53	0.8120	0.1671
IL-1 $\beta$ [pg/mL]	1300.42 $\pm$ 298.48 982.44–1689.51	0.4774	1475.79 $\pm$ 333.89 940.79–2090.87	0.9272	0.3402
IL-10 [pg/mL]	490.03 $\pm$ 110.89 393.35–679.28	0.1302	515.46 $\pm$ 96.86 397.89–709.14	0.6118	0.6546

\* Endotoxin units per liter.

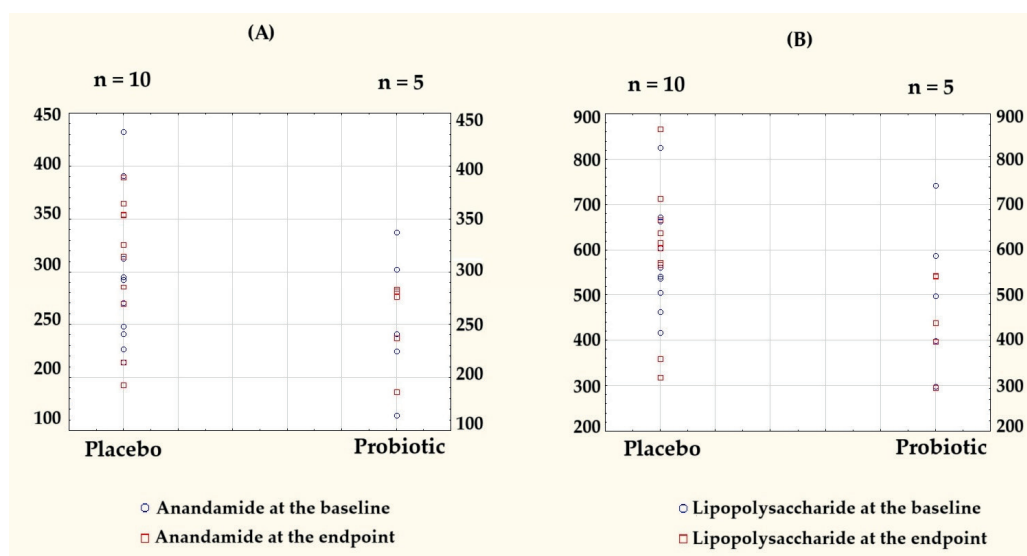
At the endpoint, the delta values did not indicate a significant magnitude in the difference between the main biomarkers of interest: LPS (probiotic: 3.48,  $p = 0.9361$ ; placebo: 56.98,  $p = 0.0694$ ), AEA (probiotic:  $-1.11$ ,  $p = 0.9538$ ; placebo: 14.08,  $p = 0.4749$ ), and other measured biomarkers. The data distribution within the groups remained consistent, except for IL-10 in the probiotic group, wherein a shift was observed (Table 3).

Table 3. Between-group analysis at the endpoint.

Mean	Probiotic Group ( <i>n</i> = 5)		Placebo Group ( <i>n</i> = 10)		(Independent <i>t</i> -Test <i>p</i> )
	Endpoint (Mean ± SD) (Min–Max)	(Shapiro–Wilk <i>p</i> )	Endpoint (Mean ± SD) (Min–Max)	(Shapiro–Wilk <i>p</i> )	
LPS [EU/L]	508.53 ± 89.83 382.19–594.96	0.4817	636.34 ± 136.85 401.08–871.60	0.4620	0.1210
AEA [ng/mL]	252.83 ± 41.75 186.22–283.97	0.1123	306.67 ± 65.45 192.98–389.58	0.4332	0.0831
TNF-α [pg/mL]	97.81 ± 17.51 68.48–115.42	0.1965	113.04 ± 22.80 76.75–146.56	0.7815	0.2144
IL-1β [pg/mL]	1346.94 ± 209.28 1001.15–1509.79	0.1242	1580.40 ± 325.51 1077.65–2183.22	0.8382	0.1717
IL-10 [pg/mL]	556.20 ± 31.95 500.76–583.24	0.0387	540.40 ± 81.99 395.87–663.44	0.9436	1.0000 *

\* Mann–Whitney U test.

To visualize individual-level variations and group-wise trends, the key outcome data originally presented in Tables 2 and 3 are shown as column scatter plots (Figure 3).



**Figure 3.** Individual-level data presented as column scatter plots to illustrate the baseline and endpoint values for (A) anandamide (AEA) and (B) lipopolysaccharide (LPS) in the placebo (*n* = 10) and probiotic (*n* = 5) groups. Each dot represents a single participant, plotted separately for each group to visualize the within-group distributions and changes over time. Baseline values are marked with blue circles, endpoint values with red squares.

Notably, AEA in the probiotic group was the only parameter with a negative delta. A comparison of the post-intervention results and the differences relative to the baseline for both groups are presented in Table 4.

**Table 4.** Within-group analysis at the endpoint.

Mean	Probiotic Group (n = 5)		Placebo Group (n = 10)	
	Delta	Paired t-Test (t, p)	Delta	Paired t-Test (t; p)
LPS [EU/L]	3.48	0.0853; 0.9361	56.98	2.0605; 0.0694
AEA [ng/mL]	−1.11	−0.0616; 0.9538	14.08	0.7457; 0.4749
TNF-α [pg/mL]	10.28	1.8887; 0.1320	7.15	1.2768; 0.2336
IL-1β [pg/mL]	46.52	0.5646; 0.6025	104.61	1.9067; 0.0889
IL-10 [pg/mL]	66.17	0.9439; 0.3452 *	24.95	1.1912; 0.2640

\* Wilcoxon signed-rank test (Z; p).

### 3.3. No Effect of Probiotic Supplementation on Stress-Coping Strategies

Similar to anandamide and the inflammatory markers, no statistically significant changes were observed in the stress-coping strategies assessed using the Mini-COPE questionnaire, and the direction and magnitude of such changes did not suggest any clinically meaningful effect. The results of this analysis are presented in Table 5.

**Table 5.** Effects of probiotic supplementation on stress-coping strategies assessed using the Mini-COPE questionnaire before supplementation and after 3 months.

	Probiotic Group (n = 5)			Placebo Group (n = 10)				
	Pre (Mean ± SD) (Min–Max)	Shapiro–Wilk p	Post (Mean ± SD) (Min–Max)	Paired t-Test (t; p)	Pre (Mean ± SD) (Min–Max)	Shapiro–Wilk p	Post (Mean ± SD) (Min–Max)	Paired t-Test (t; p)
Active Coping [0–18]	13 ± 4.53 8–18	0.3946	12 ± 3.94 9–18	0.9535; 0.3943	12.8 ± 3.71 6–18	0.5996	12 ± 3.97 4–17	0.7530; 0.4707
Avoidance Behaviors [0–30]	14.6 ± 2.61 13–19	0.0214	13 ± 5 6–20	0.3652; 0.7150 *	14.8 ± 4.73 8–22	0.7620	13.2 ± 5.07 4–20	0.9130; 0.3850
Seeking Support/Emotion-Focused Coping [0–36]	16.4 ± 1.67 14–18	0.3140	16 ± 2.92 14–21	0.4313; 0.6885	16.7 ± 4.45 11–24	0.3767	15.5 ± 4.06 9–23	1.1078; 0.2967

\* Wilcoxon signed-rank test (Z; p).

## 4. Discussion

Although a greater mean increase in lipopolysaccharide (LPS) levels was observed in the placebo group compared to the probiotic group, and the mean anandamide (AEA) levels decreased in the probiotic group, while slightly increasing in the placebo group, these patterns did not reach statistical significance. Therefore, the hypothesis proposed in the Introduction was not supported by the results. To date, no studies have investigated the effects of probiotic therapy on endocannabinoid system markers, particularly in physically active populations. One randomized, double-blind trial in 92 coronary artery disease patients examined symbiotic supplementation combining inulin and *Lactobacillus rhamnosus* GG, observing reductions in lipopolysaccharides (LPS) and inflammatory markers, as well as a correlation between CB2 receptor expression and LPS levels, indicating improved gut barrier function [41]. However, the study population and intervention differed substantially to ours. One of the methodological limitations of our study was the use of an ELISA to quantify the AEA levels, which is less specific and less sensitive than liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). Future studies should consider employing LC–MS for a more accurate assessment of endocannabinoid concentrations.

A number of meta-analyses have demonstrated significant anti-inflammatory effects of probiotics in clinical and general populations. For instance, a meta-analysis of 26 randomized controlled trials reported a significant reduction in LPS (SMD −0.47, 95% CI −0.85 to −0.09,  $p = 0.02$ ), along with improvements in gut barrier function and inflammatory

markers, such as the C-reactive protein (CRP), TNF- $\alpha$ , and IL-6 [42]. Another review of 11 trials confirmed reductions in TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, and IL-4, and increases in IL-10 [43]. Importantly, a meta-analysis focused on elite athletes found that probiotic supplementation significantly reduced TNF- $\alpha$  concentrations ( $-2.31$  pg/mL; 95% CI  $-4.12, -0.51$  pg/mL;  $p = 0.01$ ), suggesting potential relevance in physically active individuals [44]. However, the strain specificity and heterogeneity across studies make it difficult to generalize these results to the present trial. In our study, no significant changes in the stress-coping strategies (Mini-COPE) were observed in either group over the study period, suggesting that probiotic supplementation did not meaningfully influence coping mechanisms. Chronic stress disrupts gut microbiota, leading to dysbiosis and intestinal barrier damage, creating a cycle where gut dysfunction amplifies stress responses [45]. An increase in blood LPS levels (“endotoxemia”) activates the immune system, triggering the release of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), which can cross the blood–brain barrier, leading to neuroinflammation, HPA axis activation, and behavioral symptoms, such as anhedonia, anxiety, and low mood, resembling depression or post-traumatic stress disorder (PTSD), as demonstrated in animal studies wherein LPS induced depression- and anxiety-like behaviors [46]. However, in our study, stress levels were likely lower than in elite endurance athletes or individuals with diagnosed depression, anxiety, or chronic diseases, potentially affecting the magnitude of these effects. A potential explanation is the lack of a significant reduction in lipopolysaccharide (LPS) levels in the probiotic group. Research on *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 remains mixed. One randomized trial combining animal and human data showed that this probiotic formulation reduced anxiety-like behavior in rats and improved psychological distress and coping strategies in humans [47]. In contrast, another study in individuals with low mood reported no significant changes in mood or inflammatory markers [48], while a separate trial in patients with major depressive disorder found reductions in depression scores, alongside changes in tryptophan metabolism, suggesting potential neuroimmune modulation [49]. In vitro studies using the SHIME<sup>®</sup> model also support the anti-inflammatory and gut-modulatory potential of these strains [50]. The systematic review by Heimer et al. (2022) analyzed the effects of probiotics on immune function, upper respiratory tract infections (URTI), and gastrointestinal (GI) symptoms in athletes and active individuals. The findings were inconclusive, highlighting inconsistencies across studies regarding probiotic strains, delivery methods, participant performance levels, treatment durations, and outcome assessments [51]. These findings are relevant to our study; the observed variability in probiotic efficacy across different studies and populations may explain the lack of significant changes in our measured outcomes.

#### Limitations

Given that all the participants were female, the findings of this study cannot be generalized to male populations. Sex-dependent differences in the probiotic response and ECS function suggest that future studies should include both sexes to explore potential variability. Despite efforts to recruit from multiple dance schools, performance groups, and theaters, logistical barriers and insufficient male enrollment prevented us from reaching this target. According to our pre-study power analysis, more than 100 participants would have been needed to reliably detect such effects. Therefore, all the findings should be interpreted as exploratory and preliminary.

