

Въздействие на терапиите за множествена склероза върху динамичното равновесие на човешката чревна микробиота

Витали Вакарас^{a,b}, Дафин Ф. Мурешану^{a,b}, Анка-Дана Бузоану^c, Кристина Нистор^{a,b,*}, Стефан Кристиан Веса^c, Андреа-Кристина Параскив^b, Даниела Ботош-Вакарас^d, Кристиана Вакарас^e, Джордж Витулкас^f

^a Департамент по неврология, Общинска спешна болница в Клуж, 400012 Клуж-Напока, Румъния

^b Департамент по невронауки, Медицински Факултет, Университет за медицина и фармация "Юли Хатиегану", 400012 Клуж-Напока, Румъния

^c Департамент по фармакология, токсикология и кл. фармакология, Медицински Факултет, Университет за медицина и фармация "Юли Хатиегану", 400012 Клуж-Напока, Румъния

^d Департамент по вътрешна медицина, Медицински Факултет, Университет за медицина и фармация "Юли Хатиегану", 400012 Клуж-Напока, Румъния

^e Медицински Факултет, Университет за медицина и фармация "Юли Хатиегану", 400012 Клуж-Напока, Румъния

^f Егейски университет, Митлен, Гърция

ИНФОРМАЦИЯ

Ключови думи:

Множествена склероза
Чревна микробиота
Дисбиоза
Болест модифицираща терапия
Микробиом

АБСТРАКТ

Чревната микробиота, всички микроорганизми в нашия стомашно-чревен тракт, може да има въздействие върху протичането на множествената склероза (МС), демиелинизиращо неврологично заболяване. Нашето проучване включва 50 пациенти с МС и 21 здрави контроли (ЗК). Двадесет пациенти са получиха модифицираща болестта терапия (МБТ) като интерферон бета1а или терифлуномид, 19 - МБТ в комбинация с хомеопатия и 11 пациенти приемаха хомеопатия. Събрахме общо 142 чревни проби, по две за всеки пациент: при включването в проучването и осем седмици след лечението. Сравнихме микробиома на пациенти с МС със здрави контроли. Анализирахме неговата промяна във времето и ефекта на интерферон бета1а, терифлуномид и хомеопатията. Не се установи разлика в средното видово разнообразие, имаше само два случая на промяна във видовия състав при лечение с хомеопатия. В сравнение със здравите контроли (ЗК), нелекуваните пациенти с МС имаха намаление на *Actinobacteria*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prauznitzii* и повишено количество на *Prevotella stercorea*, докато лекуваните пациенти имаха понижени *Ruminococcus* и *Clostridium*. В сравнение с първоначалната проба при лекуваните пациенти с МС има намаление на *Lachnospiraceae* и *Ruminococcus* и увеличено количество на *Enterococcus faecalis*. След хомеопатично лечение се установи намаление на *Eubacterium oxidoreducens*. Проучването показва, че може да има дисбиоза при пациенти с МС. Лечението с интерферон бета1а, терифлуномид или хомеопатия води до редица таксономични промени. БМТ и хомеопатията могат да окажат влияние върху чревната микробиота.

1. Увод

Човешката чревна микробиота е съставена от изключително разнообразни микроорганизми, обитаващи нашия стомашно-чревен тракт и е таксономично класифицирана във видове, родове и типове, съдържащи както полезни, така и патогенни микроби (Rinninella et al., 2019; Samara-Lemargoy et al., 2018). Оформя се основно в ранна детска възраст в зависимост от няколко фактора като начин на раждане, хранене с мляко, отбиване и прием на лекарства. След първите три години от живота съставът на микробиотата достига частична стабилност с постоянни фини промени под въздействието на външни фактори: диета, упражнения, индекс на телесна маса, околна среда и лекарства (Rinninella et al., 2019). Микробиомът се формира от гените, протеините и метаболитите на всички организми (Maglione et al., 2021).

Множествената склероза (МС) е аутоимунно заболяване на

централната нервна система, с определена наследствена предизпозиция и участие на фактори на средата. Наблюдава се нарушена цялост на кръвно-мозъчната бариера, възпаление, демиелинизация, загуба на олигодендроцити, глиоза и аксонална дегенерация. Заболяването се протича в три основни стадия, предклиничен стадий, при който комбинацията от наследственост и фактори на околната среда може отключи заболяването, възпалителен стадий, при който има епизоди на неврологична дисфункция, като оптичен неврит, засягане на пирамидния път, увреждане на малкия мозък или на мозъчния ствол, сензорни симптоми, нарушена функция на пикочния мехур и краен невродегенеративен стадий на прогресия на заболяването с прогресиращо увреждане, най-вече на походката на пациента. Заболяването има различни клинични форми: клинично изолиран синдром (КИС), пристъпно-ремитентна МС (ПРМС), вторично прогресираща МС (ВПМС) и първично прогресираща МС (ППМС).

*Автор за връзка: Департамент по неврология, Общинска спешна болница в Клуж, 400012 Клуж-Напока, Румъния.

Електронна поща: cristinapinzaru@yahoo.com (К. Нистор).

2. Материали и методи

Модифицируемите рискови фактори, свързани с МС, са внимателно анализирани, за да се намери тяхната специфична роля в патологичния процес, включително и състава на микробиома (Baecher-Allan et al., 2018). Последните проучвания показват, че пациентите с МС имат различен състав на микробиома в сравнение със здравите контроли (ЗК) (Mirza et al., 2020)

Поради факта, че микробиомът е уникален за всеки индивид и съдържа огромно разнообразие от микроорганизми, е трудно да се опише микробиота при здрав човек (Rinninella et al., 2019). Микробиотата при здрави хора участва в редица основни функции, включително чревна пропускливост и моталитет, синтез на витамини, чревната абсорбция, но също така и в развитието на врождения имунен отговор (Chu et al., 2018). Като вземат под внимание ролята им в имуномодулацията, последните проучвания показват възможна връзка между микробиома и някои имуномедирирани неврологични патологии (Mirza et al., 2020).

Концепцията за чревна микробиота-мозъчна ос може да се отнесе към различни комуникационни механизми между стомашно-чревната и нервната система (Strandwitz, 2018). Микробиотата може да повлияе на централната нервна система (ЦНС) по различни пътища. На първо място микробиотата се свързва с мозъчните мрежи като модулира различни невротрансмитери (като гама аминокиселина, серотонин, допамин, хистамин, както и със симпатиковия и парасимпатиковия дял на автономната нервна система и специално вагусовия нерв. На второ място участва в ендокринни вериги при състояние на стрес. Кортикоидите, които се отделят от хипоталамо-хипофизно-надбъбречната ос, могат да променят състава на микробиотата и да увеличат чревната пропускливост. Друг механизъм, чрез който микробите могат да оказват въздействие върху нервната система, е имунорегулацията. В това се включва нарушено представяне на антигени, производство на цитокини и лимфоцити, диференциране на различни видове Т клетки в свързаната с червата лимфоидна тъкан (GALT) (Chu et al., 2018). Чревните микроорганизми могат да отделят метаболити (липополизахариди, пептидогликани), а обмяната на късоверижните мастни киселини (SCFAs) участва в активирането на микроглияните клетки и нарушената пропускливост на кръвно-мозъчната бариера (Strandwitz, 2018).

