

Multiple Sclerosis Terapilerinin insan barsak mikrobiyotasının dinamiği üzerindeki rolü

Vitalie Vacaras ^{a,b}, Dafin F. Muresanu ^{a,b}, Anca-Dana Buzoianu ^c, Cristina Nistor ^{a,b,*}, Stefan Cristian Vesa ^c,
Andreea-Cristina Paraschiv ^b, Daniela Botos-Vacaras ^d, Cristiana Vacaras ^e, George Vithoulkas ^f

^a Neurology Department, Cluj Emergency County Hospital, 400012 Cluj-Napoca, Romania

^b Department of Neurosciences, Faculty of Medicine, Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy, 400012 Cluj-Napoca, Romania

^c Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy, 400349 Cluj-Napoca, Romania

^d Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy, 400012 Cluj-Napoca, Romania

^e Faculty of Medicine, Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy, 400012 Cluj-Napoca, Romania

^f University of the Aegean, Mytilene, Greece

ÖZ

Barsak mikrobiyotasının, gastroentestinal sistemde bulunan mikroorganizmaların tümünün, beyindeki göz ve omurilik merkezlerine giden sinir liflerinin üzerindeki koruyucu maddeye (myelin sheath) zarar veren nörolojik bir hastalık olan multiple sclerosis (MS) hastalığı ile bir ilgisi olabilir. Çalışmamıza 50 MS hastası ve 21 sağlıklı hasta (HC) katılmıştır. 20 hasta Hastalık İyileştirici Tedavi (DMT) kapsamında interferon beta1a veya teriflunomide almışlardır, 19 hastaya DMT ile birlikte homeopati uygulanmış, 11 hasta sadece homeopati tedavisini kabul etmiştir. Her hastadan 2 şer tane olmak üzere toplam 142 barsak örneği alınmıştır : ilk örnek çalışma başlamadan önce, ikinci örnek çalışmadan sonra alınmıştır. MS hastalarının mikrobiomunu HC (sağlıklı katılımcılar) bireylerinininkiler ile karşılaştırdık, çalışma sırasındaki gelişimlerini ve interferon, beta1a, teriflunomide ve homeopatinin etkilerini analiz ettik. Alfa çeşitliliğinde bir değişiklik görülmedi, sadece 2 beta çeşitliliğinin sonuçları homeopati ile ilişkilendirildi. HC ile karşılaştırıldığında tedavi görmeyen MS hastalarında *Actinobacteria*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prauznitzii* sayılarında bir azalma *Prevotella stercorea* sayısında çoğalma görüldü, tedavi gören hastalarda ise *Ruminococcus* ve *Clostridium* sayılarında azalma görüldü. Başlangıç örnekleri ile karşılaştırıldığında tedavi gören MS hastalarında *Lachnospiraceae* ve *Ruminococcus* sayılarında azalma ve *Enterococcus faecalis* sayılarında azalma görüldü. Homeopatik tedaviden sonra *Eubacterium oxidoreducens* sayılarında azalma görüldü. Çalışma MS hastalarında barsak florasında dengesizlik görülebileceğini ortaya koydu. Interferon beta1a, teriflunomide ya da homeopati birçok biyolojik değişikliğe sebep oldu. DMT ve homeopati gut mikrobiyotasını etkileyebilir.

Anahtar kelimeler : Multiple sclerosis, Gut microbiota, Dysbiosis, DMT, Microbiome

1.Giriş

İnsanın barsak mikrobiyotası gastrointestinal yolda birlikte yaşayan geniş bir çeşitlilikteki mikroorganizmalardan oluşur, bunlar taxonomic olarak çeşitlerine göre sınıflandırılmıştır, genus ve phyla aileleri, her ikisi de yararlı patojenik mikrop çeşitleri içerir (Rinninella et al., 2019; Camara-Lemarroy et al., 2018). Mikrobiyota çocukluğun ilk yıllarında oluşur, pekçok farklı etkene bağlıdır, doğum şekli, sütlü beslenme, anne sütünden kesilme ve ilaçlar. İlk üç yıl sonunda kısmen dengeye oturmuş olur, sürekli dış etkenlerden etkilenir : beslenme türü, hareketlilik, vücut kitle endeksi, çevre ve ilaç kullanımı (Rinninella et al., 2019). Bir mikrobiyom her organizmaların tüm gen, protein ve metabolitlerinden oluşur (Maglione et al., 2021).

Multiple Sclerosis (MS) bir otoimmün hastalıktır, merkezi sinir sistemini tutar, genetik yatkınlıkların çevresel etkenler ile buluşmasıyla gelişir. Beyin içindeki damarların duvarlarını koruyan katman bütünlüğünün bozulması, enflamasyon, oligodendrosit kaybı, demyelinasyon, gliosis ve axonal dejenerasyon gibi semptomlar kapsar. Gelişiminde 3 önemli safha vardır, preklinik safha burada genetik yatkınlık düzeni dış etkenler ile buluştuğunda hastalığın ortaya çıkmasına sebep olabilirler, enflamatuar safha burada nörolojik işlevsel bozukluklar görülemeye başlar optik neuritis, pyramidal, serebellar ya da beyin sapında bozulma, uyuşma, idrar kesesinde işlev kaybı, ve nörodejeneratif son safha giderek artan mobil engellilik, yüyüme zorluğu. Bu hastalığın değişik klinik formları vardır : klinik olarak izole sendrom (CIS), tekrarlayan - duraklayan MS (RRMS), ikincil kademeli MS (SPMS) ve birincil kademeli MS (PPMS). MS ile ilişkili, patolojik süreçte rolü olabilecek değiştirilebilir risk faktörleri Mikrobiyom dahil dikkatlice incelendi (Baecher-Allan et al., 2018). Son çalışmalar MS hastalarının sağlıklı kontrol (HC) grubundan farklı belirli bir mikrobiyom yapısına sahip olduklarını göstermiştir (Mirza et al., 2020).

Her insanda mikrobiyom kendine özgü bir kompozisyonda olduğu ve içinde sonsuz sayıda çeşitli mikroorganizma barındırdığı için sağlıklı bir mikrobiyomun tarifini vermek oldukça zordur (Rinninella et al., 2019). Sağlıklı bir mikrobiyota önemli işlevler ortaya koyar, barsak geçirgenliği, dışkı hareketliliği, vitaminlerin sentezi, emilim, ve hatta doğuştan gelen bağışıklık sisteminin gelişimi (Chu et al., 2018). İmmünomodülasyon, bağışıklık sistemini düzenleyici rolü sebebiyle son çalışmalar bazı bağışıklık kaynaklı nörolojik patolojilerin onunla muhtemel bağlantısını araştırmaktadırlar (Mirza et al., 2020).

Bicribyota-beyin aksı kavramı sinir sistemi ile gastrointestinal sistem arasında bulunan çeşitli mekanizmaların çalışmalarını kapsamaktadır (Strandwitz, 2018). Mikrobiyota merkezi sinir sistemini (CNS) çeşitli yollarla etkileyebilir. İlk olarak beyin ağlarında çalışır, birçok farklı nörotransmitterleri düzenler (gamma aminobutirik asit, serotonin, dopamin, histamin gibi) sempatik ve parasempatik sinir sistemi ve özellikle vagus siniri ile bağlantı içindedir. İkinci olarak endokrin sistemi ile ilgilidir, stres cevabını düzenler. Hypothalamic-pituitary-adrenal aks tarafından salınan kortikoidler mikrobiyota kompozisyonunu değiştirir ve barsak geçirgenliğini artırır. Mikropların sinir sisteminde değişikliğe sebep olduğu bir başka mekanizma da immünoregülasyon bağışıklık sisteminin cevap mekanizmasıdır. Bu işlevler arasında antijen sunum bozukluğu, sitokin ve lenfosit üretimi, barsak bağlantılı lenf hücrelerindeki (GALT) T hücre tiplerinin ayrıştırılması da vardır (Chu et al., 2018). Barsak mikroorganizmaları metabolitler (lipopolysaccharide, peptidoglycan) salar ve kısa zincirli yağlı asitler (SCFAs) mikroglial hücre aktivasyonu ile beyin damar duvarları geçirgenliğini metabolize eder (Strandwitz, 2018).