No follow-up measurements were performed, limiting the ability to evaluate the sustainability of the observed changes over time. The study design also lacked groups receiving varying doses of the probiotics or supplementation combined with prebiotics, which could have provided insights into dose–response relationships and synergistic effects. Two randomized participants were excluded from the analysis (one due to a BMI outlier

and one due to an extreme AEA value identified as an outlier). While these exclusions were made to maintain group homogeneity and data quality, we acknowledge that removing participants post-randomization can introduce bias. The lack of an intention-to-treat analysis is a limitation of our study design. The study did not include a sedentary or low-activity control group, which limits the ability to distinguish the effects of the probiotic intervention from those related to a high level of physical activity.

It is worth noting that we did not analyze the gut microbiota composition in this trial. Therefore, any discussion about the microbiota-mediated mechanisms underlying our results remains speculative. Additionally, dietary intake was assessed only at the baseline. No method was available to monitor specific dietary components, such as arachidonic acid intake, which may influence endogenous anandamide (AEA) synthesis and could act as a potential confounding factor. However, the participants were required to agree not to introduce major dietary changes during the intervention and to report any deviations, but no continuous dietary monitoring was performed throughout the study period.

Anandamide (AEA) concentrations were measured using a commercial ELISA kit. We acknowledge that ELISA, while convenient, is not the gold standard for endocannabinoid quantification. The sensitivity and specificity of ELISA are lower than those of liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS/MS), which is the preferred method for precise AEA measurement. The selection of the ELISA was driven by financial constraints and the technical capacity of the research facility at the time. The ELISA-based methods used to quantify AEA, LPS, and cytokines are subject to inherent analytical variability; according to the manufacturer, the intra-assay CV was <10% and the inter-assay CV was <12%, suggesting that small fluctuations in the measured concentrations may fall within the scope of assay error and should be interpreted with caution.

Although one of the co-authors holds shares in the company producing the probiotic used in this study, and another receives financial compensation from the same entity, this relationship did not influence the design, statistical analysis, interpretation, or reporting of the findings. Blinding and data management procedures were designed to maintain objectivity and independence.

## 5. Conclusions

In our study, no significant impact of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 supplementation was observed on the levels of anandamide (AEA), lipopolysaccharide (LPS), or inflammatory markers in professional dancers. Although the study followed a rigorous randomized placebo-controlled design, the small sample size limits the generalizability and interpretability of the findings. Our findings should be viewed as exploratory and hypothesis generating. While prior research supports the anti-inflammatory potential of these strains, the results indicate that their efficacy may be context dependent in physically active populations. Further studies, with larger sample sizes and varied intervention designs, are warranted to explore these interactions more comprehensively.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms13061284/s1>, Table S1: Group characteristics—Age, Height, Body Mass, BMI, PAL, and Diet Composition; Table S2: Blood sample measurements—AEA, LPS, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ ; Table S3: Mediterranean Diet Adherence Index (MD index); Table S4: Stress-coping strategies assessed using the Mini-COPE questionnaire.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.W., J.K., K.S.-Ż., and A.Z.J.; methodology, J.W., J.K., K.S.-Ż., I.Ł., C.K.D., and I.G.F.; software, I.Ł. and C.K.D.; validation, J.K., I.Ł., and A.Z.J.; formal analysis, J.W., D.M., and I.G.F.; investigation, J.W., D.M., and J.K.; resources, J.W. and J.K.; data curation, J.W.; writing—original draft preparation, J.W. and J.K.; writing—review and editing, J.W., C.K.D., and D.M.; visualization, J.W. and A.Z.J.; supervision, J.K., I.G.F., and K.S.-Ż.; project administration, J.W.; funding acquisition, J.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was funded through educational resources allocated for doctoral studies at the Doctoral School of J. Wiącek.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of the Bioethics Committee at the Poznan University of Medical Sciences (approval no. 412/22, 19 May 2022).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are openly available in Zenodo at [<https://doi.org/10.5281/zenodo.15039219>]. Additionally, data are also included in the Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** We would like to express our sincere gratitude to Krzysztof Kusy and Tomasz Podgórski for their invaluable assistance in organizing this study. Their support and expertise were essential in ensuring the smooth execution of the research process.

**Conflicts of Interest:** Igor Łoniewski is a probiotic company shareholder and Karolina Skonieczna-Zydecka receives remuneration from a probiotic company Sanprobi. However, these relationships played no role in the interpretation, presentation, and publication of the data. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

AEA	Anandamide
AFUs	Active fluorescent units
ANOVA	Analysis of variance
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BIA	Bioelectrical impedance analysis
BMI	Body mass index
CB1	Cannabinoid receptor type 1
CB2	Cannabinoid receptor type 2
CFUs	Colony forming units
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
ECS	Endocannabinoid system
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EU/L	Endotoxin units per liter
GI	Gastrointestinal
HPA axis	Hypothalamic–pituitary–adrenal axis
IBS	Irritable bowel syndrome
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
IL-10	Interleukin-10
LPS	Lipopolysaccharide
MDAT	Mediterranean Diet Assessment Tool
Mini-COPE	Mini-Coping Orientation to Problems Experienced
MDD	Major depressive disorder

NF-κB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells
SCFA	Short-chain fatty acids
SD	Standard deviation
SHIME®	Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem
SMD	Standardized mean difference
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
URTI	Upper respiratory tract infection
WBC	White blood cell

## References

- Pertwee, R.G. Cannabinoid pharmacology: The first 66 years. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147* (Suppl 1), S163–S171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ohno-Shosaku, T.; Tanimura, A.; Hashimoto-dani, Y.; Kano, M. Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *Neuroscientist* **2012**, *18*, 119–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ligresti, A.; Cascio, M.G.; Di Marzo, V. Endocannabinoid metabolic pathways and enzymes. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2005**, *4*, 615–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Katona, I.; Freund, T.F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **2012**, *35*, 529–558. [[CrossRef](#)]
- Tantimonaco, M.; Ceci, R.; Sabatini, S.; Catani, M.V.; Rossi, A.; Gasperi, V.; Maccarrone, M. Physical activity and the endocannabinoid system: An overview. *Cell Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 2681–2698. [[CrossRef](#)]
- Matei, D.; Trofin, D.; Iordan, D.A.; Onu, I.; Condurache, I.; Ionite, C.; Buculei, I. The Endocannabinoid System and Physical Exercise. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1989. [[CrossRef](#)]
- Monda, V.; Villano, I.; Messina, A.; Valenzano, A.; Esposito, T.; Moscatelli, F.; Viggiano, A.; Cibelli, G.; Chieffi, S.; Monda, M.; et al. Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 3831972. [[CrossRef](#)]
- Dziewiecka, H.; Buttar, H.S.; Kasperska, A.; Ostapiuk–Karolczuk, J.; Domagalska, M.; Cichoń, J.; Skarpańska-Stejnborn, A. Physical activity induced alterations of gut microbiota in humans: A systematic review. *BMC Sports Sci. Med. Rehabil.* **2022**, *14*, 122. [[CrossRef](#)]
- Clark, A.; Mach, N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: A systematic review for athletes. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2016**, *13*, 43. [[CrossRef](#)]
- McBride, C.; Bronner, S. Injury characteristics in professional modern dancers: A 15-year analysis of work-related injury rates and patterns. *J. Sports Sci.* **2022**, *40*, 821–837. [[CrossRef](#)]
- Nunes, A.C.; Mendes, L.A.; Mota, L.A.; Lima, P.O.; Almeida, G.P. Training Load, Pain Intensity, and Functioning Can Explain Injuries in Dancers: A Classification and Regression Tree (CART) Analysis. *Med. Probl. Perform. Art.* **2022**, *37*, 73–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- van Winden, D.; van Rijn, R.M.; Savelsbergh, G.J.P.; Oudejans, R.R.D.; Stubbe, J.H. The Association Between Stress. and Injury: A Prospective Cohort Study Among 186 First-Year Contemporary Dance Students. *Front. Psychol.* **2021**, *12*, 770494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Berndt, C.; Strahler, J.; Kirschbaum, C.; Rohleder, N. Lower stress system activity and higher peripheral inflammation in competitive ballroom dancers. *Biol. Psychol.* **2012**, *91*, 357–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hendry, D.; Campbell, A.; Smith, A.; Hopper, L.; Straker, L.; O’Sullivan, P. Movement quantity and quality: How do they relate to pain and disability in dancers? *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0268444. [[CrossRef](#)]
- Cani, P.D.; Plovier, H.; Van Hul, M.; Geurts, L.; Delzenne, N.M.; Druart, C.; Everard, A. Endocannabinoids—At the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 133–143. [[CrossRef](#)]
- Rousseaux, C.; Thuru, X.; Gelot, A.; Barnich, N.; Neut, C.; Dubuquoy, L.; Dubuquoy, C.; Merour, E.; Geboes, K.; Chamailard, M.; et al. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 35–37. [[CrossRef](#)]
- Brierley, S.M.; Greenwood-Van Meerveld, B.; Sarnelli, G.; Sharkey, K.A.; Storr, M.; Tack, J. Targeting the endocannabinoid system for the treatment of abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2023**, *20*, 5–25. [[CrossRef](#)]
- Malek, N.; Popiolek-Barczyk, K.; Mika, J.; Przewlocka, B.; Starowicz, K. Anandamide, Acting via CB2 Receptors, Alleviates LPS-Induced Neuroinflammation in Rat Primary Microglial Cultures. *Neural Plast.* **2015**, *2015*, 130639. [[CrossRef](#)]
- Berg, B.B.; Linhares, A.F.S.; Martins, D.M.; Rachid, M.A.; Cau, S.B.d.A.; de Souza, G.G.; de Carvalho, J.C.S.; Sorgi, C.A.; Romero, T.R.L.; Pinho, V.; et al. Anandamide reduces the migration of lymphocytes to the intestine by CB2 activation and reduces TNF-α in the target organs, protecting mice from graft-versus-host disease. *Eur. J. Pharmacol.* **2023**, *956*, 175932. [[CrossRef](#)]




