

Роль видов терапий при рассеянном склерозе в динамике кишечной микробиоты человека

Основные положения

- •

У пациентов с рассеянным склерозом кишечная микробиота отличается от микробиоты контрольной группы здоровых людей.

- •

Лечение интерфероном бета1а, терифлуномидом или гомеопатией предполагает различные изменения микробиоты кишечника.

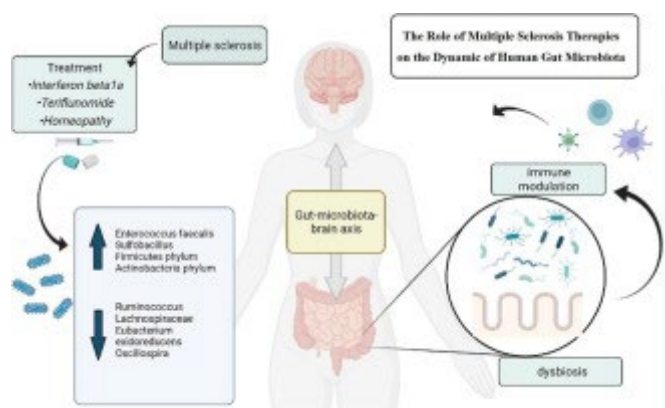
- •

Лекарства слабо влияют на бета-разнообразие, не оказывая существенного влияния на общее альфа-разнообразие.

Аннотация

Кишечная микробиота, общее количество микроорганизмов в нашем желудочно-кишечном тракте, может иметь значение при рассеянном склерозе (РС), демиелинизирующем неврологическом заболевании. В наше исследование были включены 50 пациентов с РС и 21 здоровый индивид (группа контроля) (ГК). Двадцать пациентов получали модифицирующую заболевание терапию (МЗТ), интерферон бета1а или терифлуномид, 19 МЗТ в сочетании с гомеопатией и 11 пациентов принимали только гомеопатию. Всего было собрано 142 образца кишечника, по два на каждого человека: при включении в исследование и через восемь недель после лечения. Мы сравнили микробиом больных РС с ГК, проанализировали его эволюцию во времени и влияние интерферона бета1а, терифлуномида и гомеопатии. Не было никакой разницы в альфа-разнообразии, только два результата бета-разнообразия были связаны с гомеопатией. По сравнению с ГК, у нелеченых пациентов с РС было снижено количество *Actinobacterium*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prauznitzii* и увеличено количество *Prevotella stercorea*, в то время как у пациентов получавших лечение было снижено количество *Ruminococcus* и *Clostridium*. По сравнению с исходной выборкой у пролеченных пациентов с РС наблюдалось снижение *Lachnospiraceae* и *Ruminococcus* и увеличение *Enterococcus faecalis*. Количество *Eubacterium oxidoreducens* было уменьшено после гомеопатического лечения. Исследование показало, что у больных РС может наблюдаться дисбактериоз. Лечение интерфероном бета1а, терифлуномидом или гомеопатией подразумевало несколько таксономических изменений. МЗТ и гомеопатия могут влиять на микробиоту кишечника.

Графическая аннотация



- [Увеличить](#)
- [Просмотр таблиц](#)
- [Скачать изображение Hi-res image](#)
- [Скачать \(PPT\)](#)

Ключевые слова

- [Рассеянный склероз](#)
- [Кишечная микробиота](#)
- [Дисбиоз](#)
- [Модифицирующая заболевание терапия](#)
- [Микробиом](#)

1. Введение

Микробиота кишечника человека, состоящая из большого разнообразия микроорганизмов, обитающих в желудочно-кишечном тракте, таксономически подразделяется на виды, роды и типы, содержащие как полезные, так и патогенные микробы ([Rinninella et al., 2019](#); [Camara-Lemarroy et al., 2018](#)).

В основном она формируется в раннем детстве в зависимости от нескольких факторов, таких как тип родов, грудное вскармливание, отлучение от груди и прием лекарств. После первых трех лет жизни она достигает частичной стабильности с постоянными слабо различимыми изменениями, вызванными внешними факторами: диетой, физическими упражнениями, индексом массы тела, воздействием окружающей среды и лекарственным воздействием. ([Rinninella et al., 2019](#)).

Микробиом формируется из совокупности генов, белков, метаболитов всех организмов. ([Maglione et al., 2021](#)).

Рассеянный склероз (РС) — это аутоиммунное заболевание центральной нервной системы, при котором генетическая предрасположенность встречается с факторами окружающей среды. Он включает нарушение целостности гематоэнцефалического барьера, воспаление, демиелинизацию, потерю олигодендроцитов, глиоз и дегенерацию аксонов. Заболевание имеет три основных стадии: доклиническую стадию, когда комбинация генетических факторов и факторов окружающей среды может быть триггером патологии, воспалительную стадию, когда мы сталкиваемся с эпизодами неврологической дисфункции, такой как неврит зрительного нерва, пирамидные, мозжечковые или стволовые нарушения, сенсорные симптомы, дисфункцию мочевого пузыря, и конечную нейродегенеративную стадию прогрессирования заболевания, когда мы обнаруживаем прогрессирующую инвалидность, в основном с нарушением походки пациента.