Комплементарната и алтернативна медицина, включително и хомеопатията, най-често се комбинира с конвенционалните форми на терапия за облекчаване на най-честите симптоми, болка, повишена спастичност, нарушена сетивност, нарушена походка, умора, загуба на паметта. От всички пациенти с МС, до 30% използват или са използвали метод на комплементарна и алтернативна медицина (Kim et al., 2018). Установено е, че 70–80% от пациентите с МС показват подобрение в общото си състояние (Olsen, 2009). Принципът на хомеопатията „Подобно се лекува с подобно“ се основава на идеята, че дадено заболяване може да се лекува с вещества, които предизвикват същите патологични симптоми при здрави индивиди (Fisher and Ernst, 2015). Хомеопатичните лекарства са силно разреждени вещества от естествен произход (Manzalani and Galeazzi, 2019), по-разреденият разтвор се счита за по-силно действащ (Chikramane et al., 2010). Изборът на потенция е свързан с нивото на здраве: по-ниско ниво на здраве предполага ниска потенция като 30СН за по-дълъг период от време, до 3 месеца, докато лечението с 200СН е ограничено за няколко дни. Те се предписват за всеки отделен случай, както разглеждат и други аспекти освен симптомите на заболяването, както конкретни психологически подробности или ежедневни навици на пациента (Whitmarsh, 2003). Хомеопатични лекарства облекчават някои от симптомите при МС: Causticum при затруднено уриниране, Phosphorus при оптичен неврит, Cuprum metallicum и Nux vomica при спастични състояния, Secale при нарушена сетивност (Whitmarsh, 2003).

Както е представено по-нататък в този ръкопис, множество проучвания показват, че пациентите с МС имат различна микробиота в сравнение с ЗК. Наблюдавано е как лечението на МС може да промени чревния микробиом, но не е проучван ефекта на хомеопатията в тази област.

2. Целите на това изследване са да се проучи дали чревната микробиота се променя при лечението с имуномодулираща лекарства или комплементарно хомеопатично лечение и да се установят разликите за оценка на разликите в микробната таксономия и разнообразието между MS и HC.

2.1. Участници

Проучването е проспективно, лонгитудинално, аналитично, обсервационно и случай-контролирано. В него са включени 50 диагностицирани с МС пациенти от Клиника по неврология в Болница за спешна помощ Клуж-Напока, между януари 2019 г. и май 2020 г. Участват двадесет и един здрави контроли. Получи се разрешение от Етична комисия (номер 2394/28.01.2020 г., Спешна болница Клуж-Напока) и всеки пациент подписа информирано съгласие.

Групата на МС включва възрастни пациенти с потвърдена пристъпно-ремитентна МС (ПРМС) или клинично изолиран синдром (КИС), съгласно ревизираните диагностични критерии на McDonald (Thompson et al., 2018), с EDSS резултат от максимум 5 точки, при които не е провеждана модифицираща болестта терапия (МБТ) една година преди включването в проучването. От проучването бяха изключени пациенти с прогресивна МС, неясни диагностични критерии, с остри оплаквания от стомашно-чревния тракт, бременни, кърмачки или пациенти на продължителна терапия с пробиотици, антивирусни медикаменти, антибиотици, нестероидни противовъзпалителни лекарства или инхибитори на протонната помпа през последните 6 месеца. От всички пациенти 7 са имали бързопреходни леки стомашни оплаквания в миналото, но без остри стомашно-чревни симптоми при включване в проучването, 4 пациенти са съобщили за коремни операции в миналото и 4 пациенти са с ендокринни заболявания (най-вече щитовидни) под медицинско наблюдение. В изолирани случаи са регистрирани други патологии (хипертония, диабет) в изолирани случаи, но са клинично компенсирани в началото на проучването. Групата от ЗК беше съставена от здрави индивиди без МС, съвпадащи по възраст и пол с пациентите с МС, без установени заболявания и без хронично лечение. Всички участници декларираха, че не са настъпили големи промени в техния начин на хранене или стил на живот по време на проучването.

В началото на изследването всеки участник предостави чревна проба. След първата проба им беше предписана форма на лечение в зависимост от няколко фактори, като тежест на заболяването, съгласие на пациентите, съпътстващи заболявания, безопасност и достъпност на лекарствата (Chikramane et al., 2010). Някои за момента отказаха конвенционална терапия, но приеха хомеопатично лечение. Втората проба беше взета 2 месеца след началото на лечението.

По отношение на хомеопатичното лечение всеки пациент получи едно от следните индивидуално подбрани лекарства според своите симптоми на МС: Phosphorus, Lycopodium, Natrium muriaticum, Lac Caninum, Nux Vomica, Lachesis, Nitric acid, Rhus Toxicodendron, Tarentula Hispanica, Pulsatilla, Calcarea Carbonica, Sulphur, Ignatia, Aconitum или Causticum, в потенция 30СН или 200СН. Хомеопатичните лекарства бяха предписани от невролог, с диплома по хомеопатия и бяха приемани ежедневно по 7 гранули под езика 3 последователни дни при пациенти с потенция 200СН и 1 до 3 месеца за тези с потенция 30СН.

Нашите пациенти с МС бяха разделени в отделни групи според тяхното лечение, както е представено в таблица 1. Групата G-DMT получи модулиращо болестта терапия: интрамускулен интерферон бета 1a, 30 µg / 0,5 ml веднъж седмично (подгрупа G-IFN) или перорален терифлуномид 14 mg дневно (подгрупа G-TER). Група G-DMT+НОМ получи МБТ, комбинирана с хомеопатия: G-IFN НОМ - интерферон бета1a и хомеопатия, G-TER+НОМ - терифлуномид и хомеопатия. Групата G-НОМ получи само хомеопатично лечение. Контролна група, G-НС се състоеше само от здрави контроли, при които нямаше терапия.