20. Vercelli, C.A.; Aisemberg, J.; Billi, S.; Wolfson, M.L.; Franchi, A.M. Endocannabinoid system and nitric oxide are involved in the deleterious effects of lipopolysaccharide on murine decidua. *Placenta* **2009**, *30*, 579–584. [[CrossRef](#)]
21. Liu, J.; Batkai, S.; Pacher, P.; Harvey-White, J.; Wagner, J.A.; Cravatt, B.F.; Gao, B.; Kunos, G. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45034–45039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Molina-Holgado, F.; Lledó, A.; Guaza, C. Anandamide suppresses nitric oxide and TNF-alpha responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport* **1997**, *8*, 1929–1933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Jansma, J.; Brinkman, F.; van Hemert, S.; El Aidy, S. Targeting the endocannabinoid system with microbial interventions to improve gut integrity. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2021**, *106*, 110169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Maccarrone, M.; De Petrocellis, L.; Bari, M.; Fezza, F.; Salvati, S.; Di Marzo, V.; Finazzi-Agrò, A. Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *393*, 321–328. [[CrossRef](#)]
25. Khan, R.N.; Maner-Smith, K.; Owens, J.A.; Barbian, M.E.; M Jones, R.; Naudin, C.R. At the heart of microbial conversations: Endocannabinoids and the microbiome in cardiometabolic risk. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1911572. [[CrossRef](#)]
26. Cristofori, F.; Dargenio, V.N.; Dargenio, C.; Miniello, V.L.; Barone, M.; Francavilla, R. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 578386. [[CrossRef](#)]
27. Rodes, L.; Khan, A.; Paul, A.; Coussa-Charley, M.; Marinescu, D.; Tomaro-Duchesneau, C.; Shao, W.; Kahouli, I.; Prakash, S. Effect of probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on gut-derived lipopolysaccharides and inflammatory cytokines: An in vitro study using a human colonic microbiota model. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *23*, 518–526. [[CrossRef](#)]
28. Wang, H.; Lee, I.S.; Braun, C.; Enck, P. Effect of Probiotics on Central Nervous System Functions in Animals and Humans: A Systematic Review. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **2016**, *22*, 589–605. [[CrossRef](#)]
29. Mohammadi, G.; Dargahi, L.; Peymani, A.; Mirzanejad, Y.; Alizadeh, S.A.; Naserpour, T.; Nassiri-Asl, M. The Effects of Probiotic Formulation Pretreatment (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) on a Lipopolysaccharide Rat Model. *J. Am. Coll. Nutr.* **2019**, *38*, 209–217. [[CrossRef](#)]
30. Mohammadi, G.; Dargahi, L.; Naserpour, T.; Mirzanejad, Y.; Alizadeh, S.A.; Peymani, A.; Nassiri-Asl, M. Probiotic mixture of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 attenuates hippocampal apoptosis induced by lipopolysaccharide in rats. *Int. Microbiol.* **2019**, *22*, 317–323. [[CrossRef](#)]
31. Partrick, K.A.; Rosenhauer, A.M.; Auger, J.; Arnold, A.R.; Ronczkowski, N.M.; Jackson, L.M.; Lord, M.N.; Abdulla, S.M.; Chassaing, B.; Huhman, K.L. Ingestion of probiotic (*Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum*) alters intestinal microbial structure and behavioral expression following social defeat stress. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ait-Belgnaoui, A.; Payard, L.; Rolland, C.; Harkat, C.; Braniste, V.; Théodorou, V.; Tompkins, T.A. *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus helveticus* Synergistically Suppress Stress-related Visceral Hypersensitivity Through Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Modulation. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **2018**, *24*, 138–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Myles, E.M.; O'Leary, M.E.; Smith, R.; MacPherson, C.W.; Oprea, A.; Melanson, E.H.; Tompkins, T.A.; Perrot, T.S. Supplementation with Combined *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 Across Development Reveals Sex Differences in Physiological and Behavioural Effects of Western Diet in Long-Evans Rats. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Esposito, P.; Kearns, M.M.; Smith, K.B.; MacPherson, C.W.; Oprea, A.; Melanson, E.H.; Tompkins, T.A.; Perrot, T.S. The effects of antimicrobials and lipopolysaccharide on acute immune responsivity in pubertal male and female CD1 mice. *Compr. Psychoneuroendocrinology* **2022**, *11*, 100147. [[CrossRef](#)]
35. Misera, A.; Liśkiewicz, P.; Łoniewski, I.; Skonieczna-Żydecka, K.; Samochowiec, J. Effect of Psychobiotics on Psychometric Tests and Inflammatory Markers in Major Depressive Disorder: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials with Meta-Regression. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 952. [[CrossRef](#)]
36. Gil-Hernández, E.; Ruiz-González, C.; Rodríguez-Arrastia, M.; Ropero-Padilla, C.; Rueda-Ruzafa, L.; Sánchez-Labraca, N.; Roman, P. Effect of gut microbiota modulation on sleep: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Nutr. Rev.* **2023**, *81*, 1556–1570. [[CrossRef](#)]
37. Rode, J.; Edebol Carlman, H.M.T.; König, J.; Reipsilber, D.; Hutchinson, A.N.; Thunberg, P.; Andersson, P.; Persson, J.; Kiselev, A.; Stern, L.L.; et al. Probiotic Mixture Containing *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum* and *Lactiplantibacillus plantarum* Affects Brain Responses Toward an Emotional Task in Healthy Subjects: A Randomized Clinical Trial. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 827182. [[CrossRef](#)]
38. Varghese, S.; Rao, S.; Khattak, A.; Zamir, F.; Chaari, A. Physical Exercise and the Gut Microbiome: A Bidirectional Relationship Influencing Health and Performance. *Nutrients* **2024**, *16*, 3663. [[CrossRef](#)]
39. Mohr, A.E.; Pugh, J.; O'Sullivan, O.; Black, K.; Townsend, J.R.; Pyne, D.B.; Wardenaar, F.C.; West, N.P.; Whisner, C.M.; McFarland, L.V. Best Practices for Probiotic Research in Athletic and Physically Active Populations: Guidance for Future Randomized Controlled Trials. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 809983. [[CrossRef](#)]

40. Aykut, M.N.; Erdoğan, E.N.; Çelik, M.N.; Gürbüz, M. An Updated View of the Effect of Probiotic Supplement on Sports Performance: A Detailed Review. *Curr. Nutr. Rep.* **2024**, *13*, 251–263. [[CrossRef](#)]
41. Liu, M.; Tandorost, A.; Moludi, J.; Dey, P. Prebiotics Plus Probiotics May Favorably Impact on Gut Permeability, Endocannabinoid Receptors, and Inflammatory Biomarkers in Patients with Coronary Artery Diseases: A Clinical Trial. *Food Sci. Nutr.* **2023**, *12*, 1207–1217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zheng, Y.; Zhang, Z.; Tang, P.; Wu, Y.; Zhang, A.; Li, D.; Wang, C.-Z.; Wan, J.-Y.; Yao, H.; Yuan, C.-S. Probiotics fortify intestinal barrier function: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1143548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Milajerdi, A.; Mousavi, S.M.; Sadeghi, A.; Salari-Moghaddam, A.; Parohan, M.; Larijani, B.; Esmailzadeh, A. The effect of probiotics on inflammatory biomarkers: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Eur. J. Nutr.* **2020**, *59*, 633–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Łagowska, K.; Bajerska, J. Probiotic Supplementation and Respiratory Infection and Immune Function in Athletes: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Athl. Train.* **2021**, *56*, 1213–1223. [[CrossRef](#)]
45. Johnson, D.; Letchumanan, V.; Thum, C.C.; Thurairajasingam, S.; Lee, L.H. A Microbial-Based Approach to Mental Health: The Potential of Probiotics in the Treatment of Depression. *Nutrients* **2023**, *15*, 1382. [[CrossRef](#)]
46. Srivastava, R.K.; Lutz, B.; Ruiz de Azua, I. The Microbiome and Gut Endocannabinoid System in the Regulation of Stress Responses and Metabolism. *Front. Cell Neurosci.* **2022**, *16*, 867267. [[CrossRef](#)]
47. Messaoudi, M.; Lalonde, R.; Violle, N.; Javelot, H.; Desor, D.; Nejd, A.; Bisson, J.F.; Rougeot, C.; Pichelin, M.; Cazaubiel, M.; et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br. J. Nutr.* **2011**, *105*, 755–764. [[CrossRef](#)]
48. Romijn, A.R.; Rucklidge, J.J.; Kuijter, R.G.; Frampton, C. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* for the symptoms of depression. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* **2017**, *51*, 810–821. [[CrossRef](#)]
49. Kazemi, A.; Noorbala, A.A.; Azam, K.; Eskandari, M.H.; Djafarian, K. Effect of probiotic and prebiotic vs placebo on psychological outcomes in patients with major depressive disorder: A randomized clinical trial. *Clin. Nutr.* **2019**, *38*, 522–528. [[CrossRef](#)]
50. De Oliveira, F.L.; Salgado, M.K.; de Oliveira, M.T.; Mesa, V.; Sartoratto, A.; Peregrino, A.M.; Ramos, W.S.; Sivieri, K. Exploring the Potential of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 as Promising Psychobiotics Using SHIME. *Nutrients* **2023**, *15*, 1521. [[CrossRef](#)]
51. Heimer, M.; Teschler, M.; Schmitz, B.; Mooren, F.C. Health Benefits of Probiotics in Sport and Exercise—Non-existent or a Matter of Heterogeneity? A Systematic Review. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 1051918, Erratum in *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 804046. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

# A Randomized Controlled Trial Evaluating the Effects of a Probiotic Containing *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 on Gastrointestinal Symptoms and Metabolomic Profiles in Female Dancers

Jakub Wiącek <sup>1</sup>, Karolina Skonieczna-Żydecka <sup>2,\*</sup>, Igor Łoniewski <sup>3</sup>, Daniel Styburski <sup>2</sup>,  
Mariusz Kaczmarczyk <sup>2,3</sup> and Joanna Karolkiewicz <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Food and Nutrition, Poznan University of Physical Education, 61-871 Poznan, Poland; wiacek@awf.poznan.pl (J.W.); karolkiewicz@awf.poznan.pl (J.K.)

<sup>2</sup> Department of Biochemical Research, Pomeranian Medical University, 70-204 Szczecin, Poland; daniel.styburski@sanprobi.pl (D.S.); mariusz.kaczmarczyk@pum.edu.pl (M.K.)

<sup>3</sup> Sanprobi Sp. z o.o. Sp.K., 70-535 Szczecin, Poland; sanprobi@sanprobi.pl

\* Correspondence: karolina.skonieczna.zydecka@pum.edu.pl

**Abstract:** Dancers experience physical and psychological stressors that can impact gut health. We hypothesized that a three-month supplementation with *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 would result in measurable alterations in the fecal metabolomic profile and improve gastrointestinal symptomatology in dancers. Of the 51 volunteers, 26 female dancers were randomized to a 12-week trial (NCT05567653). A homogenous group of 16 (probiotic:  $n = 5$ ; placebo:  $n = 11$ ) was analyzed. The participants received *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175 ( $3 \times 10^9$  colony-forming units/day) or a placebo. Baseline dietary intake and body composition were recorded. Fecal samples were analyzed using liquid chromatography–mass spectrometry, and gastrointestinal symptoms were assessed with the Rome IV questionnaire. Statistical methods included principal component analysis, mixed-effects models, and analysis of variance–simultaneous component analysis (ASCA). The study revealed shifts in the probiotic group’s fecal metabolome (permutation test  $p = 0.026$ ), including a reduction in (2RS)-2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid ( $p = 0.023$ ). No improvement in gastrointestinal symptoms was observed. No adverse events occurred. *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175 may alter the gut metabolome, notably (2RS)-2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, but small sample size and absent symptom improvement limit the conclusions. Larger studies with varied doses and blood metabolite analysis are needed to confirm relevance.

**Keywords:** gut metabolome; probiotics; sports nutrition; *Lactobacillus helveticus* R0052; *Bifidobacterium longum* R0175



Academic Editors: Baojun Xu and Matteo Bordiga

Received: 8 May 2025

Revised: 15 June 2025

Accepted: 16 June 2025

Published: 18 June 2025

**Citation:** Wiącek, J.; Skonieczna-Żydecka, K.; Łoniewski, I.; Styburski, D.; Kaczmarczyk, M.; Karolkiewicz, J. A Randomized Controlled Trial Evaluating the Effects of a Probiotic Containing *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 on Gastrointestinal Symptoms and Metabolomic Profiles in Female Dancers. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 5823. <https://doi.org/10.3390/ijms26125823>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Dancers experience intense pressure to maintain a specific physique, often adopting restrictive eating habits that increase the risk of undernutrition and gastrointestinal disorders, while late-night rehearsals disrupt circadian rhythms, impairing sleep and recovery, and frequent travel exposes them to diverse environments and pathogens, heightening infection risk [1–5]. Comprehensive nutritional support is essential to help dancers manage these challenges effectively. Similarly to athletes, dancers inherently experience conditions

linked to significant gut microbiota and metabolomic changes, as their high-intensity, prolonged training—often exceeding 30 min multiple times per week—falls within the exercise parameters known to alter microbial composition and metabolism [6,7]. The physical demands of dance, combining aerobic and anaerobic elements, drive metabolic shifts in energy metabolism, oxidative stress, and recovery, while long-term training fosters sustained metabolomic changes, promoting such metabolites as short-chain fatty acids (SCFAs), amino acid derivatives, and lipid mediators linked to energy efficiency, anti-inflammatory responses, and neuromuscular adaptation [8,9]. The ability of dancers to maintain these rigorous physical demands positions them as an ideal population for exploring the interplay between exercise, the gut microbiota, and the metabolome.