Homeopati dahil alternatif ve tamamlayıcı tıp, genel semptomlar, ağrı, tutukluk, hassasiyet sorunları, yürüme bozukluğu, yorgunluk, hafıza kaybı gibi semptomları hafifletmek bağlamında geleneksel tıp tedavi şekilleri ile bağlantılıdır. MS hastalarının %30 u tamamlayıcı ya da alternatif tıptan yardım almış ya da almaktadır (Kim et al., 2018). MS hastalarının %70-80 i genel durumlarında bu tedavilerden fayda görmüşlerdir (Olsen, 2009). Homeopati uygulaması “benzer

benzeri iyileştirir” prensibine dayalı olarak sağlıklı insanlarda hastalık ile aynı patolojik semptomları üreten ilaçlar ile çalışır (Fisher and Ernst, 2015). Homeopatik remediler yüksek ölçekte sulandırılmış doğal maddelerdir (Manzalini and Galeazzi, 2019) ve ne kadar çok sulandırılırlarsa o kadar güçlü olurlar (Chikramane et al., 2010). İlaç verirken gücünün ne olması gerektiği hastanın sağlık seviyesi tarafından belirlenir : düşük sağlık seviyelerinde 30C potensindeki ilaç 3 ay boyunca kullanılabilirken 200c potensinde bir ilaç birkaç günlük kullanım ile sınırlıdır. Reçeteler vakaya özel olarak yazılır, özel medikal işaretler dışında başka bakış açılarına dayanan gözlemler, bazen psikolojik etkenler ve hastanın gündelik alışkanlıkları özellikler göz önüne alınır (Whitmarsh, 2003). MS hastalığına ait bazı semptomlar bazı remediler ile daha iyi olmaktadır : idrar yolları için Causticum, göz siniri için Phosphorus, kasılmalar için Cuprum ve Nux Vomica, uyuşmalar için Secale iyi geldiği gözlemlenmiştir (Whitmarsh, 2003).

Bu yazıda da ilerki sayfalarda sunulduğu gibi pekçok çalışmada da MS hastalarının sağlıklı HC kişilerinkilerle karşılaştırıldığında özel bir mikrobiyotaya sahip olduklarının altı çizilmiştir. MS tedavilerinin mikrobiyomu iyileştirebildiği gözlemlenmiştir fakat bu konuda homeopatinin ne yapabileceği araştırılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı MS hastalarının barsak mikrobiyotasında bağışıklık düzenleyici ilaçlar ile tedavi, tamamlayıcı homeopati tedavisi ve salt homeopati tedavisi yöntemleri ile mikrobiyom düzeninde görülebilecek değişiklikleri incelemek ve MS hastaları ile HC sağlıklı kişilerin mikrobiyomundaki çeşitliliği karşılaştırmaktır.

2. Materyeller ve metodlar

2.1 Katılımcılar

Çalışma geleceğe yönelik, uzunlamasına, analitik, gözlemsel ve vaka kontrol tipinde idi. Cluj-Napoca Acil Hastanesi Nöroloji Bölümü’nde 2019 Ocak ile Mayıs 2020 tarihleri arasında MS teşhisi konulmuş 50 hasta çalışmaya dahil oldu. Ek olarak 21 HC sağlıklı kişi dahil edildi. Etik izin alındı (2394/28.01.2020, Emergency Hospital Cluj-Napoca) ve her katılımcı bilgilendirme kağıdını imzaladı.

MS grupta duraklayan ve tekrarlayan MS (RRMS) ya da klinik olarak izole sendromlu (CIS) hastalar McDonlad teşhis kriterine göre (Thompson et al., 2018), EDSS skoru 5 puan olan ve son 1 yıldır hastalık iyileştirici tedavi (DMT) görmemiş hastalar kabul edildi. İlerlemiş MS hastaları, net olmayan teşhisler, aktif gastrointestinal patolojisi bulunanlar, hamile kadınlar, uzun süreli probiyotik tedavisi görenler, antiviral ilaç, antibiyotik, steroid olmayan anti enflamatuar ya da proton pompalayıcı inhibitör kullanan hastalar hariç bırakıldı. Tüm hastalar arasında 7 kişide geçmişte hafif ve geçici gastrik patolojisi olmuş fakat şimdi aktif bir şikayeti yoktu, 4 kişi batin ameliyatı geçirmişti, 4 kişi de çoğunluğu tiroid olan ve tedavi altında bulunan endokrin patolojileri vardı. Diğer patolojiler (yüksek tansiyon, diyabet) izole vakalarda vardı ve çalışma başında klinik olarak dengede idiler. HC grubu MS hastalığı olmayan sağlıklı kişilerden oluşmuştu, yaş ve cinsiyet olarak MS hastaları ile uyumlu idi, herhangi bir patoloji teşhisi ya da kronik bir tedavisi yoktu. Tüm katılımcılar çalışma boyunca beslenme düzenlerinde ve yaşam tarzlarında büyük bir değişiklik olmadığını onayladılar.

Çalışmanın başında her katılımcı bir barsak örneği verdi. İlk örnekten sonra farklı etkenlere, hastalıklarının ciddiyetine, hastaların onayına, diğer rahatsızlıklarına, ilaç güvenilirliği ve ulaşımına dayalı olarak bir tedavi başlatıldı (Chikramane et al., 2010). Bazı hastalar geleneksel tedavileri şimdilik reddetti, onun yerine homeopati tedavisini tercih etti. İkinci örnek çalışma başladıktan 2 ay sonra alındı.

Homeopatik tedavinin dağıtımında her hasta kendi MS semptomlarına uyan remediler aldılar : 20CH veya 200CH potensinde Phosphorus, Lycopodium, Natrium muriaticum, Lac

Caninum, Nux Vomica, Lachezis, Nitric acid, *Rhus Toxicodendron*, Tarentula Hispanica, Pulsatilla, Calcarea Carbonica, Sulphur, Ignatia, Aconitum or Causticum. Reçeteler Homeopati eğitimi olan bir nörologist tarafından yazıldı, 200ch alanlar 3 gün arka arkaya günde 7 granülü dil altında eriteker alacaklardı, 30ch alanlar ise 1 ila 3 ay.

MS hastalarımız [Table 1](#). De görüldüğü gibi değişik gruplara ayrılmıştır. G-DMT hastalık iyileştirici bir tedavi aldı : intramüsküler iğne olarak interferon beta1a 30 µg / 0.5 ml haftada bir (alt grup G-IFN) veya teriflunomide 14 mg günde (alt grup G-TER). Group G-DMT + HOM (DMT ile homeopati birlikte tedavi alanlar) : G-IFN + HOM interferon beta1a ve homeopatik remedi, G-TER + HOM teriflunomide ve homeopatik remedi aldılar. Group G-HOM salt homeopatik tedavi aldılar. Kontrol grubu, G-HC sağlıklı kişilerden oluşuyordu, herhangi bir tedavi almadılar.

2.2. Örnek toplama

Her katılımcı laboratuvar yönlendirmelerine uygun olarak gaita örneği verdiler : günün her hangi bir saatinde, özel bir gaita kutusu kullanarak. Alınan örnekler -20 C derecede saklandı ve DNA ayrıştırılması için laboratuvara gönderildi. Her katılımcı 2 kere örnek verdi : tedaviden evvel (sample 1, S1) ve tedavi başladıktan 2 ay sonra (sample 2, S2).

Table 1
Group naming convention.

Group	Number of subjects	Subgroup	Number of subjects
G-DMT (DMT)	20	G-IFN (interferon beta1a)	10
		G-TER (teriflunomide)	10
G2-DMT + HOM (DMT+ homeopathy)	19	G-IFN + HOM (interferon beta1a + homeopathy)	9
		G-TER + HOM (teriflunomide+ homeopathy)	10
G-HOM (homeopathy)	11		
G-HC (HC)	21		
G-MS (all MS patients)	50		

[Table 1](#) summarizes the acronyms we use for groups identification. Abbreviations: DMT = disease modifying treatment, HC = healthy controls.

enrollment (sample 2, S2).