2.2. Събиране на проби

Всички участници предоставиха фекални проби, отговарящи на лабораторните инструкции: по всяко време на денонощието, без ограничения, в специални контейнери за изпражнения. Предоставените проби се съхраняват при минус 20 градуса по Целзий и след това се изпращат в лабораторията за извличане на ДНК. Всеки участник даде две фекални проби: първата преди стартиране на терапията (проба 1, S1) и втората два месеца след започване на лечението или включване в проучването (проба 2, S2)

Табл. 1
Определяне на имената на групите

Група	Брой на участниците	Подгрупа	Брой на участниците
G-DMT (БМТ)	20	G-IFN (Интерферон бета1а) G-TER (терифлуномид)	10 10
G2-DMT + НОМ (БМТ+ хомеопатия)	19	G-IFN + НОМ (интерферон бета 1а + хомеопатия) G-TER + НОМ (терифлуномид + хомеопатия)	9 10
G-НОМ (хомеопатия)	11		
G-НС (ЗК)	21		
G-MS (всички Пациенти с МС)	50		

Табл. 1 обобщава съкращенията, използвани за идентификация на групите. Съкращения: БМТ - болест модифицираща терапия, ЗК = здрави контроли.

2.3. 16rRNA секвениране и статистически анализ

Метагеномният анализ на универсално представения ген на 16S субединица на рибозомна РНК (rRNA) използва специфични хипервариабилни региони (V1-V3, V3-V4, ITS1&ITS2) в цялата платформа на Illumina MiSeq. Резултатите са в OTU (оперативни таксономични единици), микроорганизми, които имат сходство на ДНК в най-малко 97% с лабораторната база данни, са класифицирани в специфични таксономични единици според тяхната честота и относителен брой.

Разнообразието на чревната микробиота е математическа променлива, характеризира се с видово многообразие (брой на различните видове) и видово равновесие (постоянство на различните видове). За оценка на средното видово разнообразие в пробата се използва индексът Chao. Shannon и Simpson са параметри за видово многообразие и равновесие като техните стойности се увеличават с броя на видовете и тяхното равномерно разпределение (Kim et al., 2017).

Използвайки честотните матрици, всяка комбинация от двойки беше анализирана с помощта на теста на Уилкоксън. За оценка на видовия състав на пробите се използваха индексите на Брей-Къртис и Жакард, като разликата е показана с графичното разстояние между тях. Анализът на главните координати (PCoA) беше получен от матрици на относителния брой. LefSe (Размерът на ефекта на линейния дискриминантен анализ) използва матрици за относителния брой, за да изчислят различния брой на микроорганизмите между МС и ЗК, с алфа стойност от 0,05 и праг на резултата от логаритмичен линеен дискриминантен анализ (LDA) 2.0. Всички характеристики имат резултат по-нисък от 2,0 или по-голям от 2,0. Бактериите, преобладаващи при пациенти с МС, са представени в червено, докато тези, които са в по-голямо количество при ЗК са оцветени в зелено. В колоните за относителния брой всяка лента показва средния относителен брой на 25 най-чести вида, избрани според най-разпространените в двете групи. За представяне на данните бяха създадени и топлинни карти.

3. Резултати

Групата с МС се състоеше от 31 жени и 19 мъже със средна възраст 30,5 ± 9,9 години, 44 от тях бяха диагностицирани с RRMS и 6 с CIS, среден резултат от разширена скала за статус на инвалидност (EDSS) от 1,8 точки и средна продължителност на заболяването от 3,4 години. Всички специфични особености на МС са представени в таблица 2. Повечето от тях са били без предшествашо болестмодифицираща терапия (БМТ), само 4 пациенти са получили лечение, което е било прекъснато през предходната година.

Групата от здрави контроли (ЗК) беше подбрана от хора с подобни демографски характеристики като групата на MS: 62% жени и 38% мъже, средна възраст 28 ± 9,7 години.

Табл. 2

Множествена склероза (МС) специфични особености на нашата кохорта.

Особености	Пациенти с МС (n = 50)
Тип на МС, брой (%)	
ППМС	44 (88%)
КИС	6 (12%)
EDSS скор, средна стойност (граница)	1.8 (0-5)
Потвърдена продължителност на болестта, средна (СД) (год)	3.4 (6.2)
Брой на рецидивите, средна стойност (СД)	2.5 (2.13)
MMSE скор, средна стойност	29.4
Лечение, брой (%)	
Терифлуномид	10 (14.28%)
Интерферон бета1а	10 (14.28%)
Терифлуномид + хомеопатия	10 (14.28%)
Интерферон бета+ хомеопатия	9 (12.8%)
Хомеопатия	11 (15.7%)

Съкращения: МС = множествена склероза, n = брой на пациентите, SD = стандартно отклонение, у = години, ППМС = пристъпно-ремисивна МС, КИС = клинично изолиран синдром, EDSS = разширена скала за статус на инвалидност, MMSE = Mini-Mental State Exam.

3.1. Микробиомно разнообразие

Изследвахме общите разлики в микробния състав с помощта на средното видово разнообразие и видовия състав **алфа и бета разнообразие**. Нямаше статистически значима разлика в средното видово разнообразие между пациенти с МС и ЗК преди (p = 0,85) и след лечението (p = 0,95). Освен това нямаше разлика между другите комбинирани според лечението групи за втората проба (S2): G-DMT и G-DMT + НОМ (p = 0,89), G-DMT + ДОМ и G-НОМ (p = 0,98), G-DMT и G-НОМ (p = 0,64) и техните подгрупи, G = IFN + НОМ срещу G-TER + НОМ (p = 0,23), G-IFN срещу G-IFN + НОМ (p = 0,06) между проба 1 (S1) и S2 за МС пациенти (p = 0,93), G-DMT + НОМ (p = 0,38) или G-НОМ (p = 0,79). Също така, нямаше разлика в средното видово разнообразие между пациентите с МС, лекувани с БМТ (G-DMT комбиниран с G-DMT + НОМ) и пациенти, които нямат болест модифицираща терапия (G-НОМ), p = 0.81. Всички p стойности са представени в таблица 3.

При анализирани на висовия състава установихме разлика между S2 G-НОМ и G-TER + НОМ (p = 0.007) (фиг. 1) и между G-НОМ и G-IFN (p = 0,012), но няма статистически значима разлика между пациенти с МС и ЗК или между двете проби за пациенти с МС (всички p > 0,05). Други резултати са описани в Таблица 3 и Фиг. 1* (*допълнителни файлове с данни).

3.2. Таксономични разлики

Резултатите от анализа на 16S включват честотата и относителния брой на вида.

За кохортата на МС идентифицирахме 51 оперативни таксономични единици (OTU) на типово ниво, като мнозинството се състои от Firmicutes (49,45%), Bacteroidetes (34,3%), Actinobacteria (4,77%) и Proteobacteria (3,6%). На видово ниво анализирахме 1505 OTU, с най-високо относително изобилие на Prevotella copri (10,75%) и Bacteroides (10,3%), следвани от Faecalibacterium prausnitzii (6,63%) и Blautia (4,49%).