Заболевание имеет различные клинические формы: клинически изолированный синдром (КИС), рецидивирующе-ремиттирующий РС (РРРС), вторично-прогрессирующий РС (ВПРС) и первично-прогрессирующий РС (ППРС). Поддающиеся изменению факторы риска, связанные с РС, были тщательно проанализированы, чтобы найти конкретную роль в патологическом процессе, включая состав микробиома.

([Baecher-Allan et al., 2018](#)).

Недавние исследования показывают, что у пациентов с рассеянным склерозом состав микробиома отличается от микробиома здоровых людей из группы контроля (ГК). ([Mirza et al., 2020](#)).

Из-за того, что микробиом уникален для каждого человека и содержит огромное разнообразие микроорганизмов, сложно описать конкретную здоровую микробиоту.

([Rinninella et al., 2019](#)).

Здоровая микробиота обеспечивает множество важных функций, включая проницаемость и перистальтику кишечника, синтез витаминов, всасывание, а также развитие врожденной иммунной системы.

([Chu et al., 2018](#)).

Основываясь на этой роли в иммуномодуляции, недавние исследования указывают на возможную связь между микробиомом и некоторыми неврологическими иммуноопосредованными патологиями.

([Mirza et al., 2020](#)).

Концепция оси «микробиота кишечника-мозг» относится к различным механизмам связи между желудочно-кишечным трактом и нервной системой.

([Strandwitz, 2018](#)).

Микробиота может влиять на центральную нервную систему (ЦНС) разными путями. Во-первых, она относится к сетям мозга, модулирует различные нейротрансмиттеры (такие как гамма-аминомасляная кислота, серотонин, дофамин, гистамин) и связана с симпатической или парасимпатической нервной системой, особенно с блуждающим нервом. Во-вторых, она участвует в эндокринном пути как реакция на стресс. Кортикоиды, выделяемые гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой осью, могут изменять состав микробиоты и повышать проницаемость кишечника. Другим механизмом, с помощью которого микробы могут изменять нервную систему, является иммунорегуляция. Это включает в себя сниженную презентацию антигена, продукцию цитокинов и лимфоцитов, дифференциацию различных типов Т-клеток в лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (ЛТАК).

([Chu et al., 2018](#)).

Кишечные микроорганизмы могут высвобождать метаболиты (липополисахариды, пептидогликаны), а метаболизм короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) участвует в активации клеток микроглии и нарушении гематоэнцефалического барьера.

([Strandwitz, 2018](#)).

Комплементарная и альтернативная медицина, включая гомеопатию, в основном связана с конвенциональными формами терапии для облегчения общих симптомов, боли, спастики, проблем с чувствительностью, нарушений ходьбы, усталости, потери памяти. Из всех пациентов с рассеянным склерозом до 30% используют или использовали форму комплементарной и альтернативной медицины.

([Kim et al., 2018](#)).

Подсчитано, что у 70–80% пациентов с РС наблюдается улучшение общего состояния.

([Olsen, 2009](#)).

Принцип гомеопатии «подобное лечится подобным» основан на идее, что болезнь можно лечить веществами, которые вызывают те же патологические симптомы у здоровых людей.

([Fisher and Ernst, 2015](#)).

Гомеопатические препараты представляют собой сильно разведенные натуральные вещества ([Manzolini and Galeazzi, 2019](#)); считается, что более разбавленный раствор обладает более высокой потенцией.

([Chikramane et al., 2010](#)).

Выбор потенции связан с уровнем здоровья: более низкий уровень здоровья подразумевает низкую потенцию, такую как 30С, которая принимается в течение более длительного периода времени: до 3 месяцев; в то время как лечение потенцией 200СН ограничивается несколькими днями. Гомеопатические средства назначаются в каждом конкретном случае индивидуально, с учетом других аспектов, отдельных от специфических медицинских признаков, а также с учетом конкретных психологических особенностей или соответствующих повседневных привычек пациента.

([Whitmarsh, 2003](#)).

Некоторые симптомы РС часто облегчаются некоторыми веществами: *Causticum* при нарушении мочеиспускания, *Phosphorus* при неврите зрительного нерва, *Cuprum metallicum* и *Nux vomica* при спазмах, *Secale* при сенсорных симптомах.

([Whitmarsh, 2003](#)).

Как представлено далее в этой рукописи, многочисленные исследования показали, что у пациентов с рассеянным склерозом микробиота отличается от таковой у пациентов из группы контроля. Было замечено, что лечение рассеянного склероза может изменить кишечный микробиом, но в этой области гомеопатия не изучалась.

Целью этого исследования является изучение того, изменяется ли микробиота кишечника пациентов с РС из-за иммуномодулирующих препаратов или комPLEMENTАРНЫХ гомеопатических методов лечения, включая гомеопатическое лечение, и оценка различий в таксономии микробов и разнообразии между пациентами с РС и из ГК.