Probiotic supplementation has been shown to enhance athletic performance by modulating the gut microbiota and the metabolome, increasing beneficial metabolites such as SCFAs and reducing inflammation and oxidative stress [10]. This modulation may lead to increased production of short-chain fatty acids (SCFAs) such as acetate, propionate, and butyrate. SCFAs play a crucial role in maintaining the intestinal barrier integrity by serving as energy sources for colonocytes and promoting the expression of tight junction proteins. Additionally, SCFAs exhibit immunomodulatory effects; for instance, butyrate has been shown to promote the differentiation of regulatory T cells (Tregs) and suppress pro-inflammatory cytokine production, contributing to immune homeostasis [11]. In the context of physical performance, these mechanisms are particularly relevant. Enhanced intestinal barrier function can reduce the translocation of endotoxins, thereby decreasing systemic inflammation—a common issue in athletes undergoing intense training. Moreover, the immunomodulatory effects of SCFAs can support recovery and reduce the incidence of infections, which are prevalent among athletes due to physical stress [12,13]. Specific strains, such as those from the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera, have been shown to support endurance, reduce fatigue, and enhance nutrient absorption, including branched-chain amino acids and iron, thereby aiding muscle repair and aerobic capacity [14–16]. *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 are among the most frequently studied probiotics affecting mental health and sleep quality [17–19]. Moreover, they were shown to produce a range of metabolites, such as SCFAs, gamma-aminobutyric acid (GABA), and cytokines, which support gut microbiota stability, enhance the intestinal barrier function, and modulate immune responses, all of which are critical for athletes exposed to high physical and metabolic demands [20,21]. *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175 have been shown to restore the gut barrier integrity and reduce systemic inflammation in stress-induced models. For example, this probiotic combination significantly reversed intestinal hyperpermeability and lowered inflammatory markers in a rat model of myocardial infarction-induced depression [22]. A study involving Syrian hamsters subjected to social defeat stress found that administration of *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175 altered the gut microbial composition and increased levels of anti-inflammatory cytokines such as interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), and interleukin-10 (IL-10) [23]. Various subspecies of *Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum* have been studied for their potential roles in maintaining the gut barrier integrity and modulating inflammation. For example, analysis of the cell wall structure of *Lactobacillus helveticus* using atomic force microscopy revealed the presence of twisted peptidoglycan fibers approximately 26 nm in thickness, which may contribute to maintaining the bacterium's structural integrity and potentially influence its interactions with the intestinal epithelium [24]. Additionally, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* FJSYZ1M3 has been shown to ameliorate dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice by maintaining the intestinal barrier, regulating inflammatory cytokines, and modifying the gut microbiota. Specifically, this strain improved the integrity of intestinal tight junctions, relieved mucus layer damage, and inhibited epithelial cell

apoptosis, thereby maintaining the intestinal barrier. Additionally, it significantly affected the levels of inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and IL-10 in the colon, thus relieving inflammation in colitis mice [25].

This study hypothesized that a three-month-long supplementation with a probiotic containing *Lactobacillus helveticus* (Rosell-0052) and *Bifidobacterium longum* (Rosell-0175) would lead to significant changes in the fecal metabolomic profile of dancers compared to those receiving a placebo. While dancers do not undergo training as rigorously as elite athletes such as marathon runners or rugby players, the demands of their physical activity align with the study's goals. The research focused exclusively on female participants, as their enrollment rate was 20 times higher than that of males. Moreover, probiotic effects might differ based on sex, and including both genders could have introduced variability, making data interpretation more complex [26]. The primary outcomes included the assessment of untargeted metabolomic shifts and the levels of specific metabolites potentially influenced by the intervention. Untargeted metabolomics enabled broad comparisons between groups, identifying metabolic shifts and potential early perturbations without prior assumptions. As a secondary outcome, we evaluated the impact of probiotic supplementation on gastrointestinal symptoms, including constipation, diarrhea, and sensations of fullness, measured using the Rome IV questionnaire. We hypothesized that probiotic supplementation would reduce Irritable Bowel Syndrome (IBS)-like symptoms, such as abdominal pain and constipation.

## 2. Results

### 2.1. Baseline Characteristics

Based on the baseline data, no significant differences were observed between the placebo and probiotic groups in terms of anthropometric variables, including age, body mass, BMI (body mass index), body fat percentage, and physical activity levels. Similarly, the dietary characteristics of the participants were comparable between the two groups at the start of the study. Parameters such as total energy intake, proteins, fats, total cholesterol, carbohydrates, sucrose, fiber, and the 14-Item Mediterranean Diet Assessment Tool showed no statistically significant variations. The characteristics of the groups and the diet are presented in Table 1. The participant data were previously used in a separate publication focusing on probiotic effects unrelated to the outcomes reported here.

**Table 1.** Baseline characteristics of the study group, including data on body mass, body composition, physical activity levels, and diet.

	Placebo ( <i>n</i> = 11) Mean $\pm$ SD	Probiotic ( <i>n</i> = 5) Mean $\pm$ SD	<i>p</i> -Value *
Anthropometric characteristics			
Age [years]	20.55 $\pm$ 1.04	20.00 $\pm$ 1.30	0.55 <sup>b</sup>
Body mass [kg]	58.07 $\pm$ 6.95	60.10 $\pm$ 7.31	0.99 <sup>a</sup>
BMI (body mass index) [kg/m <sup>2</sup> ]	21.05 $\pm$ 2.18	20.80 $\pm$ 2.29	0.93 <sup>a</sup>
Fat [% body mass]	27 $\pm$ 4	27 $\pm$ 3	0.84 <sup>a</sup>
Physical activity level [hours per week]	17.11 $\pm$ 6.98	16.00 $\pm$ 9.77	0.69 <sup>b</sup>
Diet composition			
Energy [kcal]	1999.23 $\pm$ 279.81	2325.54 $\pm$ 425.00	0.26 <sup>a</sup>
Proteins [g]	85.29 $\pm$ 30.13	100.47 $\pm$ 21.09	0.51 <sup>a</sup>

Table 1. Cont.

	Placebo ( <i>n</i> = 11) Mean ± SD	Probiotic ( <i>n</i> = 5) Mean ± SD	<i>p</i> -Value *
Fats [g]	74.56 ± 13.93	90.47 ± 18.72	0.41 <sup>a</sup>
Total cholesterol [mg]	216.73 ± 104.36	330.21 ± 140.77	0.40 <sup>a</sup>
Carbohydrates [g]	271.12 ± 53.14	298.79 ± 57.98	0.75 <sup>a</sup>
Sucrose [% of carbohydrates]	10.27 ± 3.89	6.75 ± 2.81	0.09 <sup>a</sup>
Fiber [g]	28.96 ± 15.13	21.36 ± 12.67	0.91 <sup>b</sup>
Mediterranean diet adherence [0–14]	5.46 ± 1.86	6.20 ± 2.49	0.42 <sup>a</sup>
Fruits [150–200 g portions per day]	1.64 ± 0.67	1.60 ± 0.55	1.00 <sup>b</sup>
Vegetables [200 g portions per day]	2.36 ± 0.92	3.20 ± 0.84	0.10 <sup>b</sup>
Legumes [150 g portions per day]	1.55 ± 1.51	2.40 ± 2.51	0.60 <sup>b</sup>
Nuts [30 g portions per day]	2.46 ± 1.44	3.00 ± 1.23	0.56 <sup>b</sup>
Hematologic markers			
WBC (white blood cells) [ $\times 10^9$ /L]	5.54 ± 0.84	5.94 ± 1.17	0.50 <sup>a</sup>
Lymphocytes [ $\times 10^9$ /L]	2.34 ± 0.79	2.60 ± 0.46	0.41 <sup>a</sup>

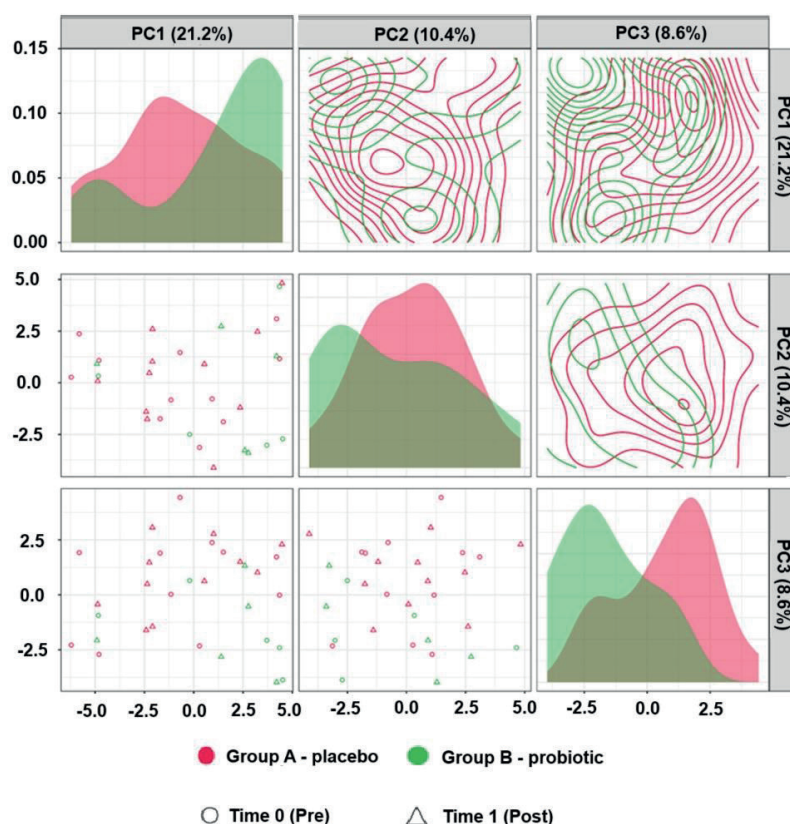
Note: \* probability under the null hypothesis obtained using *t*-test or Mann–Whitney U test if normality was not assumed, <sup>a</sup> *t*-test, <sup>b</sup> Mann–Whitney U test.

These findings indicate that the groups were homogenous at baseline, providing a solid foundation for assessing the effects of the probiotic intervention without confounding factors related to the initial differences in body composition, physical activity, or dietary habits. Although overall adherence to the Mediterranean diet did not differ substantially between the groups, the estimated intake levels of specific food groups within this pattern showed greater variability. Despite the lack of statistically significant differences based on the Mann–Whitney U test, certain trends, particularly in the consumption of legumes and vegetables, which are known to significantly influence the gut microbiota composition, suggest that habitual intake may not have been entirely uniform across the participants.

## 2.2. Untargeted Metabolomics (Liquid Chromatography–Mass Spectrometry)

Principal component analysis (PCA) did not reveal a distinct clustering of the samples by intervention group or time point (Figure 1), indicating broadly overlapping global metabolomic profiles at baseline and post-intervention. Nonetheless, minor differences, potentially attributable to unreported or low-resolution dietary variation, cannot be excluded as contributors to specific metabolite-level changes, despite efforts to evaluate dietary adherence and comparability.