Table 2
Multiple sclerosis (MS) specific characteristics of our cohort.

Characteristics	MS patients (n = 50)
MS type, n (%)	
RRMS	44 (88%)
CIS	6 (12%)
EDSS score, mean (range)	1.8 (0-5)
Confirmed disease duration, mean (SD) (y)	3.4 (6.2)
Number of relapses, mean (SD)	2.5 (2.13)
MMSE score, mean	29.4
Treatment, n (%)	
Teriflunomide	10 (14.28%)
Interferon beta1a	10 (14.28%)
Teriflunomide+ homeopathy	10 (14.28%)
Interferon beta+ homeopathy	9 (12.8%)
Homeopathy	11 (15.7%)

Abbreviations: MS = multiple sclerosis, n = number of patients, SD = standard deviation, y = years, RRMS = relapsing-remitting MS, CIS = clinically isolated syndrome, EDSS = Expanded Disability Status Scale, MMSE = Mini-Mental State Exam.

2.3 The 16rRNA sekans ve istatistik analiz

her yerde mevcut olan 16S alt ünite ribosomal RNA (rRNA) genin metagenomic analizi tüm Illumina MiSeq platformunda spesifik hiperdeğişken bölgeler (V1-V3, V3-V4, ITS1&ITS2) kullandı . Sonuçlar OTUs (operational taxonomic units) lerdir, laboratuvar datalarına en az % 97 DNA benzerliği olan mikroorganizmalar, sayıları ve göreceli çokluklarına göre spesifik taxa içinde sınıflandırıldılar. Barsak mikrobiyotası, zenginliği (çeşitli türlerin sayısı) ve eşit dağılımı (çeşitlerin benzersizliği) açısından değişkenliğin matematiksel bir ölçüsüdür. Örneklerdeki alfa değişkenliği tespitinde Chao indeksi tür zenginliği için bir kıstastır. Shannon ve Simpson hem zenginlik hem de eşit dağılım için incelenen parametrelerdir ([Kim et al., 2017](#)).

Frekans matrisi kullanılarak her çiftin kombinasyonu Wilcoxon Rank-Sum Test ile analiz edilmiştir. Beta çeşitliliğinde, örnekler arasındaki çeşitlilik farkı için Bray-Curtis and the Jaccard indeksleri kullandık, grafik mesafe aradaki farkı işaret etti. Öncelikli koordinat analizi (PcoA) göreceli çokluk matrisi ile belirlendi. Lineer discriminant analiz efekt boyutu (LefSe) figürleri göreceli çokluk matrislerini MS ile HC arasındaki differansiyel organizma çokluğunu ölçmek için kullanır, alfa değeri 0.05 ve logaritmik lineer discriminant analiz (LDA) skor seviyesi 2.0 dır. Her özelliğin skoru -2.0 dan düşük ya da 2.0 dan büyüktür. Bakterilerin MS hastalarındaki boyutları kırmızı ile, HC lerdeki çokluk yeşil ile gösterilmiştir. Göreceli çokluk yığılmış çubuklarda, çubukların

her biri ortalama 25 ayrı cinsin çokluğunu gösterir, bunlar her iki grupta da en yüksek çokluğu gösterirler. Isı haritaları da yapılmıştır.

3.Sonuçlar

MS grubunda yaş ortalamaları 30.5 ± 9.9 olan 31 kadın, 19 erkek hasta yer aldı, 44 hastanın RRMS teşhisi, 6 hastanın CIS teşhisi vardı, ortalama Genişletilmiş Sakatlık Durum Ölçeği (EDSS) skoru 1.8 puan, ortalama hastalık süresi 3.4 sene idi. Tüm MS hastalığına ait özellikler [Table 2](#) de gösterilmiştir. Çoğu hasta daha önce hastalık iyileştirici tedavi (DMT) görmemişti, sadece 4 hasta tedaviyi 1 yıl önce bırakmışlardı.

Sağlıklı grup (HC) MS grubu ile aynı kriterlere uygun seçildiler, % 62 kadın, % 38erkek, ortalama yaş 28 ± 9.7 .

3.1. Mikrobiyom çeşitliliği

Mikrobiyom kompozisyonundaki farklılıkları alfa ve beta çeşitliliği kapsamında inceledik. Alfa çeşitliliğinde MS hastaları ile HC arasında istatistiksel olarak büyük bir fark görülmedi, tedaviden önce ($p = 0.85$) tedaviden sonra ($p = 0.95$). İkinci örnek için diğer grup kombinasyonlarında da büyük bir fark yoktu : G-DMT vs G-DMT + HOM ($p = 0.89$), G-DMT + DOM vs G-HOM ($p = 0.98$), G-DMT vs G-HOM ($p = 0.64$), ve alt gruplarda, G = IFN + HOM vs G-TER + HOM ($p = 0.23$), G-IFN vs G-IFN + HOM ($p = 0.06$) MS hastalarına ait birinci ve ikinci örneklerde ($p = 0.93$), G-DMT + HOM ($p = 0.38$) veya G-HOM ($p = 0.79$). Yine DMT uygulanan MS hastalarında da alfa çeşitliliğinde fark yoktu (G-DMT combined with G-DMT + HOM) ve DMT uygulanmayan MS hastalarında (G-HOM), $p = 0.81$. Tüm p değerleri [Table 3](#) de gösterilmiştir.

Beta çeşitliliği incelendiğinde ikinci örnekte gruplar arasında farklılıklar vardı G-HOM ile G-TER + HOM arasında ($p = 0.007$) ([Fig. 1](#)) ve G-HOM ile G-IFN arasında ($p = 0.012$), fakat MS hastaları ile HC arasında veya MS hastalarının 2 örneği arasında istatistik olarak çok anlamlı olmayan sonuçlar çıktı (all $p > 0.05$). Diğer sonuçlar [Table 3](#) and [Fig. 1*](#) (*supplementary data files) da sunulmuştur.

3.2. Taksonomik farklılıklar

165 analiz türlerin görülme sıklığı ve göreceli çokluk sonuçlarını vermektedir.

MS cohort için, aile seviyesinde 51 Operational Taxonomic Units (OTUs) tanımladık, çoğunluk oluşturanlar *Firmicutes* (49.45%), *Bacteroidetes* (34.3%), *Actinobacteria* (4.77%) and *Proteobacteria* (3.6%). Türler seviyesinde 1505 OTUs analiz ettik, en yüksek göreceli çokluk gösterenler *Prevotella copri* (10.75%) ve *Bacteroides* (10.3%), takip edenler *Faecalibacterium prausnitzii* (6.63%) ve *Blautia* (4.49%).

Herhangi bir tedavi başlamadan önce, ilk örnekte (S1) MS cohort (G-MS) ile HC (G-HC) arasındaki taksonomik farklılıkları inceledik. Tedavi görmeyen MS hastaları, HC ile karşılaştırıldığında, bazı türlerde farklılıklar gözlemlendi *Lentisphaerae* phylum ($p = 0.005$), *Prevotella stercorea* species ($p = 0.02$) (*Bacteroidetes* phylum). Seviyesi düşük olan aile *Actinobacteria* phylum ($p = 0.01$), ve türleri *Bifidobacterium* ($p = 0.01$) ile *Bifidobacterium adolescentis* ($p = 0.007$), aynı şekilde düşük seviyede olan *Bacteroides coprophilus* ($p = 0.02$) (*Bacteroidetes* familyasından). *Firmicutes* familyasının göreceli çokluğu düşüktü *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0.03$), *Lachnospiraceae* ($p = 0.01$), *Staphylococcus hominis* ($p = 0.02$) ve *Staphylococcus bacterium* ($p = 0.02$). *Proteobacteria* familyasında *Haemophilus* ($p = 0.04$) ve *Escherichia coli* ($p = 0.04$) düşüktü. Diğer istatistik olarak anlamlı sonuçlar [Fig. 2A](#), [fig. 2*-4*](#) da sunulmuştur.

Table 3

Overview of all p values for microbial diversity.