2. Материалы и методы

2.1 Участники исследования

Исследование было проспективным, пролонгированным, аналитическим, наблюдательным и методом случай-контроль. Оно включало 50 пациентов с диагнозом РС из отделения неврологии больницы скорой помощи г. Клуж-Напока в период с января 2019 года по май 2020 года. Был набран 21 участник ГК. Было получено этическое разрешение (номер 2394/28.01.2020, Больница скорой помощи г. Клуж-Напока), и каждый субъект подписал информированное согласие.

В группу РС вошли взрослые пациенты с подтвержденным рецидивирующе-ремиттирующим РС (PPPC) или клинически изолированным синдромом (КИС) в соответствии с пересмотренными диагностическими критериями Мак-Дональда. ([Thompson et al., 2018](#)), с максимальной оценкой 5 баллов по шкале EDSS (расширенная шкала оценки степени инвалидизации), которые не проходили терапию, модифицирующую заболевание (МЗТ), за год до включения в исследование. Мы исключили пациентов с прогрессирующим рассеянным склерозом, неясными диагностическими критериями, активной патологией желудочно-кишечного тракта, беременных, кормящих грудью или получавших длительное лечение пробиотиками, противовирусными препаратами, антибиотиками, нестероидными противовоспалительными препаратами или ингибиторами протонной помпы в течение последних 6 месяцев. Из всех пациентов у 7 в прошлом наблюдались преходящие умеренные патологии желудочно-кишечного тракта, но при включении в исследование отсутствовали активные желудочно-кишечные симптомы, у 4 пациентов в анамнезе были абдоминальные операции, и у 4 пациентов была эндокринная патология (в основном связанная со щитовидной железой) под медицинским контролем. Другие патологии (артериальная гипертензия, сахарный диабет) встречались в единичных случаях и были

клинически компенсированы в начале исследования. Группу контроля составили здоровые лица без РС, сопоставимые по возрасту и полу с больными РС, без диагностированной патологии и не получавшие лечения по поводу хронических заболеваний. Все участники заявили, что во время исследования не было серьезных изменений в их питании или образе жизни.

В начале исследования каждый участник предоставил образец кишечника. После получения первой пробы им назначали форму лечения в зависимости от нескольких факторов, таких как тяжесть заболевания, согласие пациента, сопутствующие заболевания, безопасность препарата и доступность препарата.

(Chikramane et al., 2010).

Некоторые пациенты на тот момент отказались от традиционной терапии; однако они согласились на гомеопатическое лечение. Второй образец был получен через 2 месяца после начала лечения.

Что касается распределения гомеопатического лечения, то каждый пациент получил свой индивидуально подобранный препарат в соответствии с симптомами РС, включая один из следующих препаратов: Phosphorus, Lycoperodium, Natrium muriaticum, Lac Caninum, Nux Vomica, Lachezis, Nitric acid, Rhus Toxicodendron, Tarentula Hispanica, Pulsatilla, Calcarea Carbonica, Sulphur, Ignatia, Aconitum или Causticum в концентрации 20СН или 200СН. Данные вещества были назначены неврологом, аккредитованным в гомеопатии, и пациенты принимали их ежедневно, по 7 гранул сублингвально, 3 дня подряд - для пациентов с концентрацией 200СН; и от 1 до 3 месяцев - для пациентов с концентрацией 30СН.

Наши пациенты с РС были разделены на отдельные группы в соответствии с их лечением, как представлено в Таблице 1. Группа G-МЗТ получала модифицирующее заболевание терапию: внутримышечно интерферон бета 1а, 30 мкг/0,5 мл 1 раз в неделю (подгруппа G-ИФН) или пероральный терифлуномид 14 мг в день (подгруппа G-ТЕР). Группа G-МЗТ + ГОМ получала МЗТ в сочетании с гомеопатией: G-ИФН + ГОМ интерферон бета1а и гомеопатия, G-ТЕР + ГОМ терифлуномид и гомеопатия. Группа G-ГОМ состояла на гомеопатическом лечении. Контрольная группа, G-ГК, была сформирована из ГК (без лечения).

Таблица 1 Group naming convention.

Группа	Количество участников	Подгруппа	Количество участников
G-МЗТ (МЗТ)	20	G-ИФН (interferon beta1a) G-ТЕР (teriflunomide)	10 10
G2-МЗТ + ГОМ (МЗТ+ гомеопатия)	19	G-ИФН + ГОМ (interferon beta1a + гомеопатия) G-ТЕР + ГОМ (teriflunomide+ гомеопатия)	9 10
G-ГОМ (гомеопатия)	11		
G-ГК (ГК)	21		
G-РС (все пациенты с РС)	50		

Табл. 1 суммирует сокращения наименований групп.

Сокращения: МЗТ = модифицирующая заболевание лечение, ГК = группа контроля (здоровые).

- [Открыть таблицу](#)

2.2 Сбор образцов

Все участники предоставили образцы кала в соответствии с лабораторными инструкциями: в любое время суток, без ограничений, с использованием специальных

контейнеров для сбора кала. Предоставленные образцы хранились при температуре минус 20 градусов по Цельсию, а затем отправлялись в лабораторию для выделения ДНК. У каждого субъекта было собрано по два образца фекалий: один до лечения (образец 1, S1) и один через два месяца после начала терапии или включения в исследование (образец 2, S2).