Анализирахме таксономичните разлики между нашата МС кохорта (G-MS) и ЗК (G-НС) преди всяко лечение (S1). При нелекуваните пациенти с МС в сравнение с НС, има повишен относителен брой на Lentisphaerae phylum (p 0,005), Prevotella stercora видове (p 0,02) (тип Bacteroidetes). При тях има намален брой на тип Actinobacteria (p 0,01), с неговите видове Bifidobacterium (p 0,01) и Bifidobacterium adolescentis (p 0,007), както и намален брой на Bacteroides coprophilus (p 0,02) (от тип Bacteroidetes). При тип Firmicutes има намалено относителен брой Faecalibacterium prausnitzii (p 0,03), Lachnospiraceae (p 0,01), Staphylococcus hominis (p 0,02) и Staphylococcus bacterium (p 0,02). При тип ип Proteobacteria има намаление на Haemophilus (p 0,04) и Escherichia coli (p 0,04). Другите статистически значими разлики са представени на фиг. 2А, фиг. 2*-4*.

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 = 0.98	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-IFN vs G-IFN + 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 = 0.68	p = 0.68	p = 0.23	p = 0.35
G-IFN + 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-IFN 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-IFN + 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 = 0.88	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 = 0.98	p = 0.98
S1 vs S2 (G-IFN + 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 = 0.58	p = 0.68	p = 0.96	p = 0.98

*Стойностите в удебелен шрифт са статистически значими. Тази таблица представя специфични сравнения между нашите кохорти и приложените индекси за разнообразие, заедно със стойността p на всеки тест. Съкращения: S1 = проба 1; S2 = проба 2.

Когато анализирахме вторите проби, резултатите при групата на лекуваните пациенти с МС в сравнение с ЗК бяха леко различни, с намалени *Bifidobacterium* (p = 0,02), *Ruminococcus* (p = 0,04) и *Clostridiales* (p = 0,01) и по-висок процент на *Gemella* (p = 0,04), *Megasphaera* (p = 0,02) и *Prevotella stercora* (p = 0,02) при пациенти с МС в сравнение с ЗК (фиг. 2В, фиг. 5*-7*).

Анализирахме и направихме сравнение между отделните групи след двумесечно лечение. При анализирани на микробиотата на пациентите с МС с БМТ (G-DMT) в сравнение с пациенти, при които е включено и хомеопатично лечение (G-DMT + HOM), получихме следните резултати. В сравнение с G-DMT + HOM, при G-DMT се е увеличил относителният брой на *Catenibacterium* (p = 0,02), *Lachnospiraceae* (p = 0,02), *Sharpea* (p = 0,02) и *Gammaproteobacteria* (p = 0,02) и са намалели *Shuttleworthia* (p = 0,04), *Cytophaga* (p = 0,03) и *Rumen* (p = 0,02). След проведеното лечение *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 stercora* (p = 0,03) са в по-голямо количество в подгрупата на G-IFN в сравнение с G-IFN + HOM.

От друга страна, G-IFN + HOM показва по-високи нива на *Proteobacteria* (p = 0,02), *Escherichia shigella* (p = 0,01), *Barnesiella* (p = 0,03), *Serratia* (p = 0,008), *Lactobacillus zeae* (p = 0,02). В групата G-TER *Escherichia shigella* (p = 0,007), *Lactobacillus* (p = 0,01), *Enterobacter* (p = 0,02), *Enterococcus faecalis* (p = 0,03) са повече, отколкото в G-TER + HOM, докато при G-TER + HOM има повишен брой на *Rickenellaceae* (p = 0,01) и *Lachnospiraceae* (p = 0,02).

HOM представя по-високо относителен брой на *Megasphaera* (p = 0,04), *Eubacterium oxidoreducens* (p = 0,02), *Veillonellaceae* (p = 0,02) и *Gardnerella* (p = 0,02), в сравнение с G-HOM. При G-HOM са увеличени количествено *Faecalibacterium prausnitzii* (p = 0,01), *Akkermansia muciniphila* (p = 0,02), *Lachnospiraceae* (p = 0,003), *Bacteroides acidifaciens* (p = 0,04) и *rectinophilus* (p = 0,03), *Veilonella* (p = 0,01), в сравнение с G-DMT + HOM (фиг. 8*-20*). Друг интересен момент в нашето изследване беше да подчертаем как микробиомът се променя във времето, от момента на началото на терапията (S1) до два месеца след началото на лечението (S2). За кохортата MS таксономичните промени са показани на Фиг. 3 с най-честите 25 организма. Статистически значимите разлики между двете проби са откриват за типа *Firmicutes*, тъй като са установени понижени нива за *Ruminococcus* (p = 0,03), *Oscillospira* (p = 0,0004), *Anaerotruncus* (p = 0,02), *Lachnoclostridium* (p = 0,01), *Lachnospiraceae* (p = 0,02) и *Eubacterium oxidoreducens* (p = 0,04) при пациенти с МС след лечение в сравнение с изходната проба. При лекувани пациенти с МС има по-разнообразни промени като увеличен брой на типовете *Firmicutes* (*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) след проведеното лечение (фиг. 21*-25*). Групата G-DMT + HOM показва по-нисък относителен брой на някои от представителите на тип *Firmicutes* (*Oscillospira* p = 0,01, *Lachnoclostridium* p = 0,03, *Lachnospiraceae* p = 0,03) и тип *Proteobacteria* (*Helicobacteraceae* p = 0,01, *Undibacterium* p = 0,03) след лечение в сравнение с изходното ниво. При групата само на хомеопатично лечение (G-HOM) е намалела *Eubacterium oxidoreducens* с в сравнение с първата проба (p = 0,03) (фиг. 25*-32*).