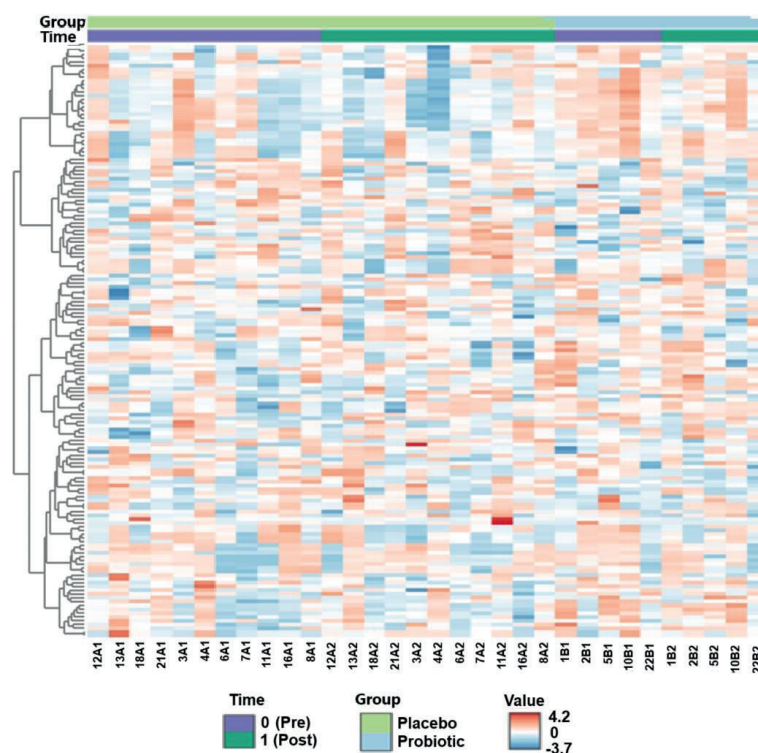
A heatmap with log-transformed values visualized metabolic differences, with metabolites as rows and individuals as columns. The difference in concentrations between the probiotic group (red) and the placebo group (blue) may indicate an intervention-related shift; however, this does not imply a unidirectional effect (Figure 2). Metabolites were clustered by similarity, with annotations for group (A—placebo, B—probiotic) and time (0—pre, 1—post). The metabolite list is in the Supplementary Materials. A permutation test confirmed a significant intervention effect ( $p = 0.026$ ), while time and interaction effects were non-significant, indicating the intervention as the primary driver of change.



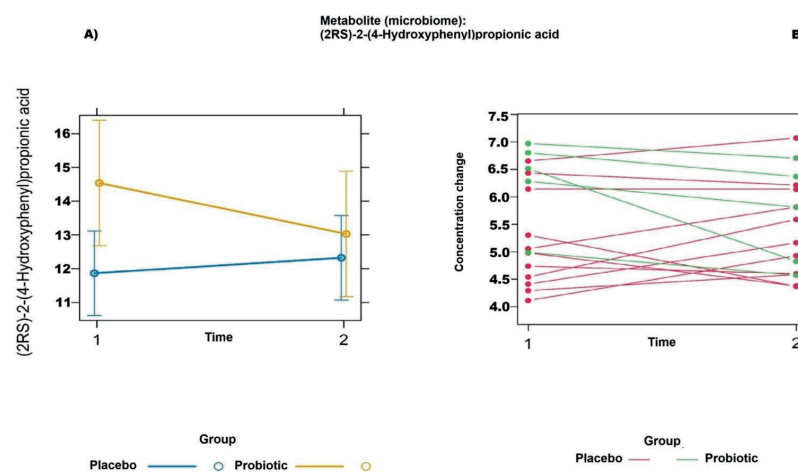
**Figure 1.** Principal component analysis (PCA) of metabolic profiles at baseline and post-intervention in the placebo and probiotic groups (A—placebo, B—probiotic). The PCA plot shows individual samples clustered by intervention group and time point.

A mixed-effects model was applied to evaluate whether the trajectories of metabolite changes over time varied between the two intervention groups. The analysis revealed that one metabolite, (2RS)-2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, demonstrated the strongest statistical association, with an uncorrected  $p$ -value of 0.023, based on the Kenward–Roger approximation. These findings are visualized in Figure 3A. The predictor effect plot illustrates the coefficients for the fixed effects, including intervention, time, and their interaction. The significant interaction observed appears to be driven predominantly by baseline differences between the groups. In addition to the mixed-effects model, a multivariate empirical Bayes analysis of variance (MEBA) was performed (Figure 3B) to assess temporal profiles across biological conditions. MEBA identified (2RS)-2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid as one of the metabolites with the highest differential time-dependent response between the intervention groups.

The ASCA (ANOVA–simultaneous component analysis) identified four metabolites as “well-modeled,” indicating their strong contribution to defining the metabolic differences between the groups. Among these, (2RS)-2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid stood out as a key metabolite linked to the intervention, as highlighted by their significance in the mixed-effects model. These findings, together with observations from the heatmap and fold change analyses (Table 2), suggest that the intervention induces distinct metabolic shifts. Only metabolites with a  $\log_2$  fold change greater than 2 were selected from the cross-sectional analysis, corresponding to at least a fourfold increase in the probiotic group.



**Figure 2.** Heatmap of log-transformed metabolite values for placebo and probiotic groups (metabolite list available in Supplementary Materials). Rows represent metabolites, columns—individual samples. Color coding shows concentration differences (red = higher, blue = lower). Clustering indicates metabolic shifts due to the intervention. The heatmap displays log-transformed (non-normalized) metabolite intensities; negative values represent low-concentration features with intensity values below 1 prior to transformation.



**Figure 3.** Predictor effect plot (A) and MEBA (B): intervention and time effects on (2RS)-2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid.

**Table 2.** Cross-sectional analysis at the endpoint showing metabolites with altered concentrations in the probiotic group compared to baseline ( $\log_2$  fold change > 2).

Metabolite	Fold Change	$\log_2(\text{FC})$
Hippuric acid [M-H] <sup>-</sup>	8938.800000	13.1260
Curcumin (NIST EL) [M+H] <sup>+</sup>	354.050000	8.4678
Hyocholic acid (microbiome) [M-H] <sup>-</sup>	0.036575	-4.7730
Quinic acid [M+AcO-H] <sup>-</sup>	23.103000	4.5300
Genistein [M-H] <sup>-</sup>	21.530000	4.4283
Estriol [M-H] <sup>-</sup>	18.119000	4.1795
Naringenin (microbiome) [M-H] <sup>-</sup>	12.869000	3.6858
Taurine [M-H] <sup>-</sup>	0.119930	-3.0597
Alpha-linolenic acid [M-H] <sup>-</sup>	6.776500	2.7605
Alpha-linolenic acid [M+FA-H] <sup>-</sup>	6.574100	2.7168
3a,12a-dihydroxy-7-oxo-5b-cholan-24-oic acid (microbiome) [M-H] <sup>-</sup>	0.172040	-2.5392
Peimine [M+H] <sup>+</sup>	5.497000	2.4586
Kaurenoic acid [M-H] <sup>-</sup>	0.202690	-2.3027
4-Methyl-5-thiazoleethanol (microbiome) [M+H] <sup>+</sup>	4.839600	2.2749
Cholic acid [M-H] <sup>-</sup>	0.222740	-2.1666
Valproic acid [M-H] <sup>-</sup>	4.270200	2.0943

Cross-sectional analysis at the endpoint revealed substantial changes in metabolite levels following probiotic supplementation, with several compounds, including hippuric acid and curcumin, showing marked increases ( $\log_2\text{FC} > 2$ ). However, not all fold changes reached statistical significance due to interindividual variability. Some of the identified metabolites, such as curcumin and naringenin, may reflect the intake of phytochemical-rich supplements; however, none of the participants reported the use of such supplements in the relevant section of the dietary records, and adherence to the Mediterranean diet pattern, used to assess dietary similarity between the groups, did not reveal marked differences. To further assess the robustness of these findings, a *t*-test (Table 3) was performed, identifying a subset of metabolites that exhibited statistically significant differences between the probiotic and placebo groups.

An FDR of ~0.46 indicates that after correction, none of the metabolites reached statistical significance. However, this does not exclude biologically relevant effects, as FDR correction is highly conservative in small sample sizes and can mask meaningful trends, especially in exploratory studies.

**Table 3.** Metabolites with significant differences at the endpoint (*t*-test results). The *t*-statistic shows the direction and magnitude of the change, with negative values indicating lower levels in the probiotic group. The *p*-value represents significance before correction, while the false discovery rate (FDR) adjusts for multiple comparisons.

Metabolite	<i>t</i> -Test	<i>p</i> -Value	$-\log_{10}(p)$	FDR
Hyocholic acid (microbiome) [M-H] <sup>-</sup>	-2.8552	0.012719	1.8955	0.45892
L-phenylalanine [M-H] <sup>-</sup>	-2.7714	0.015002	1.8239	0.45892

Table 3. Cont.

Metabolite	<i>t</i> -Test	<i>p</i> -Value	$-\log_{10}(p)$	FDR
L-tryptophan [M-H] <sup>-</sup>	-2.6018	0.020902	1.6798	0.45892
1-Aminocyclohexanecarboxylic acid (NIST EL) [M+H] <sup>+</sup>	2.5913	0.021336	1.6709	0.45892
L-phenylalanine [M+H] <sup>+</sup>	-2.4408	0.028545	1.5445	0.45892
3a,12a-dihydroxy-7-oxo-5b-cholan-24-oic acid (microbiome) [M-H] <sup>-</sup>	-2.4157	0.029951	1.5236	0.45892
Kaurenoic acid [M-H] <sup>-</sup>	-2.3055	0.036961	1.4323	0.45892
D-citramalic acid lithium salt (microbiome) [M-H] <sup>-</sup>	2.2485	0.041167	1.3855	0.45892
5-Aminopentanoic acid [M-H] <sup>-</sup>	-2.1452	0.049965	1.3013	0.45892

### 2.3. Gastrointestinal Complaints (Rome-IV Questionnaire)

Gastrointestinal symptom assessment showed a general reduction in both groups, though most changes were not statistically significant. As shown in Table 4, only constipation showed a significant time effect ( $p = 0.0298$ ). No significant effects were found for postprandial fullness, abdominal pain, menstrual pain, or diarrhea.

Table 4. Gastrointestinal complaints assessment before (Pre) and after (Post) the intervention (12 weeks between Pre and Post).

	PLA ( <i>n</i> = 11) Mean ± SD		PRO ( <i>n</i> = 5) Mean ± SD		2-Way ANOVA <i>p</i> -Value ( $\eta^2$ )		
	Pre	Post	Pre	Post	Group	Ttime	Group × Time
Postprandial fullness [0–10]	2.91 ± 1.38	2.32 ± 1.31	3.00 ± 1.54	3.00 ± 1.83	0.508 (0.032)	0.592 (0.021)	0.592 (0.021)
Abdominal pain [0–10]	5.00 ± 1.55	4.45 ± 1.37	4.00 ± 1.58	3.80 ± 1.79	0.308 (0.074)	0.182 (0.124)	0.525 (0.294)
Menstrual pain [0–10]	7.27 ± 4.05	5.55 ± 3.21	6.80 ± 4.21	5.60 ± 4.28	0.905 (0.001)	0.224 (0.104)	0.822 (0.004)
Constipation [0–10]	4.16 ± 1.39	3.36 ± 1.67	3.92 ± 0.95	2.84 ± 1.85	0.603 (0.020)	0.030 (0.295)	0.724 (0.009)
Diarrhea [0–10]	3.64 ± 2.01	2.73 ± 1.42	2.40 ± 1.67	2.20 ± 0.84	0.262 (0.089)	0.242 (0.096)	0.448 (0.042)

### 3. Discussion

This is the first study to evaluate the untargeted gut metabolome in artistic athletes following a 3-month probiotic supplementation period. The present study shows that participation in a 3-month study involving a probiotic formula consisting of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 may affect the gut metabolome of professional dancers. Research on the metabolomic effects of *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175 is limited, but some evidence supports their influence. A study using the SHIME® (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem, ProDigest BV, a spin-off from Ghent University, Ghent, Belgium) model in adults with mild anxiety found that a two-week supplementation increased acetic acid and total SCFAs while modulating the gut microbiota, notably boosting *Lactobacillus* and *Olsenella* and reducing *Lachnospira* and *Escherichia/Shigella* [27].