2.3 Секвенирование и статистический анализ 16s рРНК

В метагеномном анализе повсеместно присутствующего гена рибосомальной РНК (рРНК) субъединицы 16S использовались специфические гипервариабельные области (V1-V3, V3-V4, ITS1 и ITS2) на платформе Illumina MiSeq. Результатом являются ОТЕ (операционные таксономические единицы), микроорганизмы, которые имеют сходство ДНК не менее 97% с лабораторной базой данных, классифицированные по определенным таксонам, с их частотой и относительной численностью.

Разнообразие кишечной микробиоты представляет собой математическую меру вариабельности, характеризующуюся богатством (количеством различных видов) и равномерностью (однородностью различных видов). Для альфа-разнообразия, разнообразия в пределах выборки, индекс Чао является оценкой видового богатства. Индексы Шеннона и Симпсона являются параметрами как богатства, так и равномерности, их значения увеличиваются с увеличением количества видов и более равномерным распределением. (Kim et al., 2017).

Используя матрицы частот, каждую комбинацию пар анализировали с помощью критерия знаковых рангов Уилкоксона. Для бета-разнообразия, разнообразия между выборками, мы использовали индекс несходства Брея-Кёртиса и индекс подобия Жаккара, где графическое расстояние между ними указывает на разницу. Анализ главных координат (по англ.: PCoA) был получен из матриц относительной численности. В цифрах размера эффекта линейного дискриминантного анализа (LEfSe) используются матрицы относительной численности для расчета дифференциальной численности организмов между РС и ГК с альфа-значением 0,05 и пороговым значением логарифмического линейного дискриминантного анализа (LDA) 2,0. Все функции имеют оценку ниже -2,0 или выше 2,0. Бактерии, обогащенные для пациентов с рассеянным склерозом, представлены красным цветом, а бактерии, которых больше в ГК, окрашены в зеленый цвет. В сложенных столбцах относительной численности каждый столбец представляет среднюю относительную численность 25 основных видов, выбранных в соответствии с наиболее распространенными видами по отношению к обеим группам. Также были созданы тепловые карты.

3. Результаты

Когорта РС состояла из 31 женщины и 19 мужчин со средним возрастом $30,5 \pm 9,9$ года, у 44 из них был диагностирован РППС и у 6 - КИС, средний балл по расширенной шкале статуса инвалидности (EDSS) 1,8 балла и средний показатель заболевания продолжительность 3,4 года. Все специфические характеристики РС представлены в Табл. 2. Большинство из них не получали до этого лечения (без предшествующего лечения, модифицирующего заболевание (МЗТ)), только 4 пациента получали лечение, которое было прервано в предыдущем году.

Таблица 2 Специфические особенности нашей группы рассеянного склероза (РС)

Характеристики	Пациенты РС (n = 50)
РС тип, n (%)	
РППС	44 (88%)
КИС	6 (12%)

Характеристики	Пациенты РС (n = 50)
Балл EDSS , средний (СО)	1.8 (0–5)
Подтвержденная продолжительность заболевания, средняя (СО) (у)	3.4 (6.2)
Количество рецидивов, среднее (СО)	2.5 (2.13)
MMSE score, mean	29.4
Лечение, n (%)	
Teriflunomide	10 (14.28%)
Interferon beta1a	10 (14.28%)
Teriflunomide+ гомеопатия	10 (14.28%)
Interferon beta+ гомеопатия	9 (12.8%)
Гомеопатия	11 (15.7)

Сокращения: РС = рассеянный склероз, n = количество пациентов, СО = стандартное отклонение, у = годы, РРРС = рецидивирующее-ремиттирующий РС, КИС = клинически изолированный синдром, EDSS = Expanded Disability Status Scale= расширенная шкала статуса инвалидности, MMSE = Mini-Mental State Exam= Краткая шкала оценки психического статуса.

- [Открыть таблицу](#)

Здоровая контрольная группа (ГК) была собрана из людей с такими же демографическими характеристиками, что и группа РС: 62% женщин и 38% мужчин, средний возраст $28 \pm 9,7$ лет.

3.1 Разнообразие микробиома

Мы изучили общие различия в микробном составе, используя альфа- и бета-разнообразие. Не было статистически значимой разницы в альфа-разнообразии между пациентами с РС и ГК до лечения ($p = 0,85$) и после лечения ($p = 0,95$). Также не было различий между другими комбинациями групп для образца 2 (S2): Г-МЗТ против Г-ЗМТ + ГОМ ($p = 0,89$), Г-ЗМТ + ГОМ против Г-ГОМ ($p = 0,98$), Г-МЗТ против G-ГОМ ($p = 0,64$) и их подгрупп, G = IFN + ГОМ против G-ТЕР + ГОМ ($p = 0,23$), G-IFN против G-IFN + ГОМ ($p = 0,06$) между образцом 1 (S1) и S2 для больных РС ($p = 0,93$), G-МЗТ + ГОМ ($p = 0,38$) или G-ГОМ ($p = 0,79$). Кроме того, не было различий в альфа-разнообразии между пациентами с РС, получавшими МЗТ (Г-МЗТ в сочетании с Г-МЗТ + ГОМ), и пациентами, не получавшими МЗТ (Г-ГОМ), $p = 0,81$. Все значения p представлены в таблице 3.