4. Дискусия

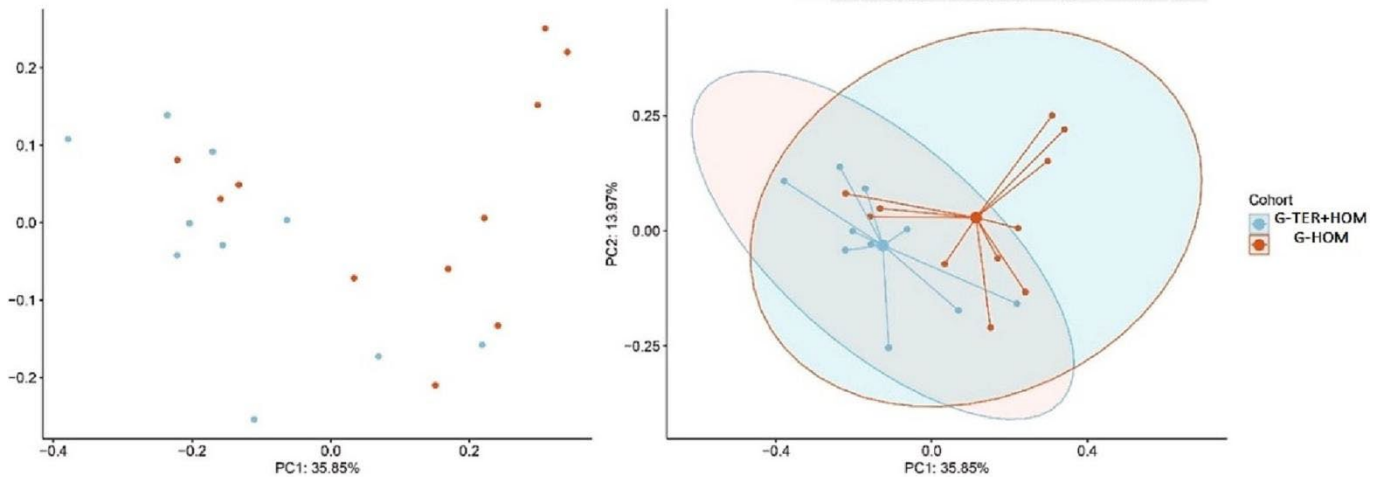
Нашите данни не разкриват големи промени в разнообразието между пациентите с МС и ЗК преди или след което и да е лечение. В сравнение с ЗК, нелекуваните пациенти показват увеличение на *Prevotella stercora* и понижени нива на *Actinobacteria* и *Faecalibacterium prausnitzii*. Имаше слаба видова промяна след двумесечно лечение с повишаване на нивата на *Gemella* и намаляване на *Ruminococcus* при участници с МС. При сравняване между отделните групи се установиха различни видови модификации. Например, при пациентите на хомеопатично лечение имаше увеличение на *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides* в сравнение с групата на комбинирана терапия. Освен това имаше значителни промени във видовия състав в групата на хомеопатично лечение спрямо групата на хомеопатия и терифлуноид, както и спрямо групата на интерферон бета1а. Анализирайки промените, настъпили във времето между двете проби, забелязахме намаляване на *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae* и *Eubacterium oxidoreducens* при лекуван пациенти с МС в сравнение с изходната проба. Хомеопатията предизвиква във времето намаляване на *Eubacterium oxidoreducens*.

Съществува консенсус, че здравата микробиота се характеризира с баланс между микроорганизмите и гостоприемника, с голямо видово разнообразие, устойчивост и стабилност, за да се поддържа хомеостазата на гостоприемника и функционирането на имунната система (Freedman et al., 2018). Въпреки че външни фактори могат бързо предизвикат изменения в микробиотата, тя се връща към първоначалното си стабилно състояние и се променя само при трайно променен начин на живот. По-голямото биоразнообразие означава по-големи разлики във видовете и следователно повече биологични функции, които могат да изгълняват, по-голяма стабилност, способност да устояват на промени и да се възстановяват (Riccio and Rossano, 2018). Дисбиозата се отнася като нарушено равновесие във видовия състав на бактериите с увеличаване на вредните микроорганизми и намаляване на полезните видове с отклоняване към възпалително състояние (Freedman et al., 2018).

Забелязахме, че микробиотата на нашата кохорта от пациенти с МС увеличение на *Firmicutes* и *Actinobacteria* и намаляване на типа *Bacteroidetes*.

PERMANOVA

	Df	SumOfSqs	R2	F	p-value	SIG
Cohort	1	0.385615	0.1433595	3.179667	0.007	**
Residual	19	2.304231	0.8568405	NA	NA	NA
Total	20	2.689846	1.0000000	NA	NA	NA



***: $p \leq 0.001$. **: $p \leq 0.01$. *: $p \leq 0.05$. NS: $p > 0.05$

Фиг. 1. Анализ на главните координати на Брей-Къртис (PCoA), хомеопатия + терифлуномид (G-TER + HOM) срещу хомеопатична група (G-HOM), проба 2. Стойността на разнообразието по Брей-Къртис определя количествено разликата между групата с хомеопатия и терифлуномид и групата с хомеопатия след двумесечно лечение. Фигурата вдясно показва елипса на 95% сигурност за всяка група. Резултатите от теста PERMANOVA са включени в таблицата

Тези промени са специфични за типична западна диета с високо съдържание на мазнини и захар, при която Firmicutes могат да извличат повече енергия от храната и да доведат до наддаване на тегло. От друга страна, диета, богата на сложни въглехидрати и фибри води до увеличаване на Bacteroidetes и полезните метаболити (Magne et al., 2020).

Терапиите с МС могат да модулират чревната микробиота, но няма сигурни доказателства при проведените досега изследвания. Интерферон бета инхибира Т клетките и проинфламаторните цитокини, модулира взаимодействието между микробите и епителните клетки и стабилизира чревната бариера като увеличава белтъците на плътните междуклетъчни връзки в ендотелните клетки. Терифлуномидът инхибира дихидрооротат дехидрогеназата, пиримидиновата синтеза и провъзпалителните цитокини и може да повлияе на микробиома на червата чрез потискане на STAT-6 сигналния път, като увеличава специфичните регулаторни Т-клетки (Samara-Lemargoy et al., 2018; Baecher-Allan et al., 2018).