Comparison	Alpha diversity			Beta diversity	
	Chao	Shannon	Simpson	Bray-Curtis	Jaccard
G-HC vs G-MS (S1)	p = 0.85	p = 0.33	p = 0.55	p = 0.15	p = 0.13
G-HC vs G-MS (S2)	p = 0.95	p = 0.16	p = 0.39	p = 0.14	p = 0.12
G-DMT vs G-DMT + HOM (S2)	p = 0.89	p = 0.69	p = 0.59	p = 0.85	p = 0.9
G-DMT + HOM vs G-HOM (S2)	p = 0.93	p = 0.97	p = 0.87	p = 0.12	p = 0.2
G-DMT vs G-HOM (S2)	p = 0.64	p = 0.8	p = 1	p = 0.15	p = 0.13
G-DMT combined with G-DMT + HOM vs G-HOM (S2)	p = 0.81	p = 0.91	p = 0.91	p = 0.19	p = 0.2
G-IPN vs G-IPN + HOM (S2)	p = 0.06	p = 1	p = 0.84	p = 0.06	p = 0.06
G-TER vs G-TER + HOM (S2)	p = 0.13	p = 0.63	p = 0.63	p = 0.23	p = 0.35
G-IPN + HOM vs G-HOM (S2)	p = 0.47	p = 0.41	p = 0.66	p = 0.06	p = 0.06
G-TER + HOM vs G-HOM (S2)	p = 0.55	p = 0.39	p = 0.47	p = 0.007	p = 0.012
G-IPN vs G-HOM (S2)	p = 0.2	p = 0.35	p = 0.72	p = 0.012	p = 0.016
G-TER vs G-HOM (S2)	p = 0.62	p = 0.62	p = 0.72	p = 0.62	p = 0.33
G-IPN + HOM vs G-TER + HOM (S2)	p = 0.23	p = 0.14	p = 0.14	p = 0.06	p = 0.11
S1 vs S2 (G-MS)	p = 0.93	p = 0.26	p = 0.36	p = 0.83	p = 0.93
S1 vs S2 (G-DMT + HOM)	p = 0.38	p = 0.6	p = 0.69	p = 0.95	p = 0.99
S1 vs S2 (G-HOM)	p = 0.79	p = 0.4	p = 0.44	p = 0.93	p = 0.93
S1 vs S2 (G-IPN + HOM)	p = 0.96	p = 0.86	p = 0.8	p = 0.87	p = 0.93
S1 vs S2 (G = TER + HOM)	p = 0.24	p = 0.53	p = 0.63	p = 0.96	p = 0.93

*Values in bold are statistically significant. This table presents specific comparisons between our cohorts and diversity indexes applied, along with the p value of each test. Abbreviations: S1 = sample 1; S2 = sample 2.

İkinci örnekleri incelediğimizde, sonuçlar tedavi gören MS hastaları için HC lere göre hafifçe değişti için, *Bifidobacterium* ($p = 0.02$), *Ruminococcus* ($p = 0.04$) and *Clostridiales* ($p = 0.01$) azalmış, *Gemella* ($p = 0.04$), *Megasphaera* ($p = 0.02$) ile *Prevotella stercorea* ($p = 0.02$) çoğalmıştı (Fig. 2B, fig. 5*-7*). Tedavi başladıktan 2 ay sonra DMT alan hastalar DMT (G-DMT) ile homeopati tedavisi uygulanan (G-DMT + HOM) hastaları karşılaştırdık, ve şu sonuçları gördük: G-DMT + HOM ile karşılaştırıldığında G-DMT de artan bakteriler *Catenibacterium* ($p = 0.02$), *Lachnospiraceae* ($p = 0.02$), *Sharpea* ($p = 0.02$) ile *Gammaproteobacteria* ($p = 0.02$) idi, seviyesi düşenler ise *Shuttleworthia* ($p = 0.04$), *Cytophaga* ($p = 0.03$) ile *Rumen* ($p = 0.02$) idi. Tedaviden 2 ay sonra *Cyanobacteria* ($p = 0.002$), *Catenibacterium* ($p = 0.01$), *Alloprevotella* ($p = 0.03$), *Lachnospiraceae* ($p = 0.003$), *Clostridium* ($p = 0.01$), *Prevotella copri* ($p = 0.04$), *Prevotella stercorea* ($p = 0.03$) G-IFN alt grubunda G-IFN + HOM grubuna göre daha çoktu. Diğer taraftan, G-IFN + HOM grubunda seviyesi yüksek olanlar *Proteobacteria* ($p = 0.02$), *Escherichia shigella* ($p = 0.01$), *Barnesiella* ($p = 0.03$), *Serratia* ($p = 0.008$), *Lactobacillus zeae* ($p = 0.02$) oldu. G-TER grubunda *Escherichia shigella* ($p = 0.007$), *Lactobacillus* ($p = 0.01$), *Enterobacter* ($p = 0.02$), *Enterococcus faecalis* ($p = 0.03$) G-TER + HOM grubundan daha benign idi, G-TER + HOM da ise *Rickenellaceae* ($p = 0.01$) and *Lachnospiraceae* ($p = 0.02$) yüksekti. Homeopatik tedavi alan 2 grubu da karşılaştırdık, G-DMT + HOM ile G-HOM. Gördük ki G-DMT + HOM grubunda *Megasphaera* ($p = 0.04$), *Eubacterium oxidoreducens* ($p = 0.02$), *Veillonellaceae* ($p = 0.02$) ile *Gardnerella* ($p = 0.02$) türleri, G-HOM grubuna göre daha fazlaydı. G-DMT + HOM grubuna göre G-HOM grubunun daha zengin olduğu türler *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0.01$), *Akkermansia muciniphila* ($p = 0.02$), *Lachnospiraceae* ($p = 0.003$), *Bacteroides acidifaciens* ($p = 0.04$) and *pectinophilus* ($p = 0.03$), *Veilonella* ($p = 0.01$) idi, (fig. 8*-20*).

Araştırmada gözlemlendiğimiz bir diğer ilginç bir nokta da tedavi başladığından (S1) iki ay sonra (S2) mikrobiyomun zaman içinde nasıl değişiyor olmasıydı. MS cohort için taxonomik değişimler Fig. 3 de görülebilir, en zengin 25 tür organizma. MS hastalarında tedaviden sonra ilk örnek ile karşılaştırıldığında istatistik olarak iki örnek arasındaki anlamlı değişimler en çok *Firmicutes* familyası için geçerlidir, daha düşük seviyelerin not edildiği organizmalar *Ruminococcus* ($p = 0.03$), *Oscillospira* ($p = 0.0004$), *Anaerotruncus* ($p = 0.02$), *Lachnoclostridium* ($p = 0.01$), *Lachnospiraceae* ($p = 0.02$) ile *Eubacterium oxidoreducens* ($p = 0.04$). Tedavi gören MS hastalarında ilk örneğe göre daha çok çeşitlilik de görülmüştür *Firmicutes* phylum (*Sulfobacillus* $p = 0.02$, *Enterococcus faecalis* $p = 0.02$), *Bacteroidetes* (*Hymenobacter* $p = 0.04$), *Proteobacteria* ($p = 0.04$), *Actinobacteria* (*Amycolatopsis* $p = 0.04$), *Fusobacterium* (*Leptotrichiaceae* $p = 0.04$) (fig. 21*-25*).

G-DMT + HOM grubu tedaviden sonra ilk örneğe göre *Firmicutes* components (*Oscillospira* $p = 0.01$, *Lachnoclostridium* $p = 0.03$, *Lachnospiraceae* $p = 0.03$) and *Proteobacteria* (*Helicobacteraceae* $p = 0.01$, *Undibacterium* $p = 0.03$) türlerinde çoğalma göstermiştir. Salt homeopati tedavisi uygulanan grupta ise (G-HOM) *Eubacterium oxidoreducens* ($p = 0.03$) ilk örneğe göre azalma görülmüştür (fig. 25*-32*).

