

Wpływ leczenia stwardnienia rozsianego na mikroflorę jelitową człowieka

Mikroflora jelitowa, czyli wszystkie mikroorganizmy, zamieszkujące nasz przewód pokarmowy, może mieć ogromny wpływ na wystąpienie i przebieg stwardnienia rozsianego (SM), czyli demielinizacyjnej choroby neurologicznej.

W badaniu, które przeprowadzono, wzięło udział 50 pacjentów ze stwardnieniem rozsianym i 21 zdrowych osób z grupy kontrolnej (HC). Dwudziestu pacjentów otrzymało terapię modyfikującą przebieg choroby (DMT), interferon beta1a lub teriflunomid, 19 osób- DMT w połączeniu z homeopatią, a 11 pacjentów poddano wyłącznie leczeniu homeopatycznemu. Zebraliśmy łącznie 142 próbki z jelit, po dwie dla każdej osoby: w momencie przystąpienia do badania i osiem tygodni po zakończeniu leczenia. Porównaliśmy mikrobiom pacjentów ze stwardnieniem rozsianym z mikrobiomem z grupy kontrolnej, przeanalizowaliśmy jego ewolucję w trakcie kuracji oraz wpływ interferonu beta1a, teriflunomidu i homeopatii. Odkryto, iż nie było różnicy w różnorodności alfa, tylko dwa wyniki różnorodności beta dotyczyły terapii homeopatycznej. W porównaniu z HC, nieleczeni pacjenci ze stwardnieniem rozsianym doświadczyli spadku Actinobacteria, Bifidobacterium, Faecalibacterium prauznitzii i zwiększoną liczebność Prevotella stercorea, podczas gdy pacjenci poddani leczeniu- wykazywali obniżone Ruminococcus i Clostridium. W porównaniu z początkową próbką, leczeni pacjenci ze stwardnieniem rozsianym mieli spadek liczby Lachnospiraceae i Ruminococcus i zwiększoną liczbę Enterococcus faecalis. Eubacterium oxidoreducens zostało zredukowane po leczeniu homeopatycznym. Te badania wykazały, że pacjenci ze stwardnieniem rozsianym mogą cierpieć na dysbiozę jelitową. Leczenie interferonem beta1a, teriflunomidem lub homeopatią wiązało się z kilkoma zmianami taksonomicznymi. Jak się okazuje DMT i homeopatia mogą mieć pewien wpływ na mikroflorę jelitową.

1. Wstęp

Ludzka mikroflora jelitowa, składająca się z dużej różnorodności mikroorganizmów, które znajdują się w naszym przewodzie pokarmowym, jest wg klasyfikacji podzielona na:

gatunki, rodzaje i gromady, zawierające zarówno korzystne drobnoustroje, jak i te chorobotwórcze (Rinninella i in., 2019; Camara-Lemarroy i in., 2018).

Mikroflora najczęściej kształtuje się we wczesnym okresie dzieciństwa, w zależności od kilku czynników, takich jak: rodzaj porodu, sposób karmienia (mleko matki bądź mlekiem modyfikowane), oraz leki, przyjmowane przez dziecko bądź kobietę karmiącą. Po pierwszych trzech latach życia osiąga ona częściową stabilizację, zachodzą w niej jednak ciągle subtelne zmiany, spowodowane czynnikami zewnętrznymi: dietą, ćwiczeniami, wskaźnikiem masy ciała, ekspozycją środowiskową i lekową (Rinninella i in., 2019).

Mikrobiom składa się z całości genów, białek i metabolitów tych wszystkich organizmów (Maglione i in., 2021).

Stwardnienie rozsiane (SM) jest chorobą autoimmunologiczną ośrodkowego układu nerwowego, w której podatność genetyczna spotyka się z czynnikami środowiskowymi. Obejmuje: „upośledzoną” integralność bariery krew-mózg, zapalenie, demielinizację, utratę oligodendrocytów, glejozy i zwyrodnienie aksonów. Choroba przebiega w trzech głównych etapach: etap przedkliniczny, w którym kombinacja genetyki i czynników środowiskowych może być wyzwalaczem patologicznym, kolejnym etapem jest stan zapalny, w którym mamy do czynienia z epizodami dysfunkcji neurologicznych, takich jak: zapalenie nerwu wzrokowego, zapalenie układu piramidowego, uszkodzenie mózdzku lub pnia mózgu, a także występujące objawy czuciowe, dysfunkcja neurogenna pęcherza moczowego; końcowym zaś etapem jest neurodegeneracyjne stadium progresji choroby, w którym stwierdza się postępującą niepełnosprawność, związaną głównie z utratą kontroli motorycznej pacjenta. Choroba ma różne postacie kliniczne: zespół izolowany klinicznie (CIS), rzutowo-remisyjne stwardnienie rozsiane (RRMS), wtórnie postępujące stwardnienie rozsiane SPMS) i pierwotnie postępujące SM (PPMS). Modyfikowalne czynniki ryzyka, związane z SM zostały dokładnie przeanalizowane w celu wyznaczenia tego konkretnego, odgrywającego główną rolę w procesie patologicznym, przeanalizowano min. skład mikrobiomu (Baecher-Allan i in., 2018). Ostatnie badania przedstawiają, że pacjenci z SM mają odmienny skład mikrobiomu od ludzi zdrowych (Mirza i in., 2020). Ze względu na fakt, że mikrobiom jest unikalny dla każdej osoby i zawiera ogromną różnorodność mikroorganizmów, trudnym zadaniem jest wyróżnienie konkretnej zdrowej mikroflory (Rinninella i in., 2019). A zdrowa mikrobiota ma wpływ na wiele podstawowych funkcji organizmu, w tym na przepuszczalność i perystaltykę jelit, syntezę witamin, wchłanianie składników odżywczych, ale także na rozwój tzw. wrodzonego układu

odpornościowego (Chu i in., 2018). Ostatnie badania wskazują na możliwy związek między mikrobiomem a niektórymi neurologicznymi patologiami o podłożu immunologicznymi (Mirza i in., 2020). Pojęcie osi -mikroflora jelitowa-mózg- odnosi się do różnych mechanizmów komunikacji pomiędzy układem nerwowym a przewodem pokarmowym człowieka (Strandwitz, 2018).

Mikrobiota może wpływać na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) różnymi drogami. Po pierwsze, dotyczy ona pracy sieci mózgowej, moduluje neuroprzekaźniki (takie jak kwas gamma-aminomasłowy, serotonina, dopamina, histamina) i jest związany ze współczulnym lub przywspółczulnym układem nerwowym, zwłaszcza nerwu błędnego. Po drugie, bierze udział w szlaku endokrynologicznym, jako reakcja na stres. Kortykoidy, uwalniane przez oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczową mogą zmieniać skład mikroflory i zwiększać przepuszczalność jelit. Kolejnym mechanizmem układu nerwowego, na który mogą wpływać drobnoustroje jest immunoregulacja, która obejmuje uszkodzony antygen, produkcję cytokin i limfocytów oraz różnicowanie pewnych typów komórek T w tkance limfatycznej, połączonej z jelitami (Chu i in., 2018). Mikroorganizmy jelitowe mogą uwalniać metabolity (lipopolisacharyd, peptydoglikan) i krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA). Metabolizm zaangażowany jest w aktywację komórek mikrogleju i przepuszczalność bariery krew-mózg (Strandwitz, 2018).