The key metabolite 2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (2-HPP), identified in our analysis, is involved in the gut microbial metabolism of isoflavonoids such as genistein and daidzein from soy. According to the Human Metabolome Database, 2-HPP is present in several biofluids, including blood and urine [28]. Probiotics can modulate the gut microbiota and influence the metabolism of plant-derived antioxidants by affecting microbial enzyme activity, such as the  $\beta$ -glucuronidases involved in isoflavone deconjugation [29]. This may enhance alternative pathways and increase the production of 2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (2-HPP), a gut-derived metabolite of genistein from soy [30]. Along with dihydrogenistein, 2-HPP is produced via microbial cleavage of genistein's isoflavonoid structure, indicating active microbial metabolism and subsequent absorption [31]. For example, the bacterial strain SY8519 can convert daidzein into O-desmethylangolensin and produce optically active 2-HPP from genistein, with chiral HPLC confirming the R-enantiomer. In adipocyte studies, both genistein and 2-HPP inhibited leptin secretion, though 2-HPP was less potent [32]. 2-HPP has been associated with effects on lipid metabolism, including the inhibition of lipid accumulation and improvement of lipid processing [33]. The anaerobic gut bacterium *Eubacterium ramulus*, commonly present in the human gut, metabolizes flavonoids such as genistein and daidzein into 2-HPP and O-desmethylangolensin by breaking down flavonoid rings into hydroxyphenylpropionic and hydroxyphenylacetic acids, along with acetate and butyrate [34]. Its flavonoid-degrading activity has been confirmed both in vitro and in vivo, including in rats fed quercetin, where 3,4-dihydroxyphenylacetic acid was detected in feces. Probiotic-driven microbiome enrichment may support the colonization of *E. ramulus*, as flavonoid-rich diets are known to increase its abundance [35]. Studies on isoflavone and lignan metabolism show that gut microbiota-mediated deglycosylation increases flavonoid aglycones (e.g., quercetin, kaempferol), enhancing their bioavailability and activity. A decline in antioxidant activity and phenolic content, alongside elevated levels of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 2-HPP, protocatechuic acid, and catechol, indicates partial or full flavonoid catabolism by the microbiota [36]. Moreover, 2-HPP has been linked to increased *Bifidobacterium* abundance in rats, and long-term intake of phenolic compounds suggests 2-HPP may contribute to gut microbiota modulation and adaptation [37]. The reduced 2-HPP levels in the probiotic group may reflect enhanced intestinal absorption or increased microbial conversion into secondary metabolites, both influenced by probiotic-driven changes in the gut microbiota. These results support the hypothesis that probiotics significantly alter the gut metabolome, particularly in pathways linked to plant antioxidant metabolism. To date, no studies have directly examined 2-HPP in the context of athletic performance or health. While specific studies on 2-HPP in athletic populations are lacking, the general benefits of polyphenol metabolites on exercise performance and recovery have been documented. For instance, polyphenol supplementation has been associated with improved aerobic endurance and fat oxidation in athletes [38].

The magnitude of fold change (FC)—in some cases exceeding several orders—indicates a robust biological response to probiotic supplementation. Notably, hippuric acid levels increased markedly in the probiotic group post-intervention. Hippuric acid is a well-established host microbiota co-metabolite, produced through the microbial metabolism of dietary polyphenols and aromatic amino acids [39]. Elevated hippuric acid levels are commonly linked to enhanced microbial activity and polyphenol-rich diets, correlating with greater microbiota diversity [40]. Our results may indicate that the intervention modulated microbial pathways associated with hippurate production, possibly by enhancing the biotransformation of dietary polyphenols or aromatic amino acids such as phenylalanine. Changes also affected polyphenol-related and diet-derived metabolites closely linked to gut microbiota activity [41]. Naringenin and genistein levels increased markedly in the probiotic group after intervention. These findings may suggest enhanced microbial

release and bioavailability potentially influenced by probiotic activity, an effect that was not evident in the placebo group. However, this observation may also reflect uncontrolled intake of specific dietary components, as the participants were instructed—but not strictly monitored—to maintain identical dietary habits prior to the first and second sampling time points.

The probiotic intervention may have modulated the bile acid profile, as indicated by lower endpoint levels of certain bile acid derivatives—such as hyocholic acid—in the probiotic group. This aligns with known probiotic activity, particularly bile salt hydrolase (BSH)-mediated deconjugation, which reduces conjugated bile acids while releasing free bile acids and amino acids such as taurine or glycine [42,43]. Furthermore, bile acids, including HCA, interact with host receptors such as the farnesoid X receptor (FXR) and G protein-coupled bile acid receptor 1 (TGR5), which play roles in regulating inflammation and maintaining the intestinal barrier integrity [44]. The observed reductions in tryptophan and phenylalanine levels following probiotic supplementation may result from enhanced microbial metabolism of these aromatic amino acids. Probiotics can modulate the gut microbiota composition, leading to increased catabolism of tryptophan via the kynurenine pathway and phenylalanine through various microbial enzymatic activities. This enhanced microbial utilization could decrease the systemic availability of these amino acids, as supported by studies indicating that probiotic intervention influences aromatic amino acid metabolism [45,46] and our observation regarding HCA levels.

In our study, we did not observe significant improvements in gastrointestinal symptoms such as abdominal pain or bloating following probiotic supplementation, as assessed by the Rome IV criteria. The absence of symptom improvement may reflect low baseline GI symptom severity (e.g., compared to marathon runners or IBD patients) or inaccuracies in dietary reporting during the intervention. However, a reduction in constipation frequency was noted across both groups, which may reflect not only a placebo effect but also the impact of increased self-monitoring and adherence to study-related behavioral recommendations, such as maintaining hydration, regular meal timing, or reduced training load prior to sample collection [47]. Although probiotics are considered a promising intervention for functional gastrointestinal disorders such as IBS—with some clinical trials and meta-analyses reporting symptom relief, particularly in Rome IV-diagnosed patients—these findings remain inconsistent due to considerable heterogeneity and strain-specific effects [48,49]. In light of previous preclinical findings, it is noteworthy that the combination of *L. helveticus* R0052 and *B. longum* R0175 has been shown to attenuate visceral hypersensitivity and normalize the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis activity more effectively than either strain alone, suggesting a synergistic effect in regulating stress-induced alterations in gut–brain signaling [50].

#### Limitations

This study has limitations that should be considered. The small sample size, largely due to difficulties in assembling homogeneous groups, may reduce generalizability. Although we attempted to recruit participants from various dance academies, performance ensembles, and theaters, practical constraints and a low number of male volunteers ultimately hindered us from achieving the intended sample size. However, the strict exclusion criteria improved group uniformity and minimized confounding. As the study sample consisted exclusively of female participants, the results cannot be extrapolated to male populations. Considering the potential sex-based differences in both probiotic responsiveness and endocannabinoid system function, future research should aim to include male participants to examine possible divergences in outcomes. Although recruitment efforts extended across several dance academies, performance ensembles, and theater

groups, practical limitations and a lack of male volunteers made it impossible to achieve a sex-balanced cohort. The lack of follow-up and financial constraints prevented testing different probiotic doses or prebiotic combinations, limiting insights into dose–response or synergistic effects. Differences in baseline concentrations of certain key metabolites, such as 2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, may confound the interpretation of intervention effects. Although statistical models accounted for time and group interactions, the presence of baseline imbalance reduces the strength of causal conclusions and should be addressed in future studies through stratified randomization or covariate adjustment. The absence of symptom improvement may be due to microbiota variability, low dosage, or short intervention. The lack of symptom improvement may have been influenced by the low baseline severity of gastrointestinal symptoms (for example, compared to marathon runners or individuals with inflammatory bowel disease) or by insufficiently accurate reporting of dietary intake and its fluctuations throughout the intervention period. Future research should explore personalized probiotic strategies and targeted metabolomics to better connect microbial changes with clinical outcomes.

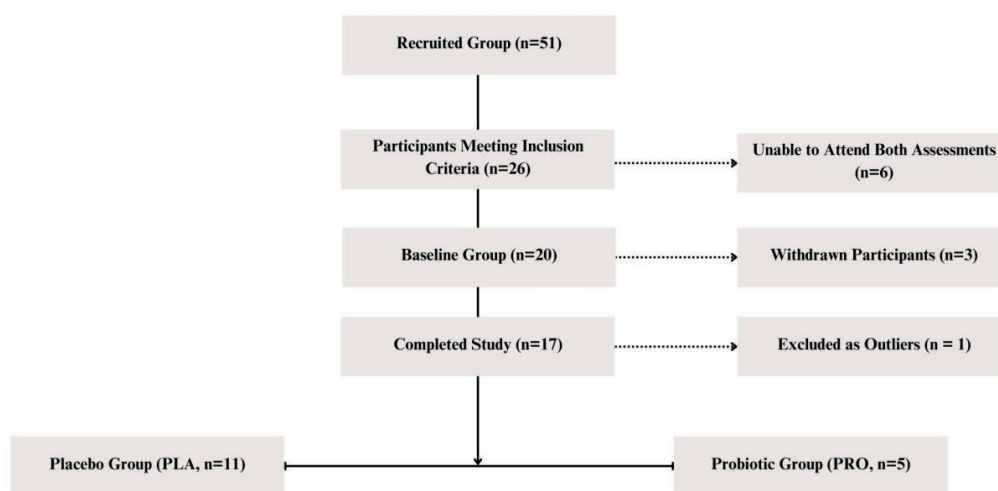
## 4. Materials and Methods

### 4.1. Study Group

The study involved female dancers aged 18–36, training over 8 h weekly. The exclusion criteria included recent injuries, probiotic/prebiotic use, hospitalization, travel to tropical regions, or use of antibiotics, cannabis, or anabolic steroids within three months. Recruitment took place between October 2022 and March 2023 at an academic institution specializing in physical education, with additional efforts made at local dance schools and theaters. The study included female dance students from the Academy of Physical Education and was conducted during the busiest period of the semester with the highest academic workload. Of the 51 volunteers, 26 met inclusion criteria and were randomized (block size 4; [www.randomizer.org](http://www.randomizer.org), accessed on 22 September 2022) by the probiotic manufacturer. The double-blind design ensured that neither the participants nor the investigators knew group assignments, with allocation known only to the manufacturer. Although the participants were carefully selected based on body composition and physical activity criteria, the intended group size could not be reached. Beyond the dropout reasons outlined below, recruitment was hindered by several factors, including the very low number of male volunteers (only two expressed interest), late wake-up times caused by evening rehearsals and performances that conflicted with morning sample collection, challenges in coordinating fecal sample delivery for parallel analyses, and difficulties in ensuring dietary consistency across the intervention period. Ultimately, university participants were the only group able to meet study demands, as their schedules—often spanning 8 AM to 8 PM—included academic courses, physical training, choreography, and teaching practice. Some also performed in theaters, adding weekend workload. These conditions contributed to significant physical and psychological strain during the study period. Six participants withdrew: three without explanation and three due to missed sample or supplement collection. An additional three were excluded due to incomplete data or protocol deviations. One participant was removed as a BMI outlier. The final analysis included 16 participants: 11 in the placebo group and 5 in the probiotic group.