4. Tartışma

Verilerimiz MS hastaları ile HC arasında önce ve herhangi bir tedaviden sonra çeşitlilikte önemli bir değişim göstermedi. HC ile karşılaştırıldığında tedavi görmemiş hastalarda *Prevotella stercorea* türünde artış, *Actinobacteria* and *Faecalibacterium prausnitzii* türlerinde düşüş izlenmiştir. Taxonomik değişim tedaviden sonra hafifçe farklı görülmüştür, MS hastalarında *Gemella* türü yükselmiş *Ruminococcus* türü azalmıştır. Tedaviden sonra gruplar karşılaştırıldığında taxonomik değişimler görülmüştür. Örneğin homeopati ile tedavi edilen hastalarda *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* ile *Bacteroides* türleri kombine tedavi gruplarına göre artmış olduğu görüldü. Ayrıca beta çeşitliliğinde de bu iki grup arasında farklar vardı. Zaman içinde tedavi

başladıktan 2 ay sonra alınan örnekler karşılaştırıldığında *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae* ile *Eubacterium oxidoreducens* türlerinin tedaviden sonra azaldığı görülmüştür. Homeopati zaman içinde *Eubacterium oxidoreducens* türünü azalttı. Sağlıklı bir mikrobiyotanın mikroorganizmalar ile onları barındıran kişi arasında bir denge olduğuna ve geniş bir çeşitlilik, denge ve tutarlılık ile kişinin homeoatsisini korudğuna ve bağışıklık sistemini işlevlerini düzenlediğine dair bir inanış vardır (Freedman et al., 2018). Her ne kadar dış faktörler de hızlıca mikrobiyotayı değişime uğratabilseler de sağlıklı tutarlı bakteriler dış etken çok ısrarlı olmadığı sürece orijinal kompozisyonlarına dönerler. Daha fazla bio çeşitlilik türler arasında farklılıklar daha fazla biyolojik işlev gerçekleştirmeye, daha sabit bir tutarlılık, değişikliklere karşı direnç ve iyileşme kabiliyeti için güçlülük demektir (Riccio and Rossano, 2018). Dyobiosis bakteriyel kompozisyonda bir dengesizlik demektir, zararlı mikroorganizmaların çoğalması ve yararlıların azalması enflamatuar bir duruma yol açabilir (Freedman et al., 2018). MS cohort sırasında mikrobiyota profilinde *Firmicutes* ile *Actinobacteria* türlerinin daha çok, *Bacteroidetes* familyasının daha az olduğunu gördük. Bu değişiklikler yağ ve şeker tüketimim çok olan Batı medeniyetlerine özeldir, *Firmicutes* yiyeceklerden daha fazla enerji çıkartabilir, kiloya sebep olur. Diğer tarafta lif açısından zengin karmaşık karbonhidrat temelli yiyecekler *Bacteroidetes* türünün ve metaboiltlerin çoğalmasına yol açar(Magne et al., 2020). MS terapileri barsak mikrobiyotasını değiştirebilir, fakat çalışmalarda yeterli delil henüz yoktur. Interferon beta T hücrelerini ve ona yardımcı durdurur, Tregs ve baskılayıcı B hücrelerini harekete geçirir, mikroplar ve epitel hücreleri arasında bağlantı kurar, proteinler ve endotelial hücreler arasındaki sıkışık kavşakta barsak emilimini dengeler. Teriflunomide dihydroorotate dehydrogenase, pyrimidine sentezini, proinflatuar sitokinleri engeller ve T reg hücrelerinin çoğaltarak STAT-6 sinyal yollarını baskılar ve bu süreçle barsak bikrobiyomunu etkileyebilir (Camara-Lemarroy et al., 2018; Baecher-Allan et al., 2018).

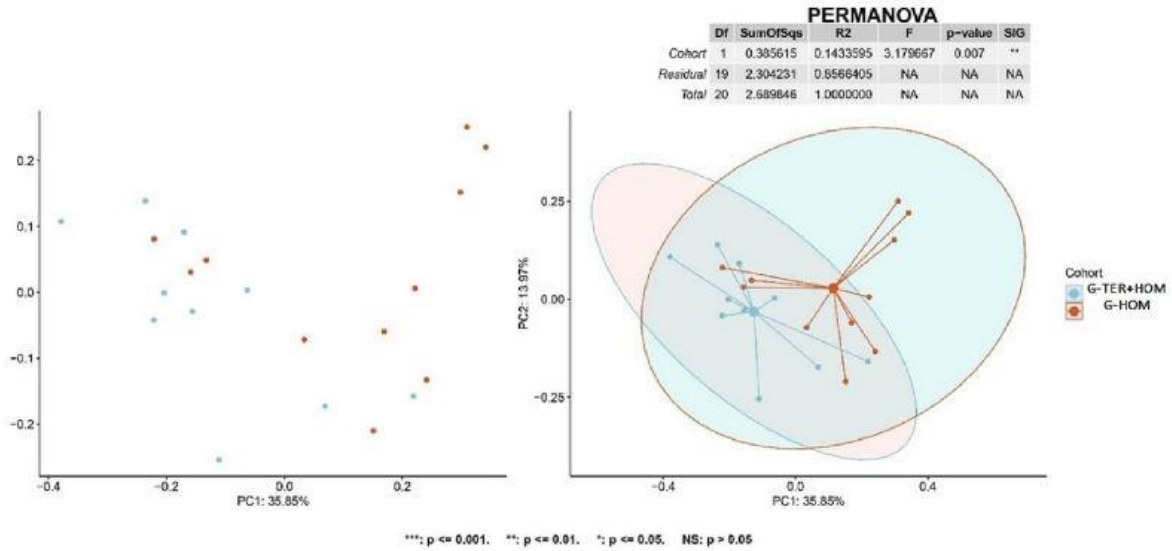


Fig. 1. Bray-Curtis Principal coordinate analysis (PCoA), homeopathy + teriflunomide (G-TER + HOM) vs homeopathy group (G-HOM), sample 2. Bray-Curtis diversity value quantifies the difference between the group with homeopathy and teriflunonide and the group with homeopathy, after two months treatment. The figure on the right shows a 95% confidence ellipse for each group. PERMANOVA test results are included into the table.

4.1. MS hastaları ile HC nin başlangı noktasında karşılaştırılması

Çalışmamız sırasında tedaviden önceki incelemelerde MS ve HC grupları arasında ne alfa ne de beta çeşitliliğinde büyük farklılık gözlemlenmedi. Bu durum literatürde de görüldüğü (Mirza et al., 2020) gibi MS hastalarının mikrobiyotasında özel bir durum olmadığını düşündürdü. Taxokomi-sınıflandırma seviyesinde birçok organizmanın MS hastalarında HC grubundan daha fazla olduğu dikkat çekti. *Actinobacteria* türünün bağışıklık sisteminin oluşmasında faydalı rolü olduğu bilinir (Adamczyk- Sowa et al., 2017), bu tür MS hastalarında düşük seviyede idi. MS cohort seviyesinde *Bifidobacterium* düşüktü. Literatürde bağışıklık sisteminin hastalıkları üzerindeki rolü hakkında karışık bilgiler bulunmasına rağmen pekçok çalışma *Bifidobacterium* türünün anti enflamatuar bir süreç başlattığından bahsedilir (Budhram et al., 2017; Tankou et al., 2018). *Prevotella* genus türü MS için üstünde çalışılmış bir türdür, phytoestrogen metabolizmasında görevlidir ve MS hastalarında az rastlanır, tedavi olan hastalarda daha çok görülür (Chen et al., 2016; Brown et al., 2021). Bizim MS hastalarımızda HC ile karşılaştırdığımızda tedaviden evvel ve sonra, bir tür hastalarda daha fazla çıkmıştı : *Prevotella stercorea*. *Prevotella* genus için önemli bir bilgi kaydedilmemişti. Bunun sebebi bu türün değişik roller üstlenen çok fazla cinsi bulunduğundan olabilir (Mirza et al., 2020).