Medycyna alternatywna, w tym homeopatia, kojarzy się głównie z konwencjonalnymi formami terapii, a jej działanie jako środek w złagodzeniu objawów ogólnych takich jak: ból, spastyczność, problemy z nadwrażliwością, upośledzenie chodzenia, zmęczenie, utrata pamięci. Spośród wszystkich pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, do 30% stosuje lub stosowało różne metody medycyny komplementarnej i alternatywnej (Kim i in., 2018). Szacuje się, że u 70–80% pacjentów z SM nastąpiła poprawa ich ogólnego stanu (Olsen, 2009). Jedną z głównych zasad homeopatii „niech podobne będzie leczone podobnym”, opiera się na założeniu, że chorobę można leczyć substancją, wywołującą te same objawy patologiczne u zdrowej osoby (Fisher i Ernst, 2015). Środki homeopatyczne są wielokrotnie *cf vgv* rozcieńczonymi substancjami naturalnymi (Manzalini i Galeazzi, 2019), co więcej- uważa się, że im bardziej rozcieńczony zostanie roztwór tym większa jest jego moc (Chikramane i in., 2010). Wybór potencji jest powiązany z poziomem zdrowia: pacjentom na niższym poziomie zdrowia implikuje się niższe potencje, jak np. 30CH- przez dłuższy okres czasu, (do 3 miesięcy), podczas gdy kuracja 200 CH jest ograniczona do kilku dni. Są one przepisywane indywidualnie dla każdego przypadku, z uwzględnieniem innych aspektów poza specyficznymi objawami medycznymi, jak również szczególnymi objawami psychicznymi, a także istotnymi nawykami pacjenta (Whitmarsh, 2003). Niektóre objawy SM są często łagodzone przez poszczególne remedia: np. *Causticum* przepisuje się na dysfunkcję układu moczowego, *Phosphorus*

na zapalenie nerwu wzrokowego, Cuprum metallicum i Nux vomica na skurcze, Secale na objawy czuciowe (Whitmarsh, 2003).

Jak przedstawiono w dalszej części tego manuskryptu, liczne badania wykazały, że pacjenci ze stwardnieniem rozsianym mają odrębną mikroflorę w porównaniu z grupą kontrolną.

Zaobserwowano, że leczenie stwardnienia rozsianego może modyfikować mikrobiom jelitowy, jednak nie wzięto tu pod uwagę wyłącznie działania homeopatii.

Celem owego badania było sprawdzenie, czy mikroflora jelitowa pacjentów ze stwardnieniem rozsianym zmienia się pod wpływem leków immunomodulujących lub uzupełniającego leczenia homeopatycznego, oraz ocena różnic w taksonomii i różnorodności drobnoustrojów pomiędzy pacjentami z SM a grupą kontrolną.

2. Materiały i metody

2.1. Przedmioty

Badanie miało charakter prospektywny, analityczny, obserwacyjny oraz kontrolny. Obejmowało ono 50 pacjentów ze zdiagnozowanym SM, z Oddziału Neurologii Szpitala Ratunkowego Cluj-Napoca, od stycznia 2019 do maja 2020. Zrekrutowano 21 chętnych do grupy kontrolnej.

Uzyskano autoryzację etyczną (nr 2394/28.01.2020, Emergency Hospital Cluj-Napoca) i każdy członek badania podpisał stosowną zgodę.

Grupa ze stwardnieniem rozsianym obejmowała dorosłych pacjentów z potwierdzonym rzutowo-remisyjnym stwardnieniem rozsianym (RRMS) lub klinicznie izolowanym zespołem (CIS), zgodnie z kryteriami diagnozy McDonalda (Thompson i in., 2018), z wynikiem EDSS z maksymalnie 5 punktami, którzy nie przeszli terapii modyfikującej (DMT) na rok przed włączeniem do badania.

Wykluczaliśmy chorych na postępujące SM, z niejasnymi kryteriami diagnostycznymi, aktywnymi patologiami żołądkowo-jelitowymi, pacjentki ciężarne, karmiące piersią oraz pacjentów po długotrwałym leczeniu probiotykami, lekami przeciwwirusowymi, antybiotykami,

niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi czy inhibitorami pompy protonowej- w przeciągu

ostatnich 6 miesięcy. Spośród wszystkich pacjentów 7 zetknęło się w przeszłości z przemijającymi

łagodnymi patologiami żołądka, ale bez aktywnych objawów żołądkowo-jelitowych, 4 pacjentów

miało w historii choroby operacje jamy brzusznej a 4 pacjentów cierpiało na patologie

endokrynologiczne (głównie związane z tarczycą). Inne patologie (nadciśnienie, cukrzyca)

występowały w pojedynczych przypadkach. Grupa kontrolna składała się ze zdrowych osób bez

SM, dobranych pod względem wieku i płci z pacjentami ze stwardnieniem rozsianym, u których nie zdiagnozowano żadnej patologii, oraz bez wdrożonego jakiegokolwiek przewlekłego leczenia.

Wszyscy badani zadeklarowali brak istotnych zmian, występujących w ich diecie lub stylu życia podczas badania.

Na początku badania każdy badany dostarczył próbkę fekaliiów. Po pierwszym badaniu próbki, przepisano i zastosowano u nich formę leczenia, zależną od kilku czynników, takich jak stopień zaawansowania choroby, choroby współistniejące, przyjmowane leki, ich bezpieczeństwo i dostępność oraz oczywiście potrzebna była zgoda pacjentów (Chikramane i in., 2010). Niektórzy z badanych odmówili terapii konwencjonalnej, zaakceptowali jednak leczenie homeopatyczne. Drugą próbkę fekaliiów pobrano 2 miesiące po wdrożeniu leczenia.

Jeśli chodzi o formę leczenia homeopatycznego, każdy pacjent otrzymał inny lek, indywidualnie dobrany do objawów, prezentowanych przez ich chorobę oraz ich stan psychiczny. Wśród zastosowanych leków były: Phosphor, Lycopodium, Natrum muriaticum, Lac Caninum, Nux Vomica, Lachesis, Acidum Nitricum, Rhus Toxicodendron, Tarentula Hispanica, Pulsatilla, Calcarea Carbonica, Sulphur, Ignatia, Aconitum lub Causticum. Substancje zostały przepisane przez neurologa, dyplomowanego w dziedzinie homeopatii i były przyjmowane codziennie, 7 granulek podjęzykowo, przez 3 kolejne dni dla pacjentów- o potencji 200CH i od 1 do 3 miesięcy dla pacjentów o potencji 30CH. Nasi pacjenci z SM zostali podzieleni na osobne grupy, jak to przedstawiono w tabeli 1. Grupa G-DMT otrzymała leczenie modyfikujące chorobę: domięśniowy interferon beta 1a, 30 µg / 0,5 ml- raz w tygodniu (podgrupa G-IFN) lub doustnie teryflunomid w dawce 14 mg na dobę (podgrupa G-TER). Grupa G-DMT + HOM otrzymała połączone DMT z homeopatią: G-IFN + HOM interferon beta1a i homeopatia, GTER + HOM teriflunomid i homeopatia. Grupa G-HOM składała się z pacjentów, poddanych leczeniu homeopatycznemu. Grupa kontrolna, G-HC, została utworzona z HC, nie poddano jej leczeniu.