Таблица 3 Обзор всех значений p для микробного разнообразия.

Сравнение	Альфа-разнообразие			Бета разнообразие	
	Чео	Шеннон	Симпсон	Брей-Кёртис	Жаккард
G-ГК против G-РС (S1)	$p = 0.85$	$p = 0.33$	$p = 0.55$	$p = 0.15$	$p = 0.13$
G-ГК против G-РС (S2)	$p = 0.95$	$p = 0.16$	$p = 0.39$	$p = 0.14$	$p = 0.12$
G-ЗМТ против G-ЗМТ + ГОМ (S2)	$p = 0.89$	$p = 0.69$	$p = 0.59$	$p = 0.85$	$p = 0.9$
G-ЗМТ + ГОМ против G-ГОМ (S2)	$p = 0.98$	$p = 0.97$	$p = 0.87$	$p = 0.12$	$p = 0.2$
G-ЗМТ против G-ГОМ (S2)	$p = 0.64$	$p = 0.8$	$p = 1$	$p = 0.15$	$p = 0.13$
G-ЗМТ объединенное с G-ЗМТ + ГОМ против G-ГОМ (S2)	$p = 0.81$	$p = 0.91$	$p = 0.91$	$p = 0.19$	$p = 0.2$
G-ИФН против G-ИФН + ГОМ (S2)	$p = 0.06$	$p = 1$	$p = 0.84$	$p = 0.06$	$p = 0.06$
G-ТЕР против G-ТЕР + ГОМ (S2)	$p = 0.13$	$p = 0.68$	$p = 0.68$	$p = 0.23$	$p = 0.35$
G-ИФН + ГОМ против G-ГОМ (S2)	$p = 0.47$	$p = 0.41$	$p = 0.66$	$p = 0.06$	$p = 0.06$
G-ТЕР + ГОМ против G-ГОМ (S2)	$p = 0.55$	$p = 0.39$	$p = 0.47$	$p = 0.007$	$p = 0.012$
G-ИФН против G-ГОМ (S2)	$p = 0.2$	$p = 0.35$	$p = 0.72$	$p = 0.012$	$p = 0.016$
G-ТЕР против G-ГОМ (S2)	$p = 0.62$	$p = 0.62$	$p = 0.72$	$p = 0.62$	$p = 0.33$

Сравнение	Альфа-разнообразие			Бета разнообразие	
	Чао	Шеннон	Симпсон	Брей-Кёртис	Жаккард
G-ИФН + ГОМ против G-ТЕР + ГОМ (S2)	$p = 0.23$	$p = 0.14$	$p = 0.14$	$p = 0.06$	$p = 0.11$
S1 против S2 (G-РС)	$p = 0.93$	$p = 0.26$	$p = 0.36$	$p = 0.88$	$p = 0.93$
S1 против S2 (G-3МТ + ГОМ)	$p = 0.38$	$p = 0.6$	$p = 0.69$	$p = 0.95$	$p = 0.99$
S1 против S2 (G-ГОМ)	$p = 0.79$	$p = 0.4$	$p = 0.44$	$p = 0.98$	$p = 0.98$
S1 против S2 (G-ИФН + ГОМ)	$p = 0.96$	$p = 0.86$	$p = 0.8$	$p = 0.87$	$p = 0.93$
S1 против S2 (G = ТЕР + ГОМ)	$p = 0.24$	$p = 0.58$	$p = 0.68$	$p = 0.96$	$p = 0.98$

· Значения, выделенные жирным шрифтом, являются статистически значимыми. В этой таблице представлены конкретные сравнения между нашими группами и примененными индексами разнообразия, а также значение p каждого теста. Сокращения: S1 = образец 1; S2 = образец 2.

- [Открыть таблицу в новом окне](#)

Когда мы анализировали бета-разнообразие, была обнаружена разница для S2 между G-ГОМ и G-ТЕР + ГОМ ($p = 0,007$) (рис. 1) и между G-ГОМ и G-ИФН ($p = 0,012$), но нет статистически значительной разницы между пациентами с РС и ГК или между двумя выборками для пациентов с РС (все $p > 0,05$). Другие результаты представлены в таблице 3 и на рис. 1* (*дополнительные файлы данных).