Bazı bakteriyel metabolitler merkezi sinir sistemi üzerinde direkt etkileri vardır, kısa zincirli yağlı asitler (SCFA) gibi barsak mukozasında immunosupresif etkileri bulunur. *Faecalibacterium prausnitzii* ile *Bacteroides coprophilus* SCFA metabolizmasına katılırlar (Freedman et al., 2018). *Bacteroides* faydalı bir bakteridir, IL-10 üretir ve genellikle MS hastalığının alt seviyelerinde görülür. *Faecalibacterium prausnitzii* sağlıklı bir mikrobiyotanın işaretçisidir ve MS hastalarında tükenmiş oldukları gözlemlenmiştir, ve bu literatürde de görülebilir (Tremlett et al., 2016) aynı gözlem bizim cohort seviyemizde de görülmüştür. Bakteriyel sınıflandırmada görülen tüm bu değişiklikler HC grubu ile karşılaştırıldığında MS hastalarının mikrobiyotasında bir dengesizliğin söz konusu olduğu ortaya çıkmaktadır.

4.2. Tedaviden sonra grupların karşılaştırması

Herhangi bir tedavinin başlangıcından iki ay sonra MS hastalarında mikrobiyomu değiştirip değiştirmediğini analiz ederken MS hastalarında HC ile karşılaştırıldığında alfa ve beta çeşitliliğinde literatürün (Mirza et al., 2020) de önerdiği gibi büyük bir fark görmedik. Sınıflandırmadaki değişiklikler konusunda faydalı bir bakteri olan *Ruminococcus* türünün DMT den sonra MS hastalarında genellikle düzelir (Zhu et al., 2020), bizim verilerimiz ikinci örnekte MS hastalarında HC ye nazaran bir düşüş gösterdi. *Clostridium* bir butyrat türüdür ve düzenleyici T hücreleri ile IL-10 anti-inflamatuar sitokin üretimine yardımcı olan bir bakteriyi çoğaltmakla görevlidir (Miyake et al., 2015) ve tedaviden sonra MS hastalarında azalmıştır.

Tedaviden sonra gruplar arasında görülen değişiklikler DMT ya da Homeopati tedavilerinin barsak mikrobiyotası üzerinde etkilerinin olduğunu altını çizmektedir. DMT (G-DMT) tedavisi alan hastalar ile homeopati ile kombine tedavi alan grup (G-DMT + HOM) gözle görülür değil ama bakteriyel çokluk anlamında bakıldığında alt gruplarda büyük değişiklikler görüldü fakat değişiklikler bazen tutarsız ve çelişkili idi. G-IFN and G-IFN + HOM ikilisinde interferon beta1a alan hastalara kombine tedavide homeopatinin yararları olduğunu düşündüren etkiler görüldü, G-TER and G-TER + HOM ikilisinde de teriflunomide hastalarının üstünde etkisi olduğunu düşündürdü.

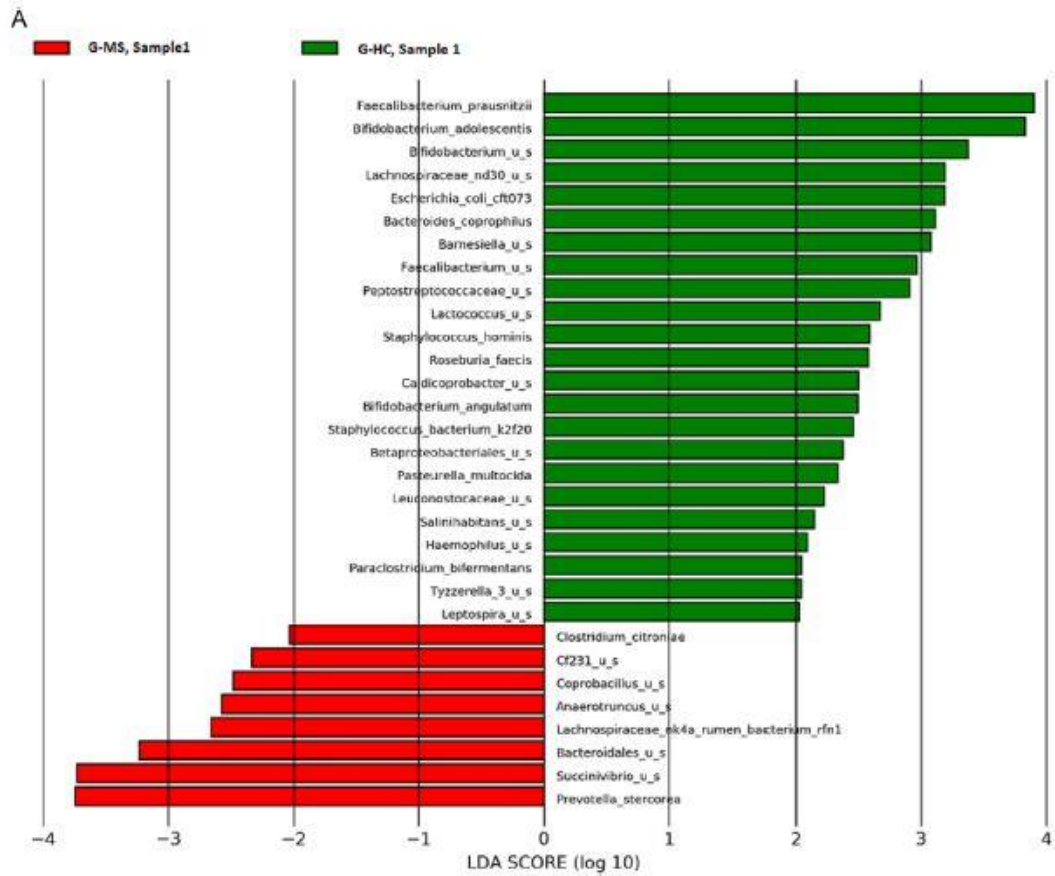


Fig. 2A. Linear Discriminant Analysis Effect Size (Lefse) at species level between multiple sclerosis patients (G-MS) and healthy controls (G-HC) before any treatment (sample 1).

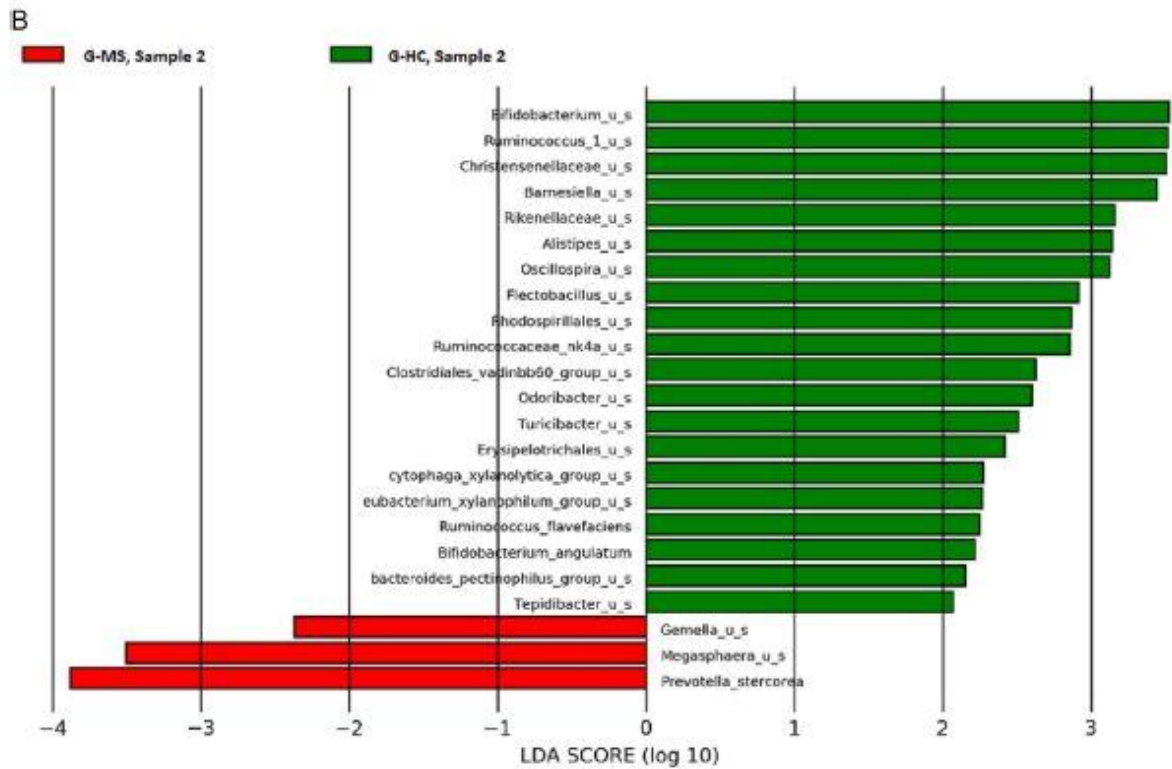


Fig. 2B. Lefse analysis at species level between multiple sclerosis patients (G-MS) and healthy controls (G-HC) after two months of treatment (sample 2).