Tabela 1

Grupa	Liczba badanych	Podgrupa	Liczba badanych
G-DMT (DTM)	20	G-IFN (interferon beta1a)	10
		G-TER (teriflunomid)	10
G2-DTM+hom	19	G-INF+hom (interferon beta1a +hom)	9
		G-TER+hom (teriflunomid + hom)	10
G-HOM	11		
G-HC (HC)	21		
G-MS (wszyscy pacjenci SM)	50		

2.2. Kolekcja próbek

Wszyscy badani dostarczyli próbki kału wedle instrukcji otrzymanych z laboratorium: o dowolnej porze dnia, bez ograniczeń, przy użyciu specjalnych pojemników na kał. Dostarczone próbki były przechowywane w temperaturze minus 20 stopni stopni Celsjusza, a następnie wysłane do laboratorium w celu ekstrakcji DNA. Każdy pacjent zebrał dwie próbki kału: jedną przed leczeniem (próbka 1, S1) i jeden dwa miesiące po rozpoczęciu terapii lub badania.

2.3. Sekwencjonowanie 16rRNA i analiza statystyczna

Analiza metagenomiczna powszechnie występującej podjednostki 16S genu rybosomalnego RNA (rRNA)- wykorzystywała specyficzne regiony hiperzmiennie (V1-V3, V3-V4, ITS1&ITS2) na platformie Illumina MiSeq. Wyniki to OTU (operacyjne jednostki taksonomiczne), mikroorganizmy, które mają podobieństwo DNA co najmniej 97% do laboratoryjnej bazy danych, sklasyfikowane w określone taksony, wraz z ich częstotliwością i względną obfitością.

Różnorodność mikroflory jelitowej jest matematyczną miarą zmienności, charakteryzuje się bogactwem (liczbą różnych gatunków) i wyrównaniem (jednorodność różnych gatunków).

Różnorodność alfa- jest estymatorem bogactwa gatunkowego.

Shannon i Simpson to parametry zarówno nasycenia, jak i równości, ich wartości rosną wraz z liczbą gatunków i bardziej równomiernym rozmieszczeniem (Kim et al., 2017).

Wykorzystując macierze częstości, każdą kombinację par analizowano stosując test sumy rang Wilcoxon. Dla różnorodności beta, różnorodności między próbkami, użyliśmy Bray-Curtis i Jaccard- indeksów, w których graficzna odległość między nimi wskazuje na różnicę. Analizę głównych współrzędnych (PCoA) uzyskano z macierzy względnej obfitości. Wielkość efektu liniowej analizy dyskryminacyjnej liczby (LEfSe) wykorzystują macierze względnej obfitości do obliczenia różnicy obfitości organizmów między MS a HC, z wartością alfa 0,05 oraz próg wyniku logarytmicznej liniowej analizy dyskryminacyjnej (LDA) równy 2.0.

Wszystkie funkcje mają ocenę niższą niż -2,0 lub większą niż 2,0. Bakterie wzbogacone dla pacjentów z SM są reprezentowane na czerwono, podczas gdy te bardziej bogate u grupy kontrolnej- są zabarwione na zielono. We względnej obfitości ułożone są w słupki, każdy słupek reprezentuje średnią względną obfitość.

25 najlepszych gatunków, wybrano według najliczniejszych w stosunku do obu grup.

Wygenerowano również heatmapy.

3. Wyniki

Grupa SM składała się z 31 kobiet i 19 mężczyzn, ze średnią wieku $30 \pm 9,9$ lat, u 44 z nich zdiagnozowano RRMS, a u 6- CIS, średni wynik w rozszerzonej skali niepełnosprawności (EDSS) wynoszący 1,8 punktów i średni czas trwania choroby 3,4 roku. Wszystkie specyficzne dla MS cechy przedstawiono w tabeli 2. Większość z nich była dość prosta (bez wcześniejszego leczenia modyfikującego przebieg choroby (DMT)), tylko 4 pacjentów otrzymało leczenie, które zostało przerwane w poprzednim roku. Zdrową grupę kontrolną (HC) zebrano biorąc pod uwagę ludzi o podobnych cechach demograficznych jak w grupie SM: 62% kobiet i 38% mężczyzn, średnia wieku $28 \pm 9,7$ lat.

Tabela 2

Stwardnienie rozsiane- specyficzna charakterystyka grupy poddanej badaniu

Charakterystyka	Pacjenci SM
Typ SM (%)	
RRMS	44 (88%)
CIS	6 (12%)
EDSS wynik	1,8 (0-5)
Potwierdzony czas trwania choroby, SD, Y	3,4 (6,2)
Liczba nawrotów, SD	2,5 (213)
MMSE wynik	29,4
Leczenie, n (%)	
Teriflunomid	10 (14,28%)
Interferon beta 1a	10 (14,28%)
Teriflunomid + homeopatia	10 (14,28%)
Interferon beta 1a + homeopatia	9 (12,8%)
Homeopatia	11 (15,7)

Wyjaśnienie: SM- stwardnienie rozsiane, n- liczba pacjentów, odchylenie standardowe, y- lata, RRMS- nawroty, remisje SM, CIS- zespół klinicznie wyizolowany, EDSS- skala statusu niepełnosprawności, MMSE- badanie stanu psychicznego

3.1. Różnorodność mikrobiomu

Zbadaliśmy ogólne różnice w składzie drobnoustrojów za pomocą różnorodności alfa i beta. Nie było statystycznie istotnej różnicy w różnorodności alfa między pacjentami ze stwardnieniem rozsianym a grupą kontrolną- przed ($p = 0,85$) i po leczeniu ($p = 0,95$). Poza tym nie było różnicy pomiędzy innymi kombinacjami grup dla próbki 2 (S2): G-DMT vs G-DMT + HOM ($p = 0,89$), G-DMT + DOM vs G-HOM ($p = 0,98$), G-DMT vs G-HOM ($p = 0,64$) i ich podgrupy, G= IFN + HOM vs G-TER + HOM ($p = 0,23$), G-IFN vs G-IFN + HOM ($p = 0,06$) między próbką 1 (S1) a S2 dla pacjentów ze stwardnieniem ($p = 0,93$), G-DMT + HOM ($p = 0,38$) lub G-HOM ($p = 0,79$).