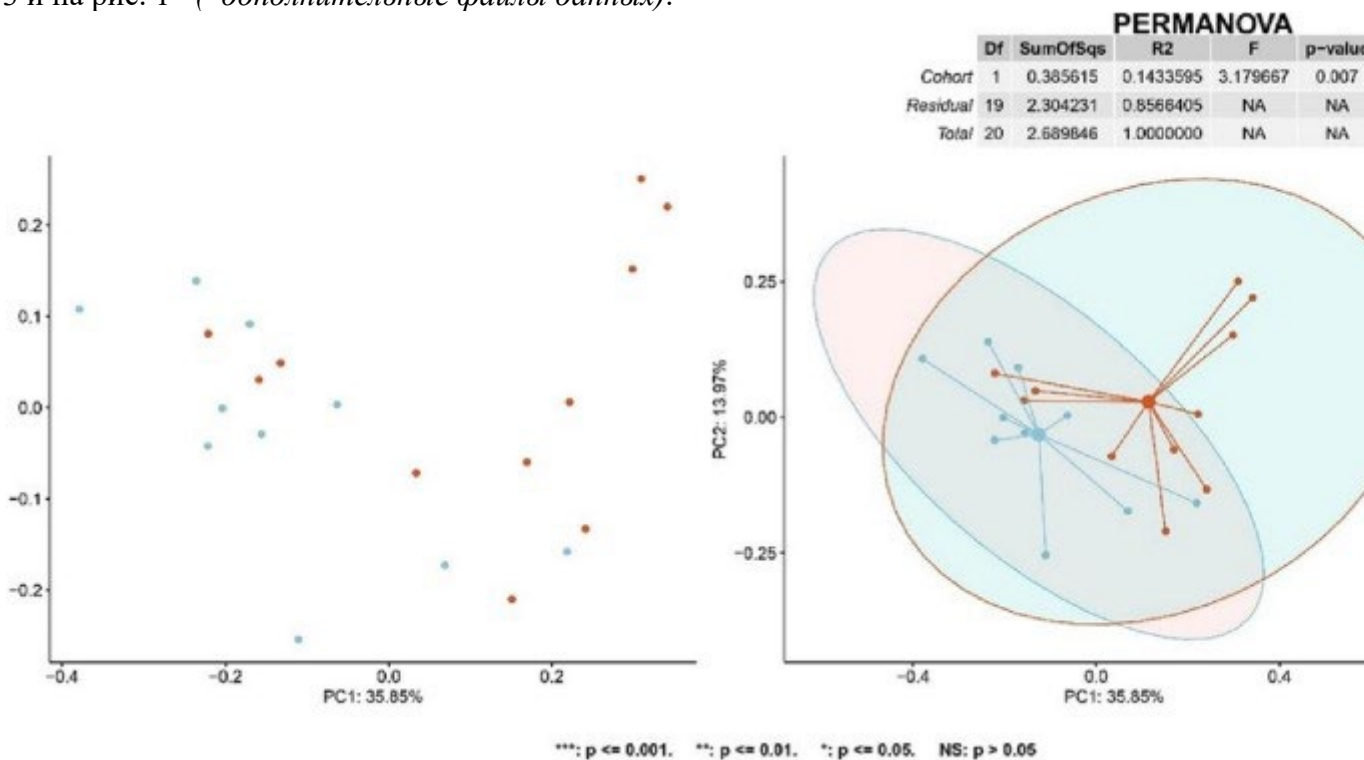


Рис. 1 Анализ главных координат Брея-Кёртиса (PCoA), гомеопатия + терифлуномид (G-ТЕР + ГОМ) в сравнении с группой на гомеопатии (G-ГОМ), образец 2.

[Show full caption](#)

- [View Large Image](#)
- [Figure Viewer](#)
- [Загрузить изображение Hi-res image](#)
- [Загрузить \(PPT\)](#)

3.2 Таксономические различия

Результаты анализа 16S включают частоту и относительную численность видов.

Для когорты РС мы определили 51 операционную таксономическую единицу (ОТЕ) на уровне типа, большинство из которых составляют *Firmicutes* (49,45%), *Bacteroidetes* (34,3%), *Actinobacteria* (4,77%) и *Proteobacteria* (3,6%). На уровне видов мы проанализировали 1505 ОТЕ с самой высокой относительной численностью *Prevotella copri* (10,75%) и *Bacteroides* (10,3%), за которыми следуют *Faecalibacterium prausnitzii* (6,63%) и *Blautia* (4,49%).

Мы проанализировали таксономические различия между нашей когортой РС (G-РС) и ГК (G-ГК) до любого лечения (S1). Нелеченные пациенты с РС по сравнению с ГК имели повышенную относительную численность представителей типа *Lentisphaerae* ($p = 0,005$), видов *Prevotella stercorea* ($p = 0,02$) (тип *Bacteroidetes*). У них был снижен уровень *Actinobacteria* phylum ($p = 0,01$), с его видами *Bifidobacterium* ($p = 0,01$) и *Bifidobacterium Teenis* ($p = 0,007$), а также снижен уровень *Bacteroides coprophilus* ($p = 0,02$) (из *Bacteroidetes* phylum). Тип *Firmicutes* имеет сниженную относительную численность *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0,03$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,01$), *Staphylococcus hominis* ($p = 0,02$) и бактерии *Staphylococcus* ($p = 0,02$). *Proteobacteria* phylum имеет пониженное количество *Haemophilus* ($p = 0,04$) и *Escherichia coli* ($p = 0,04$). Остальные статистически значимые различия представлены на рис. 2А, рис. 2*-4*.