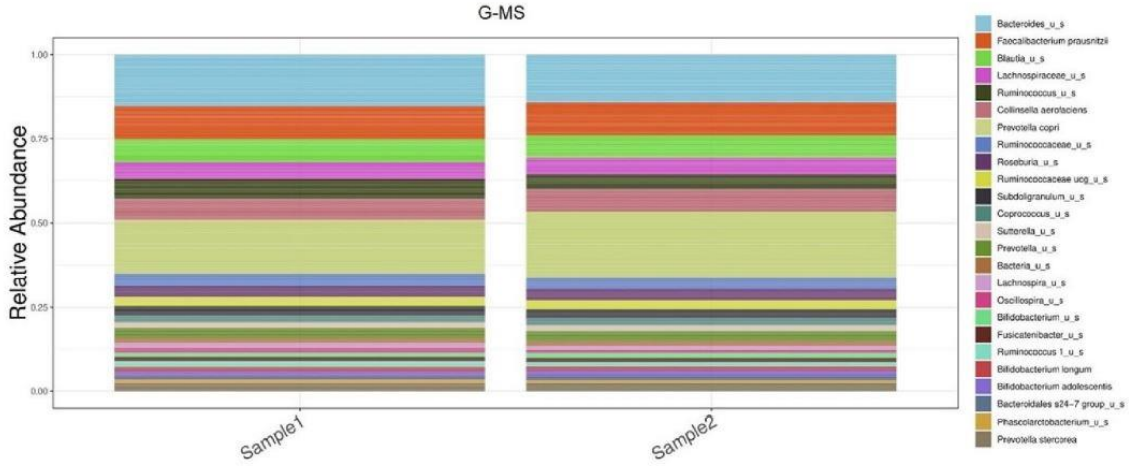


Fig. 3. Stacked Bars Charts: comparison between sample 1 and sample 2 for MS cohort, top 25 species.

Kombine tedavi ile karşılaştırıldığında homeopati tedavisinde olan hastalarda *Akkermansia muciniphila* türünün yükseldiği görüldü, karşılaştırılan grup teriflunomide ve homeopati uygulanan gruptur. Salt homeopati ile tedavide olanlarda beta çeşitliliği interferon grubununkinden farklı görüldü, tüm p değerleri Table 3 de gösterilmiştir. İstatistik olarak anlamsız p değeri 0.06, 0.05 e yakın olarak beta çeşitliliği interferon grubunda homeopati grubundan biraz farklı çıktı. Bu sonuçlar homeopatinin beta çeşitliliği ile MS hastalarında etkili olduğunu düşündürmektedir, dah geniş çalışmalar yapılmasına gereksinim vardır.

Seçilmiş phyla familyası ve cinsleri arasında *Firmicutes* türünün kombine terapi altındaki gruplarda diğer gruplara nazaran azaldığı görüldü, fakat o kadar anlamlı değildir. *Firmicutes* türünün MS hastalığının tekrarladığı süreleri kısaltmak ile ilgisi vardır (Sand and Baranzini, 2018), yani bu iki komdine terapi hastalığı yavaşlatmak bağlamında faydalı olabilir

İki faydalı bakteri SCFAs metabolizması ile ilgilidir, *Bacteroides* and *Faecalibacterium prauznitzii* türlerinin homeopati grubu ile HC arasında da buna benzer sonuçlar çıkmıştır, aşağı yukarı *Bacteroides* türünün % 12 si ve *Faecalibacterium* türünün % 7si için. Bu sonuç da homeopati tedavisinin mikroorganizmaları sağlıklı bir dengede tutmakta rolü olduğunu göstermektedir.

4.3. Zaman içinde karşılaştırma (ilk örnek ile ikinci örnek arasında)

Mikrobiyomdaki değişiklikler MS cohort için zaman içinde analiz edilmiş, tüm tedavi yöntemleri ile ilişkili sonuçların altı çizilmiştir : DMT, Homeopati ya da ikisinin kombinasyonu. MS tedavisindeki hastalarda çoklu phyla familyasında pekçok bakteriyel değişiklikler gözlemlendi, bu durum tedavinin genel olarak mikrobiyota üzerinde pozitif etkisi olduğunu düşündürmektedir. Hastalarda tedaviden sonra litertürde (Mirza et al., 2020) de görüldüğü gibi *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*, *Eubacterium oxidoreducens* türlerinde azalma görüldü. *Lachnospiraceae* SCFAs üretimi ile mukoza geçirgenliğini düşürmekle ve epitel hücrelerindeki proteinlerin ifade edilmesi ile ilgisi vardır (Rinninella et al., 2019).

Homeopati dahil 2 grup için G-DMT + HOM ile G-HOM ilk örnekteki bakteri seviyesi ikinci örnekte çoğalmıştır. Bu durum homeopati tedavisinin veya DMT ile kombine tedavilerin barak mikrobiyotasında değişiklikler yapabildiğini göstermektedir.

Şimdiye kadarki çalışmalarda MS hastalarının mikrobiyotasını geliştirmekte homeopati tedavisi hiç uygulanmamıştı, ve sonuçları karşılaştırma yapılabilecek herhangi bir çalışma yoktu. Bizim hastalarımızdan salt homeopati uygulanmış olanlar tedavinin ikinci ayında oldukça tutarlı bir tablo sergilediler, istatistik olarak anlamlı olan sadece *Eubacterium oxidoreducens* türünün azalması idi. Kombine tedavilerde bazı bakteri türlerinin ikinci örnekte azaldığı görüldü. Tüm bu sonuçlar homeopati tedavisinin hastalarda tutarlı bir mikrobiyom kompozisyonu oluşturabileceğinin düşündürmektedir.

4.4. Kuvvetli ve sınırlı noktalar

Barsak örneklerinin zaman içindeki dinamik değişikliklerini inceleyen çalışmamızın tıp alanına katkısı olmuştur. Yanlız tedavi yöntemlerinin etkisi değil aynı zamanda zaman içindeki değişiklikleri de ölçülmüştür. Ayrıca homeopati tedavisini seçenek olarak sunan ilk çalışmadır. Muhtemel sınırları, mikrobiyotanın etkileyebilecek her türlü beslenme ve çevresel faktörlerin çalışmada gerekli olan 2 aylık süre içinde dışlanamaz olmasıdır. Daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

5. Conclusions

MS hastalarında mikrobiyota dengesizdir, HC sağlıklı kişiler ile karşılaştırıldığında çeşitli taxonomik sınıflandırma farklılıkları görülür. Tedaviden önce MS hastalarında *Prevotella stercorea* türünde çokluk, *Actinobacteria*, *Bifidobacterium* and *Faecalibacterium prauznitzii* türlerinde azlık görüldü. İnterferon beta1a, teriflunomid ya da homeopati uygulandığında taxonomik sınıflandırmada değişiklikler gözlemlendi. Tedavi uygulanan MS hastalarında mikrobiyota HC grubuna göre farklı bir görünümdeydi, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* and *Clostridiales* türleri azalmış ve *Gemella*, *Megasphaerae* and *Prevotella stercorea* türleri çoğalmıştı. Birinci ve ikinci örnek karşılaştırıldığında, MS mikrobiyotasında değişiklikler tespit edildi, *Lachnospiraceae* and *Ruminococcus* türleri azalmış ve *Enterococcus faecalis* türü çoğalmıştı. Bu dinamik değişikliklerin tedaviden kaynaklanmış olma ihtimali vardır.