Ponadto, nie było żadnej różnicy w różnorodności alfa między pacjentami z SM leczonych DMT (G-DMT w połączeniu z G-DMT + HOM) i pacjentami, nie przestrzegającymi zasad leczenia DMT (G-HOM), $p = 0,81$. Wszystkie wartości przedstawiono w tabeli 3. Kiedy analizowaliśmy różnorodność beta, istniała różnica między S2 G-HOM i G-TER + HOM ($p = 0,007$) (ryc. 1) oraz między G-HOM a G-IFN ($p = 0,012$), ale nie było statystycznie istotnej różnicy pomiędzy pacjentami ze stwardnieniem rozsianym a grupą kontrolną lub między dwiema próbkami, pochodzących od pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (wszystkie $p > 0,05$).

Inne wyniki przedstawiono w Tabeli 3 i Ryc. 1 * (* uzupełnienie plików danych).

Tabela 3

Przegląd wszystkich wartości w odniesieniu do różnorodności mikrobioty

PORÓWNANIE	Różnorodność Alpha		Różnorodność Beta		
	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)	$p = 0,98$	$P = 0,97$	$P = 0,87$	$p = 0,12$	$P = 0,2$

G-DMT vs G-HOM p =0.64 (S2)	P =0,8	p =1	p =0.15	P =0,13
G-DMT połączone z p = 0.81 hom.	P =0,91	p =0,91	p =0.19	P =0,2
G-DMT + HOM vs G-HOM (S2)				
G-IFN vs G-IFN + p = 0.06 HOM (S2)	p =1	P =0,84	p = 0.06	P =0,06
G-TER vs G-TER + p =0.13 HOM (S2)	P =0,68	P =0,68	P = 0.23	P =0,35
G-IFN + HOM vs G- p = 0.47 HOM (S2)	P =0,41	P =0,66	p = 0.06	P =0,06
G-TER + HOM vs G- p =0.55 HOM (S2)	P =0,39	P =0,47	P = 0.007	P =0.012
G-IFN vs G-HOM p = 0.2 (S2)	P =0,35	P =0,72	P = 0.012	P =0.016
G-TER vs G-HOM p = 0.62 (S2)	P =0,62	P =0,72	p = 0.62	P =0,33
G-IFN + HOM vs G- P = 0.23 TER + HOM (S2)	P =0,14	P =0,14	p = 0.06	P =0,11
S1vsS2 (G-MS) P = 0.93	P =0,26	P =0,36	p = 0.88	P =0,93
S1vsS2 (G-DMT + P = 0.38 HOM)	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 = 0.98	P =0,98
S1 vs S2 (G-IFN + P = 0.96 HOM)	P =0,86	P =0,8	P = 0.87	P =0,93
S1 vs S2 (G = TER + P = 0.24 HOM)	P =0,58	P =0,68	P = 0.96	P =0,98

3.2. Różnice taksonomiczne

Wyniki analizy 16S obejmują częstotliwość i względną obfitość gatunku. Dla grupy z SM zidentyfikowaliśmy 51 Operacyjnych Jednostek Taksonomicznych (OTU) na poziomie typu, z większością składającą się z Firmicutes (49,45%), Bacteroidetes (34,3%), Actinobacteria (4,77%) i Proteobacteria (3,6%). Na poziomie gatunku przeanalizowaliśmy 1505 OTU, z najwyższą względną liczebnością *Prevotella copri* (10,75%) i *Bacteroides* (10,3%), następnie *Faecalibacterium prausnitzii* (6,63%) i *Blautia* (4,49%).

Przeanalizowaliśmy różnice taksonomiczne między naszą kohortą MS (G-MS) i HC (G-HC) przed jakimkolwiek leczeniem (S1). Nieleczeni pacjenci ze stwardnieniem rozsianym prezentowali, w porównaniu z HC, zwiększoną względną obfitość *Lentisphaerae* gromada ($p = 0,005$), gatunek

Prevotella stercorea ($p = 0,02$) (Bacteroidetes gromada). Mieli obniżony poziom Actinobacteria phylum ($p = 0,01$), z jej gatunkami *Bifidobacterium* ($p = 0,01$) i *Bifidobacterium adolescentis* ($p = 0,007$), również obniżony poziom *Bacteroides coprophilus* ($p = 0,02$) (z rodzaju Bacteroidetes). Typ Firmicutes uległ zmniejszeniu; względna liczebność *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0,03$), *Lachno spiraceae* ($p = 0,01$), *Staphylococcus hominis* ($p = 0,02$) i *Staphylo coccus bacterium* ($p = 0,02$). Proteobacteria phylum również uległa zmniejszeniu- *Haemophilus* ($p = 0,04$) i *Escherichia coli* ($p = 0,04$). Pozostałe istotne statystycznie różnice przedstawiono na ryc. 2A, ryc. 2*-4*.

Kiedy przeanalizowaliśmy kolejne próbki, otrzymaliśmy wyniki po leczeniu stwardnienia rozsianego. Pacjenci w porównaniu z grupą kontrolną posiadali nieco odmienną mikrobiotę, ze zmniejszoną liczbą *Bifi dobacterium* ($p = 0,02$), *Ruminococcus* ($p = 0,04$) i *Clostridiales* ($p = 0,01$) i wyższą częstością *Gemella* ($p = 0,04$), *Megasphaerae* ($p = 0,02$) i *Prevotella stercorea* ($p = 0,02$) -rys. 2B, rys. 5*-7*.

Przeanalizowaliśmy próbki pacjentów po dwóch miesiącach leczenia. Podczas analizy mikrobiomu pacjentów z SM, którzy otrzymali DMT (G-DMT) w porównaniu z pacjentami poddawanyymi uzupełniającemu leczeniu homeopatycznym (G-DMT + HOM), zaobserwowaliśmy następujące wyniki: porównaniu do G-DMT + HOM, G-DMT wzbogaciła się względna liczebność *Catenibacterium* ($p = 0,02$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,02$), *Sharpea* ($p = 0,02$) i *Gammaproteobacteria* ($p = 0,02$) oraz obniżył poziom *Shuttleworthia* ($p = 0,04$), *Cytophaga* ($p = 0,03$). Cyjanobakterie ($p = 0,002$), *Catenibacterium* ($p = 0,01$), *Alloprevotella* ($p = 0,03$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,003$), *Clostridium* ($p = 0,01$), *Prevotella copri* ($p = 0,04$), *Prevotella stercorea* ($p = 0,03$) są bardziej obfite w podgrupie G-IFN w porównaniu z G-IFN + HOM.