A

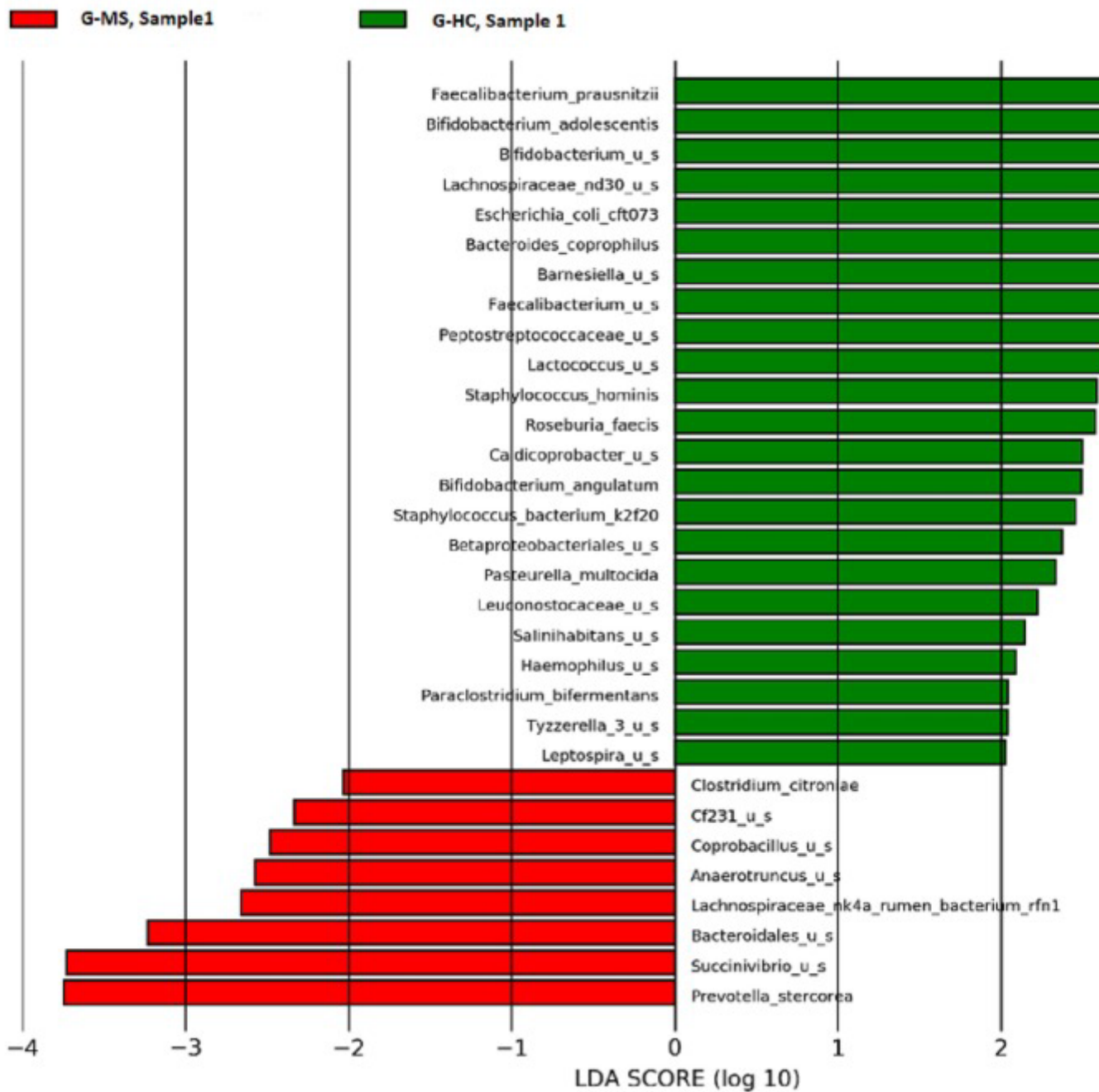


Рис. 2А. Размер эффекта линейного дискриминантного анализа (Lefse) на уровне видов между пациентами с рассеянным склерозом (G-PC) и здоровыми участниками (G-ГК) до любого лечения (образец 1).

- [View Large Image](#)
- [Figure Viewer](#)
- [Загрузить изображение Hi-res image](#)
- [Загрузить \(PPT\)](#)

Когда мы проанализировали вторые образцы, результаты для пациентов, получавших лечение по поводу РС, по сравнению с пациентами из ГК, немного отличались: было меньше *Bifidobacterium* ($p = 0,02$), *Ruminococcus* ($p = 0,04$) и *Clostridiales* ($p = 0,01$) и более высокая распространенность *Gemella*. ($p = 0,04$), *Megasphaera* ($p = 0,02$) и *Prevotella stercorea* ($p = 0,02$) для пациентов с РС по сравнению с ГК (рис. 2В, рис. 5 *-7 *).