Mikrobiyomda çeşitlilik olarak tedavilerden sonra büyük bir değişiklik gözlemlenmedi. İstatistik olarak bağışıklık düzenleyici ilaç kullanan gruplar ile karşılaştırıldığında çeşitlilikte iyileştirme etkisi bağlamında anlamlı gözükten tek sonuç homeopati tedavisi alanlarda beta çeşitlilik indeksleri oldu. *Eubacterium oxidoreducens* türü de homeopatik tedaviden sonra azalmıştı. Sonuçlarımız homeopatik tedavinin mikrobiyota yapısı üzerinde etkisi olduğu yönündedir.

Bu çalışma MS hastalarında mikrobiyota yapısının önemli bir rolü olduğunun ve bu konuda ileri düzeyde araştırmalar gerektiğinin altını çizmiştir. Mikrobiyom çok geniş bir ekosistemdir, kompozisyonu sayısal olarak belirlenemeyen pekçok faktöre bağlıdır. Projemiz spesifik DMT tedavileri ile klinik uygulamada tamamlayıcı ve alternatif bir tedavi olarak kullanılan homeopatinin muhtemel etkileri üzerine yoğunlaşmıştır.

Funding Bu çalışma herhangi bir finansal destek almamıştır.

Etik uygunluk Bu çalışma Helsinki Beyannamesine uygun olarak yürütülmüş ve Cluj Emergency County Hospital Ethics Committee tarafından onaylanmıştır, onay kodu : 2394/28.01.2020.

Bilgilendirilmiş onay beyanı Çalışmada yer alan her katılımcıdan bilgilendirilmiş onay beyanı alınmıştır.

CRedit Yazarlık katkı beyanı

Vitalie Vacaras: Conceptualization, Methodology, Resources, Writing – review & editing, Supervision. **Dafin F. Muresanu:** Conceptualization. **Anca-Dana Buzoianu:** Conceptualization. **Cristina Nistor:** Methodology, Resources, Formal analysis, Writing – review & editing. **Stefan Cristian Vesa:** Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision. **Andreea Cristina Paraschiv:** Methodology, Resources, Formal analysis. **Daniela Botos-Vacaras:** Methodology, Resources. **Cristiana Vacaras:** Methodology, Resources. **George Vithoukas:** Conceptualization, Supervision.

Çıkar çatışması beyanı Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Veri kullanılabilirliği Bu çalışmada kullanılan bilgilere muhabir yazardan yazılı olarak ulaşılabilir.

Teşekkür CosmosID laboratuvarına örneklerin incelenmesi ve istatistik analiz desteği için teşekkür ederiz.

Appendix A. Ek veriler Bu çalışmaya ait ek bilgilere bu linkten ulaşılabilir : <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2023.578087>.

Referanslar

Adamczyk-Sowa, M., Medrek, A., Madej, P., Michlicka, W., Dobrakowski, P., 2017. Does the gut microbiota influence immunity and inflammation in multiple sclerosis pathophysiology? *J Immunol Res* 2017, 1–14.

Baecher-Allan, C., Kaskow, B.J., Weiner, H.L., 2018 Feb. Multiple sclerosis: mechanisms and immunotherapy. *Neuron*. 97 (4), 742–768.

Brown, J., Quattrochi, B., Everett, C., Hong, B.Y., Cervantes, J., 2021 May. Gut commensals, dysbiosis, and immune response imbalance in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 27 (6), 807–811.

Budhram, A., Parvathy, S., Kremenchutzky, M., Silverman, M., 2017 Apr. Breaking down the gut microbiome composition in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 23 (5), 628–636.

Camara-Lemarrroy, C.R., Metz, L., Meddings, J.B., Sharkey, K.A., Wee, Yong V., 2018 Jul 1. The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain*. 141 (7), 1900–1916.

Cekanaviciute, E., Yoo, B.B., Runia, T.F., Debelius, J.W., Singh, S., Nelson, C.A., et al., 2017 Oct 3. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (40), 10713–10718.

Chen, J., Chia, N., Kalari, K.R., Yao, J.Z., Novotna, M., Paz Soldan, M.M., et al., 2016 Jun. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.* 6 (1), 28484.

Chikramane, P.S., Suresh, A.K., Bellare, J.R., Kane, S.G., 2010 Oct. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: a nanoparticulate perspective. *Homeopathy*. 99 (4), 231–242.

Chu, F., Shi, M., Lang, Y., Shen, D., Jin, T., Zhu, J., et al., 2018. Gut microbiota in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: current applications and future perspectives. *Mediat. Inflamm.* 2018, 1–17.

Fisher, P., Ernst, E., 2015 Jul 14. Should doctors recommend homeopathy? *BMJ*. 351, h3735.

Freedman, S.N., Shahi, S.K., Mangalam, A.K., 2018 Jan. The “gut feeling”: breaking down the role of gut microbiome in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 15 (1), 109–125.

Kim, B.R., Shin, J., Guevarra, R.B., Lee, J.H., Kim, D.W., Seol, K.H., et al., 2017 Dec 28. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27 (12), 2089–2093.

Kim, S., Chang, L., Weinstock-Guttman, B., Gandhi, S., Jakimovski, D., Carl, E., et al., 2018 Jun. Complementary and alternative medicine usage by multiple sclerosis patients: results from a prospective clinical study. *J. Altern. Complement. Med.* 24 (6), 596–602.

Maglione, A., Zuccal`a, M., Tosi, M., Clerico, M., Rolla, S., 2021 Jul 29. Host genetics and gut microbiome: perspectives for multiple sclerosis. *Genes*. 12 (8), 1181.

Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P., et al., 2020 May 19. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients*. 12 (5), 1474.

Manzalini, A., Galeazzi, B., 2019 Aug. Explaining homeopathy with quantum electrodynamics. *Homeopathy*. 108 (03), 169–176.

Mirza, A., Forbes, J.D., Zhu, F., Bernstein, C.N., Van Domselaar, G., Graham, M., et al., 2020 Jan. The multiple sclerosis gut microbiota: a systematic review. *Multiple Scleros. Relat. Disord.* 37, 101427.

Miyake, S., Kim, S., Suda, W., Oshima, K., Nakamura, M., Matsuoka, T., et al., 2015 Sep 14. Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *Wilson BA, editor. PLoS One* 10 (9), e0137429.

Olsen, S.A., 2009 Mar. A review of complementary and alternative medicine (CAM) by people with multiple sclerosis. *Occup. Ther. Int.* 16 (1), 57–70.

Riccio, P., Rossano, R., 2018 Jan. Diet, gut microbiota, and vitamins D + a in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 15 (1), 75–91.

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggianno, G., Gasbarrini, A., et al., 2019 Jan 10. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. 7 (1), 14.

Sand, I.K., Baranzini, S.E., 2018 Apr. The microbiome and MS: the influence of the microbiota on MS risk and progression—session chair summary. *Mult. Scler.* 24 (5), 587–589.

Strandwitz, P., 2018 Aug. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res.* 1693, 128–133.

Tankou, S.K., Regev, K., Healy, B.C., Cox, L.M., Tjon, E., Kivisakk, P., et al., 2018 Jan. Investigation of probiotics in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 24 (1), 58–63.

Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., et al., 2018 Feb. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 17 (2), 162–173.

Tremlett, H., Fadrosch, D.W., Faruqi, A.A., Zhu, F., Hart, J., Roalstad, S., et al., 2016 Aug. Gut microbiota in early pediatric multiple sclerosis: a case-control study. *Eur. J. Neurol.* 23 (8), 1308–1321.

Whitmarsh, T.E., 2003 Feb. Homeopathy in multiple sclerosis. *Complement Therap Nurs Midwifery* 9 (1), 5–9.

Zhu, S., Jiang, Y., Xu, K., Cui, M., Ye, W., Zhao, G., et al., 2020 Dec. The progress of gut microbiome research related to brain disorders. *J. Neuroinflammation* 17 (1), 25.