Z drugiej strony G-IFN + HOM wykazuje wyższy poziom bakterii *Proteo* ($p = 0,02$), *Escherichia shigella* ($p = 0,01$), *Barnesiella* ($p = 0,03$), *Serratia* ($p = 0,008$), *Lactobacillus zeae* ($p = 0,02$). W grupie G-TER *Escherichia shigella* ($p = 0,007$), *Lactobacillus* ($p = 0,01$), *Enterobacter* ($p = 0,02$), *Enterococcus faecalis* ($p = 0,03$) występuje częściej niż w G-TER + HOM, podczas gdy G-TER + HOM wykazuje wyższe oznaki *Rickenellaceae* ($p = 0,01$) i *Lachnospiraceae* ($p = 0,02$). Porównaliśmy też obie grupy po leczeniu homeopatycznym, G-DMT + HOM i G-HOM.

Podkreśliliśmy, że G-DMT + HOM przedstawia wyższą względną obfitość dla *Megasphaera* ($p = 0,04$), *Eubacterium oxidoreducens* ($p = 0,02$), *Veil lonellaceae* ($p = 0,02$) i *Gardnerella* ($p = 0,02$), w porównaniu z G-HOM.

G-HOM został wzbogacony w *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0,01$), *Akker mansia muciniphila* ($p = 0,02$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,003$), *Bacteroides acidifaciens* ($p = 0,04$) i *pectinophilus* ($p = 0,03$), *Veilonella* ($p = 0,01$), w porównaniu do G-DMT + HOM (ryc. 8*-20*).

Kolejnym punktem zainteresowania naszych badań było wykazanie, w jakim czasie po wdrożeniu leczenia zaczęły zachodzić zmiany w mikrobiomie. Dla grupy pacjentów z SM zmiany taksonomiczne przedstawiono w Ryc. 3- uwzględniając 25 najliczniejszych organizmów. Istotnie statystycznie różnice między dwiema próbkami były bardziej rozpowszechnione w przypadku Firmicutes phylum, ponieważ zidentyfikowano obniżone poziomy Ruminococcus ($p = 0,03$), Oscillospira ($p = 0,0004$), Anaerotruncus ($p = 0,02$), Lachnoclostridium ($p = 0,01$), Lachnospiraceae ($p = 0,02$) i Eubacterium oxidoreducens ($p = 0,04$) u pacjentów z SM po leczeniu w porównaniu z próbką bazową. Pacjenci leczeni na stwardnienie rozsiane wykazywali bardziej zróżnicowane zmiany bakteryjne, ze wzrostem liczby Firmicutes phylum (Sulfobacillus $p = 0,02$, Enterococcus faecalis $p = 0,02$), Bacteroidetes (Hymenobacter $p = 0,04$), Proteobacteria ($p = 0,04$), Actinobacteria (Amicycolatopsis $p = 0,04$), Fusobacterium (Leptotrichiaceae $p = 0,04$)- zdj. 21*-25*.

Grupa G-DMT + HOM przedstawiła niższą względną obfitość w niektóre składniki Firmicutes (Oscillospira $p = 0,01$, Lachnoclostridium $p = 0,03$, Lachnospiraceae $p = 0,03$) i Proteobacteria (Helicobacteraceae $p = 0,01$, Undibacterium $p = 0,03$) - po leczeniu w porównaniu z wartością wyjściową.

U pacjentów stosujących wyłącznie leczenie homeopatyczne, zmniejszyła się grupa Eubacterium oxidoreducens ($p = 0,03$) (ryc. 25*-32*).

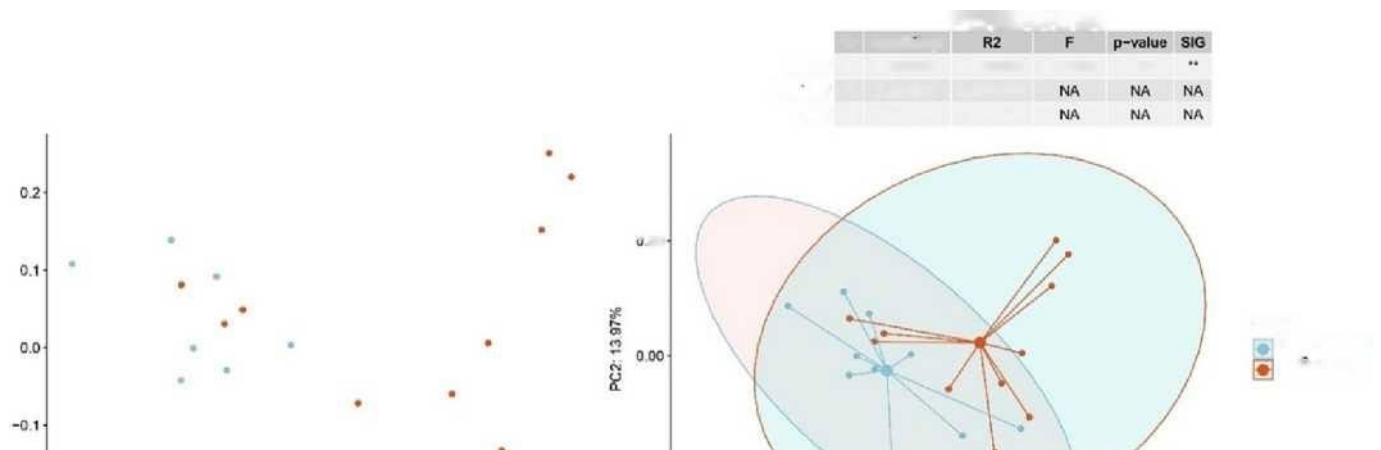
4. Dyskusja

Wyniki naszych badań nie wykazały istotnych zmian w różnorodności flory jelitowej pomiędzy pacjentami ze stwardnieniem rozsianym a grupą kontrolną- przed lub po jakimkolwiek leczeniu. W porównaniu z HC, nieleczeni pacjenci wykazywali wzrost Prevotella stercorea i obniżone poziomy w Actinobacteria i Faecalibacterium prausnitzii. Zmiany taksonomiczne po dwóch miesiącach leczenia były niewielkie, ze zwiększonym jedynie poziomem Gemella i zmniejszonym Ruminococcus, u pacjentów, cierpiących na stwardnienie rozsiane. Różnice pomiędzy danymi grupami po leczeniu polegały na modyfikacjach taksonomicznych. Na przykład pacjenci leczeni homeopatią wykazywali wzrost Faecalibacterium prausnitzii, Akkermansia muciniphila i Bacteroides (w porównaniu z terapią skojarzoną). Istnieją również znaczące wyniki dla różnorodności beta po leczeniu wyłącznie homeopatycznym w porównaniu z tymi, leczonymi homeopatią w połączeniu z teriflunomidem, a także homeopatią w porównaniu z interferonem beta1a.

Analizując, zmiany, które zaszły w trakcie badania pobranych próbek sprzed i po leczeniu, to spadek poziomu Ruminococcus, Lachnospiraceae i Eubacterium oxidoreducens wśród pacjentów leczonych z powodu SM. Homeopatia spowodowała z czasem redukcję Eubacterium oxidoreducens.