4.1. Сравнение между пациенти с МС и ЗК преди лечение

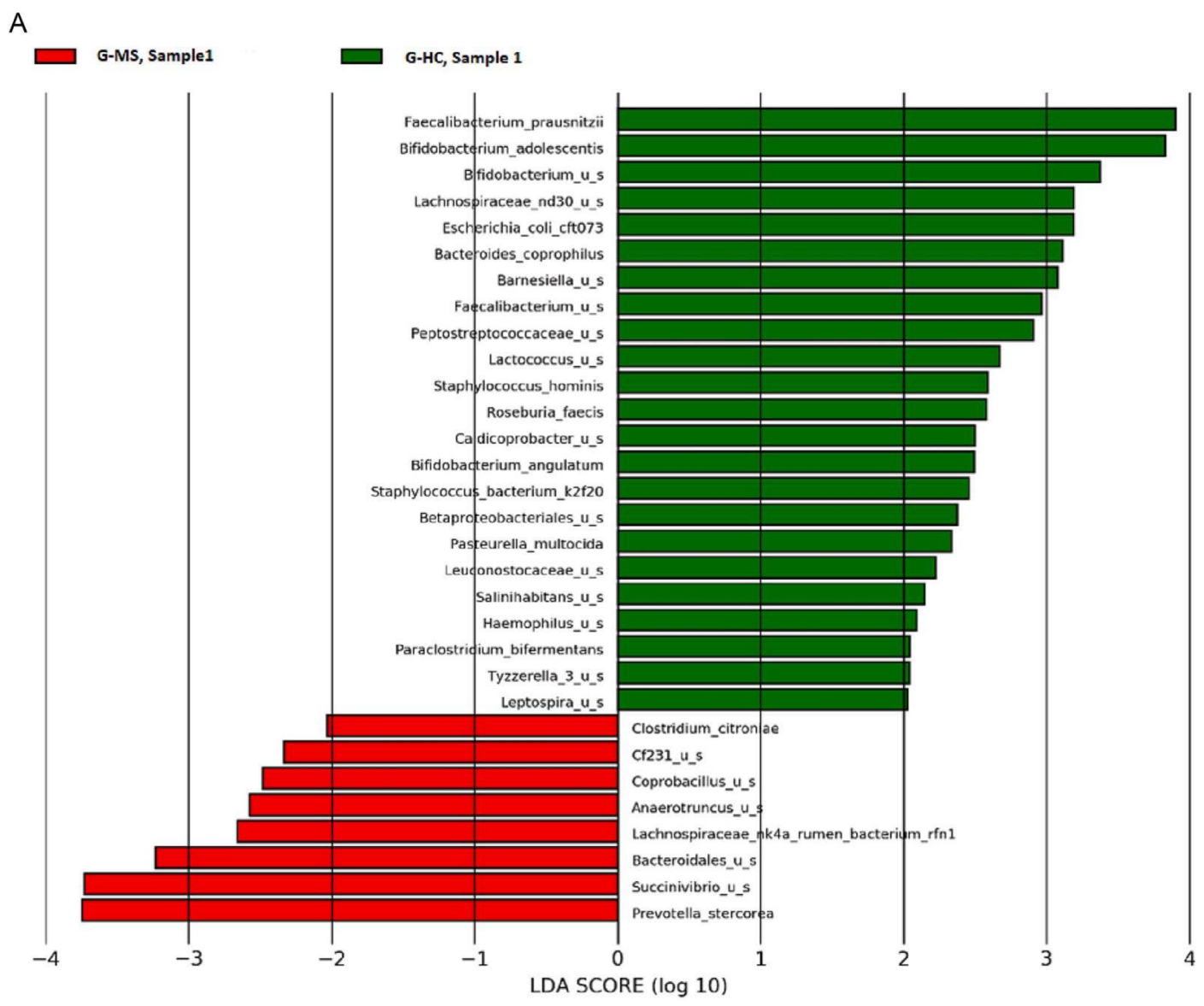
В нашето проучване нито един от показателите за алфа или бета разнообразие не се различава значително между пациентите с МС и ЗК преди започване на лечението. Това предполага, че микробиотата на пациентите с МС не показва необичайно развитие, съответстващо на литературните изследвания (Mirza et al., 2020). На таксономично ниво наблюдавахме значителни промени в относителния брой на някои микроорганизми при случаи на МС и при ЗК. Actinobacteria е полезен микроорганизъм, който има роля във формирането на имунната система (Adamczyk-Sowa et al., 2017) и е намален при пациентите с МС. Bifidobacterium е намален в нашата кохорта от пациенти с МС. Литературата предоставя противоречиви данни относно ролята му при имунни заболявания, но повечето проучвания показват, че Bifidobacterium индуцира противовъзпалителен имуноен отговор (Budhram et al., 2017; Tankou et al., 2018). Родът Prevotella са добре проучени бактерии при МС, участва в обмяната на фитоестрогена, за който е общо прието, че са намалени при МС и нарастват като количество при лекувани пациенти (Chen et al., 2016; Brown et al., 2021). В сравнение със ЗК при нашите пациенти с МС се установиха по-високи нива на един от видовете Prevotella stercorea преди или след лечението, но данните не могат да се приложат за рода Prevotella. Това вероятно се дължи на факта, че този род има няколко вида с различни функции (Mirza et al., 2020).

Някои бактериални метаболити могат директно да повлияят на централната нервна система, като късоверижните мастни киселини (SCFA), които имат имunosупресивна роля в чревната лигавица. Faecalibacterium prausnitzii и Bacteroides coprophilus участват в метаболизма на SCFA (Freedman et al., 2018). Bacteroides е полезна бактерия, стимулираща секретцията на IL-10 и обикновено е в по-ниски нива при случаи на МС. Faecalibacterium prausnitzii е доказан маркер за здрава микробиота и почти липсва сред пациентите с МС по литературни данни (Tremlett et al., 2016), както и при нашата кохорта. Всички тези разлики в бактериалната таксономия в сравнение със ЗК предполагат дисбиоза на микробиотата при МС.

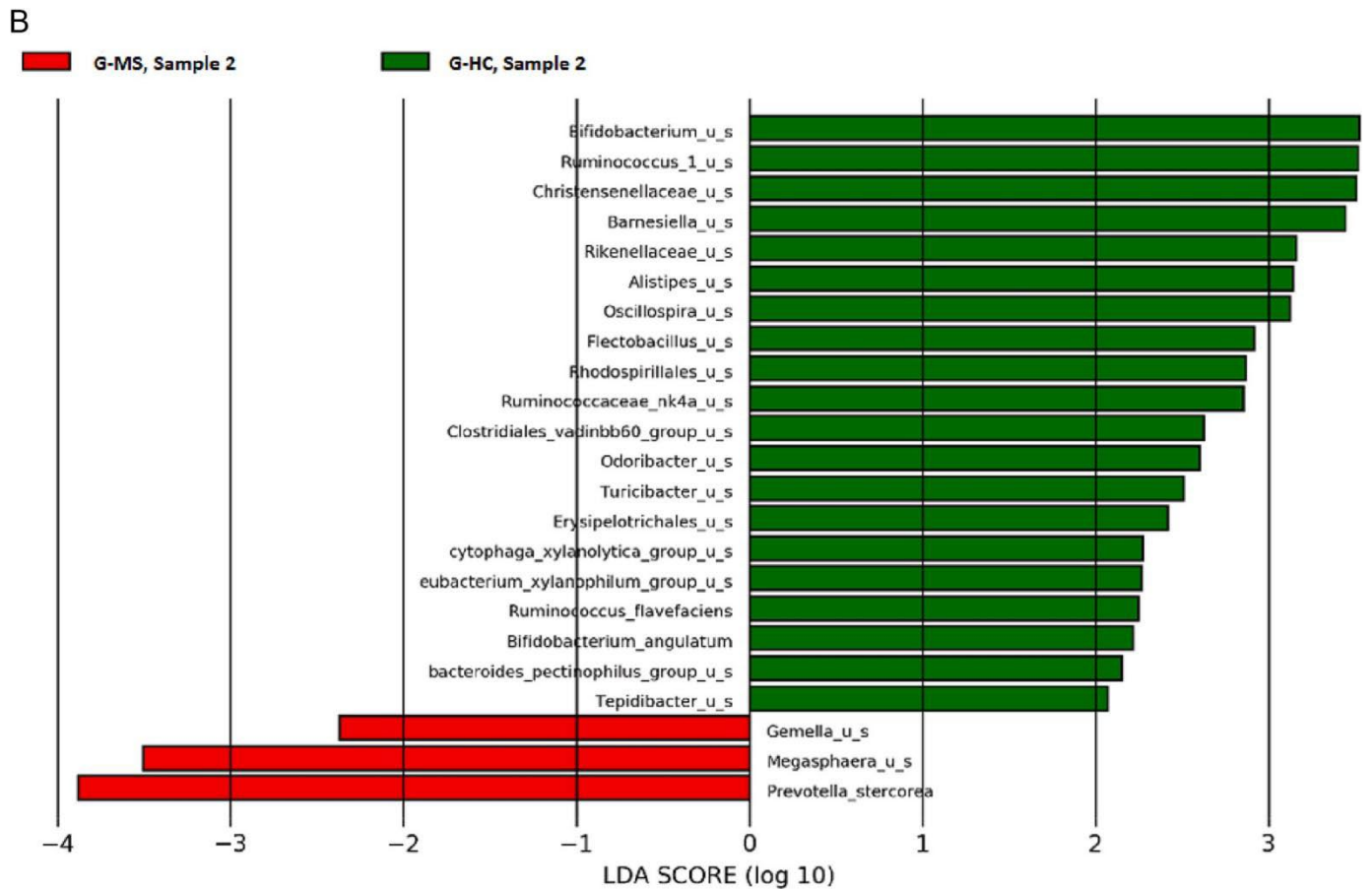
4.2. Сравнение между отделните групи след лечение