The probiotic group received *Lactobacillus helveticus* R0052 (CNCM I-1722) and *Bifidobacterium longum* R0175 (CNCM I-3470) (Sanprobi® Stress; Sanprobi sp. z o.o. sp.k., Szczecin, Poland; lyophilisate by Lallemand Health Solutions, Mirabel, Quebec, Canada) at a daily dose of  $3 \times 10^9$  colony-forming units (CFU) / active fluorescent units (AFU) per capsule for 12 weeks. Placebo capsules, identical in appearance, contained maltodextrin and cornstarch. Both interventions were identically packaged and labeled only with participant

numbers and instructions. To assess the participants' adherence to the probiotic or placebo regimen, they were instructed to record their daily capsule intake and to bring back any unused capsules during the final visit. Capsule counts were used to verify compliance. All the participants completed the intervention as planned, with full dose consumption over the 12-week (84-day) period, indicating 100% adherence. All the participants gave written informed consent. Study procedures followed the Declaration of Helsinki and were approved by the Bioethics Committee (Poznan University of Medical Sciences) with approval number. 412/22. The trial was registered at ClinicalTrials.gov (NCT05567653—Effects of Probiotics on Gut Microbiota, Endocannabinoid and Immune Activation and Symptoms of Fatigue in Dancers) and reported in line with CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials; Centre for Statistics in Medicine (CSM), NDORMS, University of Oxford, Oxford, UK) 2010, with the participant flow shown in Figure 4. The participants were fully informed of the study's aims, procedures, risks, and right to withdraw. No adverse effects occurred, and no participant discontinued due to tolerability, confirming both products were safe and well-tolerated. The protocol allowed for early termination if significant dropout had occurred.



**Figure 4.** Study inclusion flow diagram. The diagram illustrates the recruitment process, inclusion and exclusion criteria, and final participant distribution into the placebo (PLA) and probiotic (PRO) groups.

All the procedures related to sample collection and data acquisition were conducted at Poznan University of Physical Education in accordance with the established research protocols and ethics guidelines, using facilities equipped with freezers suitable for proper sample storage. One week before blood sampling, the participants underwent anthropometric measurements and provided dietary data. During an information session, they were instructed to maintain habitual dietary habits, report any changes, and notify investigators of new exclusion criteria or adverse events. They were also asked to arrive for stool collection rested, after a light evening meal and 2–3 days without physical training. Stool samples (10–30 g) were self-collected using non-sterile kits, frozen immediately at  $-18^{\circ}\text{C}$  in the participants' home freezers, and then transferred to a  $-80^{\circ}\text{C}$  laboratory freezer for long-term storage. Samples were transported on dry ice to the analytical facility to maintain frozen conditions and ensure sample integrity.

#### 4.2. Methods

To assess the probiotic's impact on the gut metabolome, fecal samples were analyzed using ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) with mass spectrometry (MS): 500  $\mu$ L of a mixture of methanol, water, and acetonitrile in the proportions of 50:25:25 (*v/v/v*) with the addition of deuterated internal standards was added to 60 mg of feces. The samples were shaken at 2000 rpm at 4 °C for 30 min to dissolve the metabolites in the solution and precipitate the protein. In the next step, the samples were centrifuged for 4 min at a speed of 4000 rpm and at a temperature of 4 °C. After the samples were centrifuged, the supernatant was transferred to chromatography tubes through a 0.22  $\mu$ m syringe filter. The prepared samples were analyzed on the same day using LC–MS. QC samples were prepared by mixing test samples in equal proportions and prepared in the same way as the test samples. The analysis was carried out on an ExionLC liquid chromatograph equipped with a binary pump, an autosampler, and a column thermostat, coupled with a Triple TOF 6600+ mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA). The separation was carried out on a Phenomenex Luna<sup>®</sup> Omega 1.6  $\mu$ m polar C18 150  $\times$  2.1 mm (<https://www.phenomenex.com/products/luna-omega-hplc-column/luna-omega-polar-c18>, accessed on 9 November 2023) column for 45 min in gradient separation. The mobile phases were as follows: Phase A—water with 10 mM ammonium acetate, Phase B—acetonitrile with 0.1% formic acid. The injection volume was 2  $\mu$ L and the column temperature was 20 °C. The phase flow was 0.2 mL/min. Spectral analysis was performed in the positive ion mode with a capillary voltage of 5500 V, curtain gas (CUR)—25 psi, ion source gas 1 (GS1)—45 psi, ion source gas 2 (GS2)—60 psi, and the ion source temperature of 400 °C and in the negative ion mod with a capillary voltage of 4500 V, curtain gas (CUR)—25 psi, ion source gas 1 (GS1)—45 psi, ion source gas 2 (GS2)—60 psi, and the ion source temperature of 350 °C. The spectrometer collected spectral data in the SWATH mode in the range from 50 *m/z* to 850 *m/z*. The obtained spectral spectra were analyzed using SCIEX OS software (version 3.3.1, Framingham, MA, United States) and integrated SCIEX All-In-One HR-MS/MS, NIST, and own databases. Identification was based on the analysis of precursor ions and their fragments resulting from the breakdown of the metabolite in the collision cell. The mass error was 2 ppm for precursor and fragment ions. Metabolomic preprocessing included a reliability filter (RSD > 25%) and interquartile filtering to exclude the top 5% of outliers. Untargeted metabolomics enabled broad group comparisons and detection of early metabolic shifts without prior assumptions. Due to the exploratory nature of the study, no sample size calculation was conducted, as the aim was hypothesis generation rather than confirmation. Data were not normalized but log-transformed before analysis. Metabolomic analysis was performed using MetaboAnalystR v4.0.0 (Xia Lab, McGill University, Montréal, QC, Canada). Principal component analysis (PCA) was used to explore global variation, and ANOVA–simultaneous component analysis (ASCA) assessed intervention and time effects, with significance tested via 1000 permutations. Longitudinal analysis included both intervention (PLA vs. PRO) and time (Pre vs. Post), using mixed-effects models with Kenward–Roger approximation to evaluate metabolite changes and their interaction over time. Cross-sectional analysis was performed at baseline and at the endpoint to identify metabolites with notable fold changes between the probiotic and placebo groups. *T*-tests were then applied to determine which of these differences were statistically significant, with *p*-values reported alongside false discovery rate (FDR) corrections to account for multiple comparisons.

Nutritional status was assessed using 3-day dietary records and the 14-Item Mediterranean Diet Assessment Tool (MDAT), which evaluates adherence to a diet high in fruits, vegetables, legumes, whole grains, fish, and olive oil and low in refined grains, sweetened beverages, and trans fats. The participants completed real-time dietary records

independently, later reviewed with researchers, while the MDAT was conducted via interview. Gastrointestinal function was assessed using selected Rome IV criteria questions on IBS-related symptoms (abdominal pain, postprandial fullness, diarrhea, constipation). Anthropometric measurements, including body composition, were performed using bio-electrical impedance analysis (SECA GmbH & Co., Hamburg, Germany). Physical activity was reported as weekly exercise hours, and blood morphology was analyzed to support the evaluation of nutritional status. Dietary and anthropometric assessments ensured baseline group comparability. Baseline group comparisons were conducted using the *t*-test or the Mann–Whitney U test when normality (assessed via the Shapiro–Wilk test) was not met. For the Rome IV questionnaire outcomes, two-way repeated measures ANOVA evaluated main effects of time, group, and their interaction. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ , with  $\eta^2$  coefficients reported for significant results to indicate effect size. Power analysis ( $\alpha = 0.05$ , power = 0.80) indicated that 113 participants per group would be required to detect significant differences in the Rome IV variables (G\*Power). Bonferroni or FDR correction would have been applied post hoc to control for multiple comparisons. Given the ordinal nature of the questionnaire data, nonparametric tests or mixed-effects models were considered for assessing within- and between-group changes. Analyses were performed using STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

No trial outcomes were modified after study initiation. We confirm that there were no important changes to the methods after the commencement of the trial. The study was discontinued due to difficulties in recruiting a larger number of eligible participants.

## 5. Conclusions

Our findings indicate that *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R175 may modulate the gut metabolome, though their clinical relevance remains unclear. The small sample size and focus on dancers limit broader applicability. Baseline differences in (2*RS*)-2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid between the groups complicate interpretation of post-intervention effects, and the high false discovery rate suggests a possible type I error. As such, these results are exploratory and require confirmation in larger studies. Future trials should examine 2-HPP in blood and urine and assess different doses and synbiotic combinations, especially given the absence of adverse effects. According to the Strength of Recommendation Taxonomy (SORT), this study qualifies as Level B evidence with a strength of recommendation of C due to its limited sample size and absence of significant clinical effects.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms26125823/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.W., K.S.-Ż., D.S., M.K. and J.K.; data curation, J.W.; formal analysis, J.W. and J.K.; funding acquisition, J.W.; investigation, J.W., K.S.-Ż. and J.K.; methodology, K.S.-Ż., I.L., D.S., M.K. and J.K.; project administration, J.W., K.S.-Ż. and I.L.; resources, J.W., K.S.-Ż. and J.K.; software, J.W., I.L. and D.S.; supervision, K.S.-Ż., I.L., D.S., M.K. and J.K.; validation, D.S., M.K. and J.K.; visualization, J.W.; writing—original draft preparation, J.W. and J.K.; writing—review and editing, J.W. and J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was funded through educational resources allocated for doctoral studies at the Doctoral School of J. Wiacek (Poznan University of Physical Education—Development of Young Researchers).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board of the Bioethics Committee of Poznan University of Medical Sciences (approval No. 412/22, 19 May 2022).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** We would like to express our sincere gratitude to Krzysztof Kusy and Tomasz Podgórski for their invaluable assistance in organizing this study. Their support and expertise were essential in ensuring the smooth execution of the research process.

**Conflicts of Interest:** Igor Łoniewski is a probiotic company shareholder, Mariusz Kaczmarczyk and Daniel Styburski are probiotic company employees, and Karolina Skonieczna-Żydecka receives remuneration from a probiotic company. However, this played no role in data presentation and publication. The results of this study are presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

AFU	Active fluorescent unit
ANOVA	Analysis of variance
ASCA	ANOVA–simultaneous component analysis
BMI	Body mass index
CFU	Colony-forming unit
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
ETA <sup>2</sup> (η <sup>2</sup> )	Eta-squared (effect size measure)
FDR	False discovery rate
GABA	Gamma-aminobutyric acid
HPLC	High-performance liquid chromatography
IBS	Irritable bowel syndrome
IQR	Interquartile range (in statistical filtering)
MDAT	Mediterranean Diet Assessment Tool
MEBA	Multivariate empirical Bayes analysis of variance
MS	Mass spectrometry
NIST	National Institute of Standards and Technology
PCA	Principal component analysis
PLA	Placebo group
PRO	Probiotic group
RCT	Randomized controlled trial
Rome IV	Rome IV Diagnostic Criteria
SCFA	Short-chain fatty acid
SD	Standard deviation
SHIME	Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem
SORT	Strength of Recommendation Taxonomy
UHPLC	Ultra-high-performance liquid chromatography

## References

1. Koutedakis, Y.; Jamurtas, A. The dancer as a performing athlete: Physiological considerations. *Sports Med.* **2004**, *34*, 651–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nieman, D.C. Exercise, infection, and immunity. *Int. J. Sports Med.* **1994**, *15* (Suppl. S3), S131–S141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. O'Brien, M.T.; O'Sullivan, O.; Claesson, M.J.; Cotter, P.D. The athlete gut microbiome and its relevance to health and performance: A review. *Sports Med.* **2022**, *52* (Suppl. S1), 119–128. [[CrossRef](#)]
4. Ringham, R.; Klump, K.; Kaye, W.; Stone, D.; Libman, S.; Stowe, S.; Marcus, M. Eating disorder symptomatology among ballet dancers. *Int. J. Eat. Disord.* **2006**, *39*, 503–508. [[CrossRef](#)]