Panuje zgoda co do tego, że zdrowa flora jelitowa człowieka charakteryzuje się równowagą pomiędzy mikroorganizmami a żywicielem, dużą różnorodnością, odpornością i stabilnością, w celu utrzymania homeostazy żywiciela i funkcji odpornościowych (Freedman i in., 2018). Chociaż zewnętrzne czynniki mogą szybko modyfikować mikroflorę, to zdrowe, stabilne bakterie powracają do swojego pierwotnego stanu i zmieniają się tylko wraz z trwałymi nawykami. A wyższa różnorodność biologiczna oznacza większe różnice w gatunkach, a tym samym więcej funkcji biologicznych, które mogą pełnić, lepszą stabilność, zdolność do stawiania oporu do zmian i powrotu do zdrowia (Riccio i Rossano, 2018). Dysbioza odnosi się do braku równowagi w składzie bakteryjnym, ze wzrostem szkodliwych mikroorganizmów i zmniejszeniem się liczby pożytecznych gatunków wraz ze zmianą, idącą w kierunku stanu zapalnego (Freedman i in., 2018). W profilach mikroflory naszej kohorty ze stwardnieniem rozsianym zanotowano wzrost liczby Firmicutes i Actinobacteria oraz spadek liczby Bacteroidetes phylum. Te zmiany są specyficzne dla typowej zachodniej diety bogatej w tłuszcze i cukier, gdzie Firmicutes są bardziej zdolne do pozyskiwania energii z pożywienia, sprzyjając przybieraniu na wadze. Z kolei dieta oparta na węglowodanach złożonych, bogata w błonnik, sprzyja rozwojowi Bacteroidetes i na korzystnych metabolitach (Magne i in., 2020).

Terapie SM mogą modulować mikroflorę jelitową, ale nie ma na to dowodów, jak dotąd dobrze ugruntowanych w badaniach i przeprowadzonych na ludziach. Interferon beta hamuje limfocyty T i prozapalne cytokiny, stymuluje Treg i supresję B komórek, moduluje interakcję między drobnoustrojami a nabłonkiem komórki i stabilizuje barierę jelitową poprzez regulację ścisłego połączenia białka w komórkach śródbłonka. Teriflunomid hamuje dihydroorotan dehydrogenazy, syntezę pirymidyn i cytokin prozapalnych oraz może wpływać na mikrobiom jelitowy poprzez tłumienie sygnalizacji szlaku STAT-6, zwiększając specyficzne limfocyty T reg (Camara-Lemarroy i in., 2018; Baecher-Allan i in., 2018).



4.1. Porównanie pacjentów z SM oraz grupy kontrolnej

W naszym badaniu żaden ze wskaźników różnorodności alfa lub beta nie różnił się istotnie między pacjentami ze stwardnieniem rozsianym a grupą kontrolną przed rozpoczęciem leczenia. Sugeruje to, że mikroflora pacjentów z SM nie wykazuje oznak niezwykłych tendencji, korespondujących z badaniami literaturowymi (Mirza i in., 2020). Na poziomie taksonomii zaobserwowaliśmy kilka organizmów, które charakteryzowały się znacząco różną względną liczebnością. Actinobacteria jest pożytecznym mikroorganizmem, który odgrywa rolę w tworzeniu układu odpornościowego (Adamczyk Sowa i in., 2017) i występuje w mniejszym natężeniu wśród pacjentów z SM. Bifidobacterium również występuje w mniejszej ilości wśród naszych pacjentów. Literatura dostarcza sprzecznych danych, dotyczących roli mikrobioty w chorobach immunologicznych, ale większość badań wykazała, że Bifidobacterium indukuje przeciwwzapalną odpowiedź immunologiczną (Budh ram i in., 2017; Tankou i in., 2018). Rodzaj Prevotella jest bakterią dobrze zbadaną wśród pacjentów, cierpiących na SM, a biorą one udział w metabolizmie fitoestrogenów, ogólnie występują w mniejszej ilości u chorych na SM a już w większej u tych poddanych leczeniu (Chen i in., 2016; Brown i in., 2021). Nasi pacjenci z SM zaprezentowali większą liczebność pewnych bakterii niż grupa kontrolna, zarówno przed jak i po badaniu, a była to Prevotella stercorea; brak jest odpowiednich danych, dotyczących rodzaju Prevotella. Jest to prawdopodobne ze względu na fakt, że ten rodzaj ma kilka gatunków, pełniących różne funkcje (Mirza i in., 2020).

Niektóre metabolity bakteryjne mogą bezpośrednio wpływać na ośrodkowy układ nerwowy układu odpornościowego, takich jak krótko-łańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), które pełnią funkcję immunosupresyjną w błonie śluzowej jelit. Faecalibacterium prausnitzii i Bacteroides coprophilus uczestniczą w metabolizmie SCFA (Freedman i in., 2018). Bacteroides jest korzystną bakterią promującą IL-10 i jest ogólnie obecne wśród pacjentów SM w mniej zaawansowanym stadium. Faecalibacterium prausnitzii jest ustalony jako marker zdrowej mikroflory i jest zubożony wśród chorych na SM, co można zaobserwować w piśmiennictwie (Tremlett i wsp., 2016), a także w naszej grupie pacjentów. Wszystkie te różnice w taksonomii bakterii, porównane z grupą kontrolną, sugerują dysbiozę mikroflory w chorobie stwardnienia rozsianego.

4.2. Porównanie grup po leczeniu

Kiedy sprawdzaliśmy, czy leczenie (dowolnego rodzaju choroby), znacząco modyfikuje mikrobiom, podkreśliliśmy, że nie ma większych zmian w różnorodności alfa lub beta u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym w porównaniu z grupą kontrolną (u badanych, poddanych jakiegokolwiek wprowadzonej przez nas terapii. Jeśli chodzi o zmiany w taksonomii, Ruminococcus jest pożyteczną bakterią i zwykle jest przywracany u pacjentów SM w przypadkach po DMT (Zhu i in., 2020), nasze dane ukazują niższą jej liczebność wśród pacjentów ze stwardnieniem rozsianym w porównaniu z grupą kontrolną (dotyczy drugiej pobranej od pacjentów próbki), Clostridium jest bakterią produkującą maślan, biorącą udział w produkcji regulatorowych limfocytów T i cytokin przeciwzapalnych IL-10 (Miyake i in., 2015) i jej liczebność wśród pacjentów z SM zmniejszyła się po leczeniu.