Когато се анализира дали лечението (от всякакъв вид) за МС значително променя микробиома, ние подчертахме, че няма голяма промяна в алфа или бета разнообразието за пациенти с МС в сравнение със ЗК в два месеца след началото на която и да е терапия, както се предполагаше от литературни изследвания (Mirza et al., 2020). По отношение на промените в таксономията, Ruminosoccus е полезна бактерия и обикновено се възстановява в случаи на МС след БМТ (Zhu et al., 2020), като нашите данни показаха по-нисък относителен брой при пациенти с МС в сравнение със ЗК във втората проба. Clostridium е бактерия, която образува бутират и участва в образуването на регулаторни Т-клетки и противовъзпалителния цитокин IL-10 (Miyake et al., 2015) и намалява при пациентите с МС след лечение.

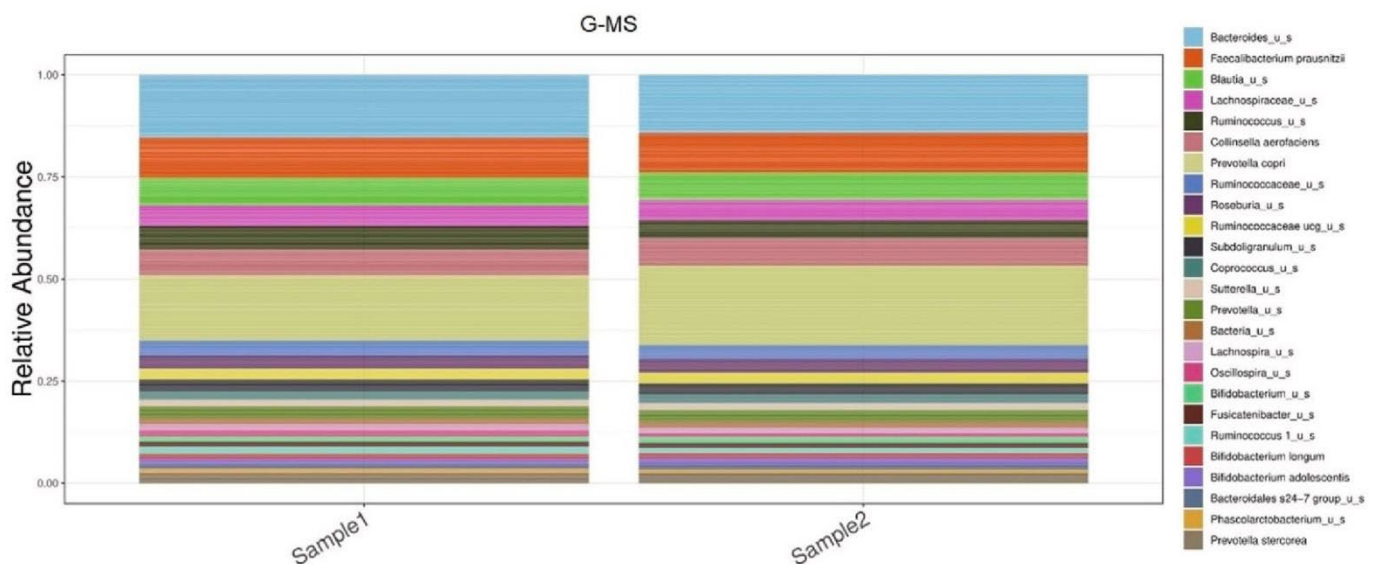
След двумесечна терапия разликите между отделните групи очертават възможно смущаващо въздействие на БМТ или хомеопатичното лечение върху микробиома на червата. Нашите данни показват, че хомеопатията може да има влияние върху червата микробиота. Има фини промени при пациенти на БМТ (G-DMT) в сравнение с пациенти на комбинация от БМТ и хомеопатия (G-DMT + HOM), но забелязваме голям брой значителни разлики по отношение на относителния брой между подгрупите с промени, като са частично отозвоилие на бактерии между подгрупи, като промените са частично нелогични и противоречиви. Двойката G-IFN и G-IFN + HOM очертава възможно влияние на хомеопатия при пациенти, лекувани с интерферон бета1а, докато G-TER и комбинацията G-TER + HOM предполага нейното влияние върху пациенти с терифлуномид. В сравнение с комбинираната терапия, при пациентите на хомеопатично лечение има увеличение на Akkermansia



Фиг. 2А. (Lefse) на видово ниво между пациенти с множествена склероза (G-MS) и здрави контроли (G-HC) преди лечение (проба 1).



Фиг. 2B. Lefse анализ на видово ниво между пациенти с множествена склероза (G-MS) и здрави контроли (G-HC) след 2-месечно лечение (проба 2).



Фиг. 3. Графика с линейни диаграми: сравнение между проба 1 и проба 2 за кохортата с MC с най-честите 25 бактерии

musciniphila, спорен вид, с неизвестна роля в съзряването на имунната система, повишено сред нелекуваните пациенти с MC (Sekanaviciute et al., 2017). Експериментите in vitro очертават неговата провъзпалителна роля, но при проучвания in vivo тези ефекти не са възпроизведени, дори обратното, може да има благоприятна функция при някои метаболитни нарушения. Въпреки че изборът на терапия не повлия на видовото

разнообразие при никоя от групите, но пък открихме изолирани промени във видовия състав, подобно на нашето литературно изследване (Mirza et al., 2020). Нашите открития бяха свързани с хомеопатията и интерферон бета1А като лечения, които биха могли да променят разнообразието на микробиомите. Видовият състав на групата, получила хомеопатично лечение, е различен от този на групата, лекувана с комбинация от хомеопатия и терифлуномид

Също така, групата, лекувана с хомеопатия, има различен видов състав в сравнение с групата, лекувана с интерферон бета1А. Всички стойности на p са представени в таблица 3. Със статистически незначима стойност на p от 0,06, близо до 0,05, групата на лечение с интерферон има незначителна промяна в видовия състав спрямо групата с интерферон и хомеопатия. Тези резултати предполагат, че хомеопатията може да играе роля във видовия състав при пациенти с МС, но са необходими допълнителни проучвания.