5. Teo, W.; Newton, M.J.; McGuigan, M.R. Circadian rhythms in exercise performance: Implications for hormonal and muscular adaptation. *J. Sports Sci. Med.* **2011**, *10*, 600–606.
6. Clauss, M.; Gérard, P.; Mosca, A.; Leclerc, M. Interplay between exercise and gut microbiome in the context of human health and performance. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 637010. [[CrossRef](#)]
7. Fontana, F.; Longhi, G.; Tarracchini, C.; Mancabelli, L.; Lugli, G.A.; Alessandri, G.; Turrone, F.; Milani, C.; Ventura, M. The human gut microbiome of athletes: Metagenomic and metabolic insights. *Microbiome* **2023**, *11*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Hargreaves, M.; Spriet, L.L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nat. Metab.* **2020**, *2*, 817–828. [[CrossRef](#)]
9. Marttinen, M.; Ala-Jaakkola, R.; Laitila, A.; Lehtinen, M.J. Gut microbiota, probiotics and physical performance in athletes and physically active individuals. *Nutrients* **2020**, *12*, 2936. [[CrossRef](#)]
10. Varghese, S.; Rao, S.; Khattak, A.; Zamir, F.; Chaari, A. Physical exercise and the gut microbiome: A bidirectional relationship influencing health and performance. *Nutrients* **2024**, *16*, 3663. [[CrossRef](#)]
11. Martin-Gallausiaux, C.; Marinelli, L.; Blottière, H.M.; Larraufie, P.; Lapaque, N. SCFA: Mechanisms and functional importance in the gut. *Proc. Nutr. Soc.* **2021**, *80*, 37–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Dziewiecka, H.; Buttar, H.S.; Kasperska, A.; Ostapiuk-Karolczuk, J.; Domagalska, M.; Cichoń, J.; Skarpańska-Stejnborn, A. Physical activity induced alterations of gut microbiota in humans: A systematic review. *BMC Sports Sci. Med. Rehabil.* **2022**, *14*, 122. [[CrossRef](#)]
13. Clark, A.; Mach, N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: A systematic review for athletes. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2016**, *13*, 43. [[CrossRef](#)]
14. Hoppe, M.; Önnings, G.; Berggren, A.; Hulthén, L. Probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v increases iron absorption from an iron-supplemented fruit drink: A double-isotope cross-over single-blind study in women of reproductive age. *Br. J. Nutr.* **2015**, *114*, 1195–1202, Erratum in *Br. J. Nutr.* **2015**, *114*, 1948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
15. Metges, C.C. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1857S–1864S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Shing, C.M.; Peake, J.M.; Lim, C.L.; Briskey, D.; Walsh, N.P.; Fortes, M.B.; Ahuja, K.D.; Vitetta, L. Effects of probiotics supplementation on gastrointestinal permeability, inflammation and exercise performance in the heat. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2014**, *114*, 93–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Gil-Hernández, E.; Ruiz-González, C.; Rodríguez-Arrastia, M.; Roperro-Padilla, C.; Rueda-Ruzafa, L.; Sánchez-Labraca, N.; Roman, P. Effect of gut microbiota modulation on sleep: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Nutr. Rev.* **2023**, *81*, 1556–1570. [[CrossRef](#)]
18. Misera, A.; Liśkiewicz, P.; Łoniewski, I.; Skonieczna-Żydecka, K.; Samochoń, J. Effect of psychobiotics on psychometric tests and inflammatory markers in major depressive disorder: Meta-analysis of randomized controlled trials with meta-regression. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Rode, J.; Carlman, H.M.T.E.; König, J.; Reipsilber, D.; Hutchinson, A.N.; Thunberg, P.; Andersson, P.; Persson, J.; Kiselev, A.; Stern, L.L.; et al. Probiotic mixture containing *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum* and *Lactiplantibacillus plantarum* affects brain responses toward an emotional task in healthy subjects: A randomized clinical trial. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 827182. [[CrossRef](#)]
20. Mohr, A.E.; Jäger, R.; Carpenter, K.C.; Kerksick, C.M.; Purpura, M.; Townsend, J.R.; West, N.P.; Black, K.; Gleeson, M.; Pyne, D.B.; et al. The athletic gut microbiota. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2020**, *17*, 24. [[CrossRef](#)]
21. Tang, H.; Huang, W.; Yao, Y.F. The metabolites of lactic acid bacteria: Classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microb. Cell.* **2023**, *10*, 49–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Arseneault-Bréard, J.; Rondeau, I.; Gilbert, K.; Girard, S.-A.; Tompkins, T.A.; Godbout, R.; Rousseau, G. Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 1793–1799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Partrick, K.A.; Rosenhauer, A.M.; Auger, J.; Arnold, A.R.; Ronczkowski, N.M.; Jackson, L.M.; Lord, M.N.; Abdulla, S.M.; Chassaing, B.; Huhman, K.L. Ingestion of probiotic (*Lactobacillus helveticus* and *Bifidobacterium longum*) alters intestinal microbial structure and behavioral expression following social defeat stress. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Firtel, M.; Henderson, G.; Sokolov, I. Nanosurgery: Observation of peptidoglycan strands in *Lactobacillus helveticus* cell walls. *Ultramicroscopy* **2004**, *101*, 105–109. [[CrossRef](#)]
25. Li, M.; Ding, J.; Stanton, C.; Ross, R.P.; Zhao, J.; Yang, B.; Chen, W. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* FJSYZ1M3 ameliorates DSS-induced colitis by maintaining the intestinal barrier, regulating inflammatory cytokines, and modifying gut microbiota. *Food Funct.* **2023**, *14*, 354–368. [[CrossRef](#)]
26. Aykut, M.N.; Erdoğan, E.N.; Çelik, M.N.; Gürbüz, M. An updated view of the effect of probiotic supplement on sports performance: A detailed review. *Curr. Nutr. Rep.* **2024**, *13*, 251–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]

27. De Oliveira, F.L.; Salgaço, M.K.; de Oliveira, M.T.; Mesa, V.; Sartoratto, A.; Peregrino, A.M.; Ramos, W.S.; Sivieri, K. Exploring the potential of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 as promising psychobiotics using SHIME. *Nutrients* **2023**, *15*, 1521. [\[CrossRef\]](#)
28. Neveu, V.; Pérez-Jiménez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D.; et al. Phenol-Explorer: An online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* **2010**, *2010*, bap024. [\[CrossRef\]](#)
29. Hu, S.; Ding, Q.; Zhang, W.; Kang, M.; Ma, J.; Zhao, L. Gut microbial beta-glucuronidase: A vital regulator in female estrogen metabolism. *Gut Microbes*. **2023**, *15*, 2236749. [\[CrossRef\]](#)
30. Murota, K.; Nakamura, Y.; Uehara, M. Flavonoid metabolism: The interaction of metabolites and gut microbiota. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2018**, *82*, 600–610. [\[CrossRef\]](#)
31. Hou, S. Genistein: Therapeutic and preventive effects, mechanisms, and clinical application in digestive tract tumor. *Evid. Based Complement Altern. Med.* **2022**, *2022*, 5957378. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Niwa, T.; Yokoyama, S.; Osawa, T. Effect of the genistein metabolite on leptin secretion in murine adipocytes in vitro. *Food Chem.* **2013**, *138*, 122–125. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Guo, J.; Wang, P.; Cui, Y.; Hu, X.; Chen, F.; Ma, C. Protective effects of hydroxyphenyl propionic acids on lipid metabolism and gut microbiota in mice fed a high-fat diet. *Nutrients* **2023**, *15*, 1043. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Katanić Stanković, J.S.; Mihailović, N.; Mihailović, V. Genistein: Advances on resources, biosynthesis pathway, bioavailability, bioactivity, and pharmacology. In *Handbook of Dietary Flavonoids*; Xiao, J., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2023. [\[CrossRef\]](#)
35. Blaut, M.; Schoefer, L.; Braune, A. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int. J. Vitam Nutr. Res.* **2003**, *73*, 79–87. [\[CrossRef\]](#)
36. Landete, J.M. Flavone, flavanone and flavonol metabolism from soybean and flaxseed extracts by the intestinal microbiota of adults and infants. *J. Sci. Food Agric.* **2022**, *102*, 2575–2583. [\[CrossRef\]](#)
37. Chacar, S.; Tarighi, M.; Fares, N.; Faivre, J.-F.; Louka, N.; Maroun, R.G. Identification of phenolic compounds-rich grape pomace extracts urine metabolites and correlation with gut microbiota modulation. *Antioxidants* **2018**, *7*, 75. [\[CrossRef\]](#)
38. Cao, G.; Zuo, J.; Wu, B.; Wu, Y. Polyphenol supplementation boosts aerobic endurance in athletes: Systematic review. *Front. Physiol.* **2024**, *15*, 1369174. [\[CrossRef\]](#)
39. Ticinesi, A.; Guerra, A.; Nouvenne, A.; Meschi, T.; Maggi, S. Disentangling the complexity of nutrition, frailty and gut microbial pathways during aging: A focus on hippuric Acid. *Nutrients* **2023**, *15*, 1138. [\[CrossRef\]](#)
40. Pallister, T.; Jackson, M.A.; Martin, T.C.; Zierer, J.; Jennings, A.; Mohny, R.P.; MacGregor, A.; Steves, C.J.; Cassidy, A.; Spector, T.D.; et al. Hippurate as a metabolomic marker of gut microbiome diversity: Modulation by diet and relationship to metabolic syndrome. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13670. [\[CrossRef\]](#)
41. Liu, Y.; Hu, M. Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 370–377. [\[CrossRef\]](#)
42. Ahmadi, S.; Wang, S.; Nagpal, R.; Wang, B.; Jain, S.; Razazan, A.; Mishra, S.P.; Zhu, X.; Wang, Z.; Kavanagh, K.; et al. A human-origin probiotic cocktail ameliorates aging-related leaky gut and inflammation via modulating the microbiota/taurine/tight junction axis. *JCI Insight.* **2020**, *5*, e132055. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Sivamaruthi, B.S.; Fern, L.A.; Rashidah Pg Hj Ismail, D.S.N.; Chaiyasut, C. The influence of probiotics on bile acids in diseases and aging. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *128*, 110310. [\[CrossRef\]](#)
44. Yang, M.; Gu, Y.; Li, L.; Liu, T.; Song, X.; Sun, Y.; Cao, X.; Wang, B.; Jiang, K.; Cao, H. Bile acid–gut microbiota axis in inflammatory bowel disease: From bench to bedside. *Nutrients* **2021**, *13*, 3143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. de Oliveira Filho, J.G.; Carvalho, A.S.E.S.; Alves, J.D.S.; Egea, M.B. Next-generation probiotics as a therapeutic strategy for the treatment of phenylketonuria: A review. *Nutr. Rev.* **2022**, *80*, 2100–2112. [\[CrossRef\]](#)
46. Strasser, B.; Geiger, D.; Schauer, M.; Gostner, J.M.; Gatterer, H.; Burtscher, M.; Fuchs, D. Probiotic supplements beneficially affect tryptophan-kynurenine metabolism and reduce the incidence of upper respiratory tract infections in trained athletes: A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Nutrients* **2016**, *8*, 752. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Lindheimer, J.B.; Beedie, C.; Raglin, J.S. Placebo effects in sports performance and exercise outcomes. In *Placebo Effects Through the Lens of Translational Research*; Colloca, L., Noel, J., Franklin, P.D., Seneviratne, C., Eds.; Oxford Academic: Oxford, UK, 2023. [\[CrossRef\]](#)
48. Konstantis, G.; Efstathiou, S.; Pourzitaki, C.; Kitsikidou, E.; Germanidis, G.; Chourdakis, M. Efficacy and safety of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials using ROME IV criteria. *Clin. Nutr.* **2023**, *42*, 800–809. [\[CrossRef\]](#)

49. Li, B.; Liang, L.; Deng, H.; Guo, J.; Shu, H.; Zhang, L. Efficacy and safety of probiotics in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 332. [[CrossRef](#)]
50. Ait-Belgnaoui, A.; Payard, I.; Rolland, C.; Harkat, C.; Braniste, V.; Théodorou, V.; Tompkins, T.A. *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus helveticus* synergistically suppress stress-related visceral hypersensitivity through hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **2018**, *24*, 138–146. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.