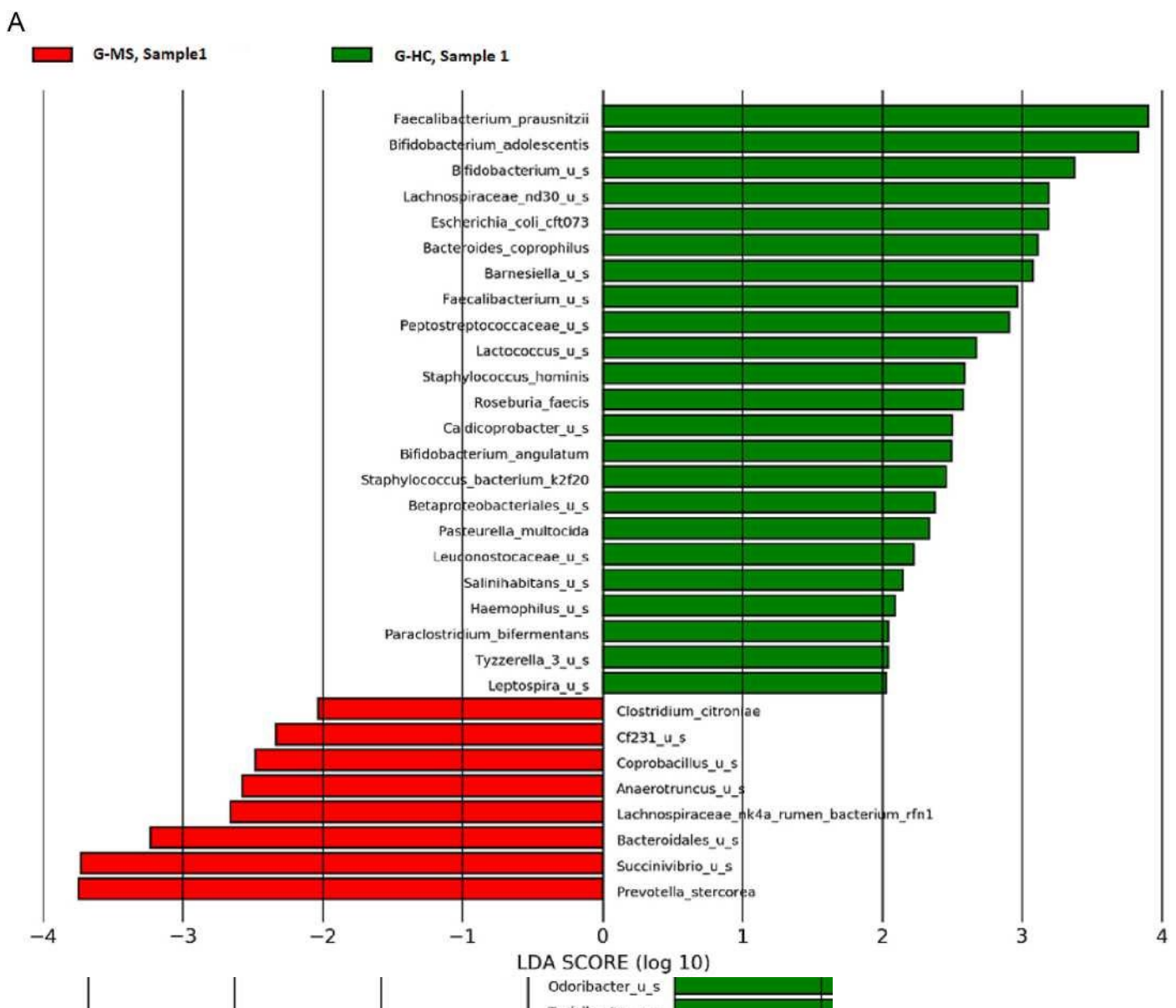
Zarys różnic między grupami po dwóch miesiącach terapii, w przypadku możliwej interwencji czynników zakłócających: DMT lub leczenie homeopatyczne i ich wpływ na mikrobiom jelitowy. Homeopatia może mieć wpływ na mikroflorę jelitową człowieka, jak sugerują nasze dane. Zmiany między pacjentami, którzy otrzymali jakąkolwiek formę DMT (G-DMT) oraz kombinację DMT i homeopatii (G-DMT + HOM) są subtelne, ale zauważamy ich dużą liczbę, min. znaczących różnic, dotyczących względnej obfitości bakterii między podgrupami, ze zmianami częściowo niespójnymi i sprzecznymi. Kombinacja G-IFN i G-IFN + HOM przedstawia możliwy wpływ homeopatii na mikrobiom pacjentów, leczonych interferonem beta1a, podczas gdy G-TER i Para G-TER + HOM sugeruje jej wpływ na pacjentów leczonych teriflunomidem.

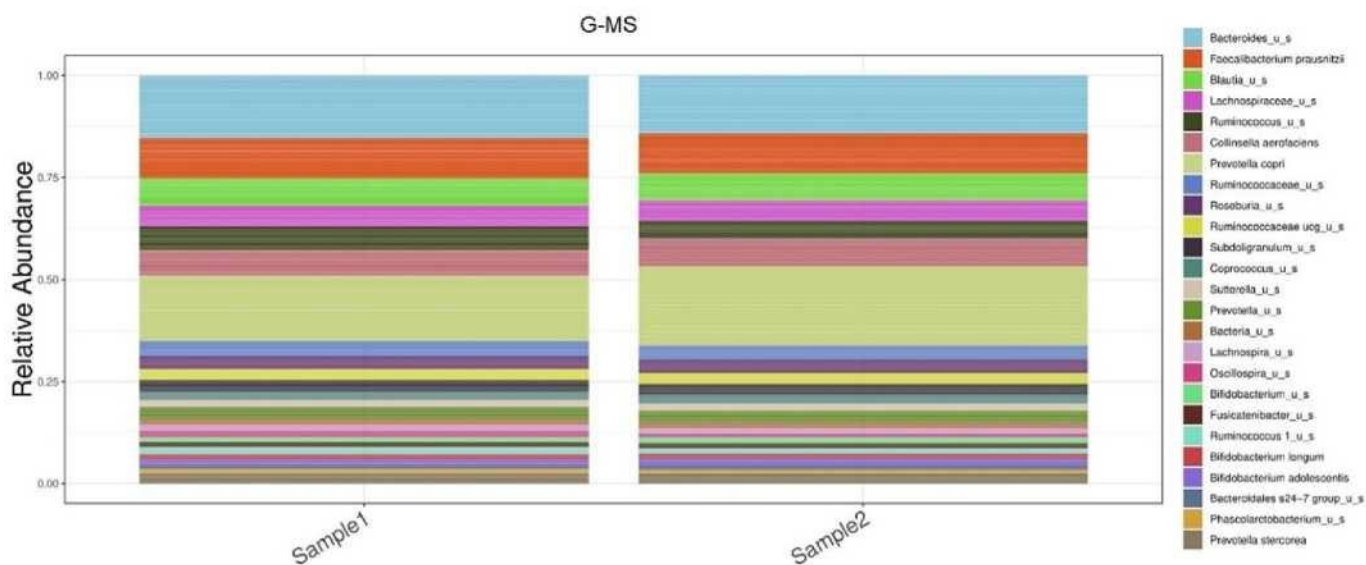
W porównaniu z terapią skojarzoną, pacjenci otrzymujący homeopatię zaprezentowali kontrowersyjny wzrost Akkermansia muciniphila, gatunków o nieznanym wpływie na dojrzewanie immunologiczne, podwyższonych wśród nieleczonych pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (Cekanaviciute i in., 2017). Eksperymenty in vitro opisują jego prozapalną rolę, ale badania in vivo nie potwierdziły tych efektów- wręcz przeciwnie, może mieć korzystną funkcję na niektóre zaburzenia metaboliczne. Chociaż wybór terapeutyczny nie wpływa na różnorodność alfa dla dowolnej grupy, znaleźliśmy pojedyncze różnice w różnorodności beta, podobnie jak w naszych badaniach literaturowych (Mirza i in., 2020). Nasze odkrycia dotyczyły homeopatii i interferonu beta1a, jako środków, które mogą modyfikować różnorodność mikrobiomu. W kwestii różnorodności beta- grupa, która otrzymała leczenie homeopatyczne, była inna niż grupa leczona kombinacją homeopatii i teriflunomidu. Ponadto grupa leczona homeopatią miała inną różnorodność beta niż grupa leczona interferonem beta1A, wszystkie wartości przedstawiono w Tabeli 3.