При анализирани на относителния брой на избраните типове и видове, забелязваме намаление за Firmicutes в групата, получаваща комбинирана терапия в сравнение с други групи, но не е статистически значимо. Firmicutes са свързани с по-кратки интервали между рецидивите при МС (Sand and Baranzini, 2018), като по този начин комбинирането на тези две терапии може да бъде от полза за забавяне на прогресирането на болестта.

Двете полезни бактерии, участващи в метаболизма на SCFA, Bacteroides и Faecalibacterium prauznitzii, имат подобен относителен брой при ЗК и при пациентите, лекувани с хомеопатия, приблизително 12% за Bacteroides и съответно 7% за Faecalibacterium. Това предполага, че хомеопатичното лечение може да играе роля в поддържането на баланса на тези полезни микроорганизми.

4.3. Сравняване във времето (между втората и първата проба)

Промените на микробиома във времето бяха анализирани за кохортата с МС, където резултатите показват ефектите от всички лечения, приложени в нашето проучване: БМТ, хомеопатия или комбинация от двете. При лекуваните пациенти с МС се установяват по-разнообразни промени при множество бактериални видове, което предполага, че лечението може да има положително влияние върху микробиотата като цяло. Пациентите имаха по-нисък относителен брой на Lachnospiraceae, Ruminococcus, Eubacterium oxidoreducens след лечение, както се очакваше от литературните изследвания (Mirza et al., 2020). Lachnospiraceae участва в намаляването на пропускливостта на лигавицата чрез производството на SCFA и повишена експресия на протеини с плътно свързване в епителните клетки (Rinninella et al., 2019).

За двете групи с хомеопатично лечение, G-DMT + НОМ и G-НОМ, преобладаващите преди терапията бактерии са намалели във втората проба. Това предполага, че хомеопатията или комбинацията ѝ с БМТ е имало въздействие върху чревната микробиота след два месеца лечение.

Въздействието на хомеопатията върху чревната микробиота при пациенти с МС не е било проучвано и не са намерени съответни проучвания, с които да се сравнят нашите открития. Пациентите, които получиха само хомеопатично лечение, показват относителна стабилност след 2 месеца лечение, с единствената статистически значима модификация на Eubacterium oxidoreducens, с намалено количество във втората проба. Освен това в групата, лекувана с комбинация от терапии, има няколко бактериални вида, които са в намален брой във втората проба. Тези резултати предполагат, че лекуваните с хомеопатия пациенти може да имат по-стабилен микробиом.

4.4. Принос и ограничения

Нашето проучване има своя принос в тази медицинска област, тъй като анализира в динамика чревни проби, като сравнява не само промените, настъпили под влияние на лечението, но и тези във времето. Освен това проучването е уникално тъй като представя хомеопатията като възможен въздействащ фактор.

Като възможни ограничаващи фактори не могат да се изключат или да бъдат количествено измерени всички вещества от средата и хранителния режим, които могат да повлияят и модифицират микробиотата за два месеца. Необходими са допълнителни проучвания.

5. Изводи

Микробиотата на МС се характеризира с дисбиоза с различни таксономични промени в сравнение със ЗК. При нелекувани пациенти с МС откриваме по-голямо количество на Prevotella stercorea и намаляване на Actinobacteria, Bifidobacterium и Faecalibacterium prauznitzii. Лечението с интерферон бета1а, терифлуномид или хомеопатия водят до таксономични промени

Пациентите, лекувани с МС, имат различна микробиота в сравнение със ЗК, с намалено количество на Bifidobacterium, Ruminococcus и Clostridiales и преобладаване на Gemella, Megasphaerae и Prevotella stercorea.

Сравнявайки втората проба с първата, ние установихме следните модификации в микробиотата на пациентите с МС във времето - намален брой на Lachnospiraceae и Ruminococcus и повишено количество на Eubacterium faecalis. Тези динамични промени може да се дължат на лечението на МС.

Като цяло лечението има слабо влияние върху видовото разнообразие на микробиома. Единствените статистически значими модификации на видовото разнообразие, които ние установихме, показват въздействието на хомеопатичното лечение върху показателите на видовия състав в сравнение с ефекта на имуномодулиращите лекарства. Eubacterium oxidoreducens също е намален след хомеопатично лечение. Нашите резултати показват, че хомеопатичното лечение повлиява чревната микробиота.

Това проучване подчертава важната роля на чревната микробиота при МС и извежда допълнителни въпроси за изследване. Микробиомът е огромна екосистема под въздействието на множество фактори, които не могат да бъдат напълно количествено определени. Нашият проект се фокусира върху динамичните промени в микробиотата и възможното влияние на някои специфични БМТ, както и хомеопатията като комплементарна и алтернативна медицина, използвана в клиничната практика.

Финансиране

Това проучване не е получило външни източници на финансиране.

Етично одобрение

Проучването е проведено в съответствие с Декларацията от Хелзинки и е одобрено от Комитета по етика на болницата за спешни случаи в Клуж, код 2394/28.01.2020 г..

Декларация за информирано съгласие

Всички участници в проучването подписаха декларация за информирано съгласие.

Декларация за авторски принос

Витали Вакарас: идеен проект, методология, търсене на източници, преглед и редактиране на текста, супервизия. **Дафин Ф. Мурешану:** Идеен проект. **Анка-Дана Бузоану:** Идеен проект. **Кристина Нистор:** методология, търсене на източници, анализ, преглед и редактиране на текста. **Стефан Кристиан Веса:** оформяне на чернова, преглед и редактиране на текста, супервизия. **Андреа Кристина Парашив:** методология, източници, анализ. **Даниела Ботош-Вакарас:** методология, източници. **Кристиана Вакарас:** методология, източници. **Джордж Витулкас:** Идеен проект, супервизия.

Декларация за конфликт на интереси

Авторите не декларират конфликт на интереси.

Достъпност на данните

Данните и останалата информация от това проучване могат да бъдат получени от автора за кореспонденция при отправено искане поради мерки за поверителност.

Благодарности

Високо оценяваме помощта на лаборатория CosmosID за анализиране на пробите и за помощта при статистическата обработка.

Апендикс А. Допълнителни данни

Допълнителни данни може да бъдат намерени на: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2023.578087>.

Источници

- 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., Quattrocchi, 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-Lemarroy, 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., Zuccalà, 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., Pesoa, 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., Miggiano, 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., Fadrosh, 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.