Przy nieistotnej statystycznie wartości p równej 0,06, bliskiej 0,05, grupa leczona interferonem odniosła niewielką zmianę w różnorodności beta w porównaniu z grupą interferonu i homeopatii. Te wyniki sugerują, że homeopatia może odgrywać rolę w beta-różnorodności u pacjentów ze ztwardnieniem rozsianym, ale wymagane są dalsze badania.

Analizując względną liczebność wybranych typów i gatunków, my zauważyliśmy spadek Firmicutes dla grupy otrzymującej kombinację terapii w porównaniu z innymi grupami, ale nieistotnie statystycznie. Firmicuty są związane z dłuższym czasem nawrotu w SM (Sand i Baranzini, 2018), więc połączenie tych dwóch terapii może być korzystne, opóźniając postęp choroby.

Dwie pożyteczne bakterie zaangażowane w metabolizm SCFA, *Bacteroides* i *Faecalibacterium prausnitzii* mają podobną względną obfitość dla grupy kontrolnej i homeopatii, około 12% dla *Bacteroides* i odpowiednio 7% dla *Faecalibacterium*. To sugeruje, że leczenie homeopatyczne może odgrywać rolę w utrzymaniu równowagi tych korzystnych dla zdrowia mikroorganizmów.





4.3. Porównanie pobranych próbek (przed i po leczeniu)

Pacjenci ze stwardnieniem rozsianym prezentowali bardziej zróżnicowane zmiany w mikrobiomie, co sugeruje, że leczenie może mieć pozytywny wpływ na bakterie jelitowe. Po leczeniu, tak jak zresztą oczekiwano, wykazano u nich mniejszą względną liczebność Lachnospiraceae, Ruminococcus oraz Eubacterium oxidoreducens (Mirza i in., 2020).

Lachnospiraceae bierze udział w zmniejszeniu przepuszczalności błony śluzowej poprzez produkcję SCFA i zwiększonej ekspresji białek (Rin Ninella i in., 2019). W przypadku dwóch grup, w tym pacjentów, poddanych leczeniu homeopatycznym, G-DMT + HOM i G HOM, bakterie bardziej rozpowszechnione przed leczeniem zostały ograniczone po zakończeniu terapii. Sugeruje to, że leczenie homeopatyczne lub jego połączenie z DMT miało wpływ na mikroflorę jelitową już po dwóch miesiącach leczenia.

Nasi pacjenci, którzy zostali poddani wyłącznie leczeniu homeopatycznemu, wykazywali względną stabilność po 2 miesiącach terapii, z jedyną statystycznie istotną modyfikacją *Eubacterium oxidoreducens*, której to ilość uległa zmniejszeniu po 2 miesiącach leczenia. Również w grupie leczonej terapiami łączonymi było kilka gatunków bakterii, których było znacznie mniej w drugiej próbie. Wyniki te sugerują, iż pacjenci, leczeni homeopatycznie mogą mieć bardziej stabilny mikrobiom.

4.4. Plusy i minusy terapii

Nasze badanie ma wkład w tę dziedzinę medycyny, ponieważ analizuje skład mikrobioty w jelitach, porównując nie tylko ekspozycję na leczenie, ale także zmiany zachodzące w trakcie całego procesu.

Jako możliwe czynniki ograniczające wymieniono wszystkie związki środowiskowe i dietetyczne, które mogą ingerować i modyfikować mikroflorę w ciągu tych dwóch miesięcy, których niestety nie można wykluczyć. Istnieje potrzeba przeprowadzenia dalszych badań.

5. Wnioski

Mikrobiota SM charakteryzuje się dysbiozą jelitową, z różną klasyfikacją zmian w stosunku do grupy kontrolnej. U nieleczonych pacjentów stwardnienia rozsianego znajdujemy dużą ilość *Prevotella stercorea* i redukcję *Actinobacteria*, *Bifidobacterium* i *Faecalibacterium prauznitzii*. Leczenie interferonem beta 1a, teriflunomidem lub homeopatią zainicjowało kilka zmian w systematologii. Pacjenci ze stwardnieniem rozsianym posiadali inny skład mikrobioty niż wolontariusze z grupy kontrolnej- ze zredukowanymi *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* oraz *Clostridiales* i z przewagą *Gemella*, *Megasphaera* i *Prevotella stercorea*. Porównując pierwszą i drugą z pobranych próbek, odkryto modyfikację w mikrobiocie pacjentów z SM, min. mniejszą ilość *Lachnospiraceae* oraz *Ruminococcus* oraz większą ilość *Enterococcus faecalis*. Te dynamiczne zmiany mogły być spowodowane leczeniem stwardnienia rozsianego. Ogólnie rzecz ujmując, poddanie pacjentów z SM leczeniu miało niewielki wpływ na różnorodność mikrobiomu.

Jedyne istotne modyfikacje różnorodności, jakie odnotowano, inicjowały wpływ leczenia homeopatycznego na wskaźniki beta różnorodności, w porównaniu z wpływem leków immunomodulujących. *Eubacterium oxidoreducens* również uległo redukcji po leczeniu homeopatycznym. Nasze wyniki sugerują, że leczenie homeopatyczne ma również wpływ na

mikroflorę jelitową. To badanie przedstawia ważną rolę mikroflory jelitowej w SM i odkrywa dalsze obszary, które należy zbadać. Mikrobiom to rozległy ekosystem, na który wpływa wiele czynników, których nie można w pełni określić ilościowo. Nasz projekt koncentrował się na dynamicznych zmianach mikroflory i możliwym wpływie niektórych specyficznych DMT, a także homeopatii jako medycynie komplementarnej i alternatywnej stosowanej w praktyce klinicznej.

Fundusze- te fundusze nie otrzymały środków z zewnątrz.

Aprobata etyczna- Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z zasadami Deklaracji helsińskiej oraz zatwierdzona przez Komitet etyczny Szpitala Cluj Emergency County Hospital, kod 2394/28.01.2020

Zgodę na przeprowadzenie badania uzyskano od wszystkich członków, zaangażowanych i poddanych badaniu.