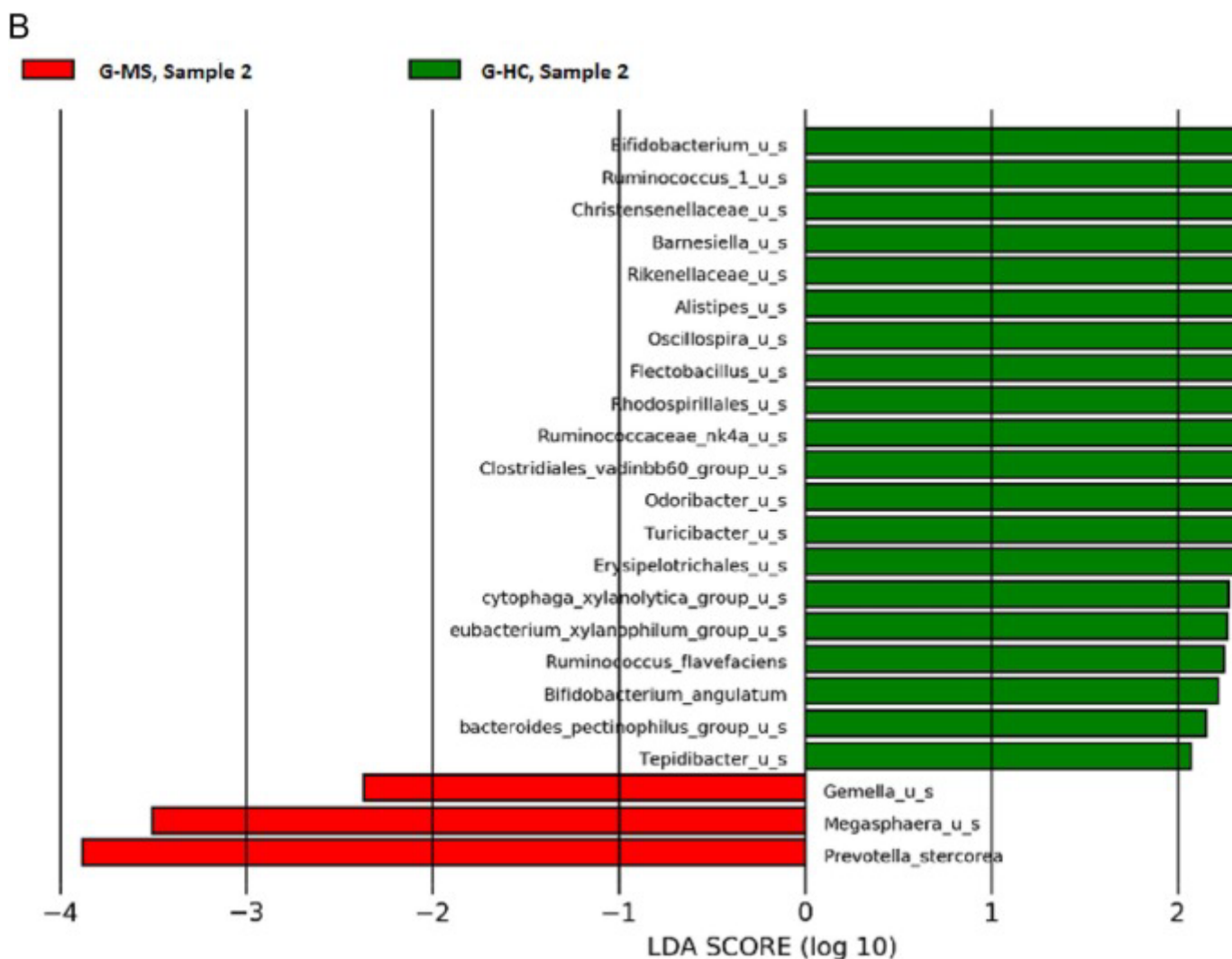


Рис. 2В Анализ Lefse различий на уровне видов между пациентами с рассеянным склерозом (G-PC) и здоровыми участниками (G-ГК) после двух месяцев лечения (образец 2).

- [View Large Image](#)
- [Figure Viewer](#)
- [Загрузить изображение Hi-res image](#)
- [Загрузить \(PPT\)](#)

Мы проанализировали различные сравнения между группами после двух месяцев лечения. При анализе микробиоты пациентов с РС, получавших МЗТ (G-МЗТ), по сравнению с пациентами, получавшими дополнительное гомеопатическое лечение (G-МЗТ + ГОМ), мы выделили следующие результаты. По сравнению с G-МЗТ + ГОМ, G-МЗТ увеличивал относительную численность *Catenibacterium* ($p = 0,02$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,02$), *Sharpea* ($p = 0,02$) и *Gammaproteobacteria* ($p = 0,02$) и снижал уровень *Shuttleworthia* ($p = 0,02$), *Cytophaga* ($p = 0,03$) и *Rumen* ($p = 0,02$). *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* ($p = 0,03$) более распространены в подгруппе G-ИФН по сравнению с G-ИФН + ГОМ после лечения. С другой стороны, G-ИФН + ГОМ показывает более высокие уровни *Proteobacteria* ($p = 0,02$), *Escherichia shigella* ($p = 0,01$), *Barnesiella* ($p = 0,03$), *Serratia* ($p = 0,008$), *Lactobacillus zeae* ($p = 0,02$). В группе G-ТЕР преобладают *Escherichia shigella* ($p = 0,007$), *Lactobacillus* ($p = 0,01$), *Enterobacter* ($p = 0,02$), *Enterococcus faecalis* ($p = 0,03$), чем при G-ТЕР + ГОМ, тогда как G-ТЕР + ГОМ показывает более высокие признаки *Rikenellaceae* ($p = 0,01$) и *Lachnospiraceae* ($p = 0,02$). Мы также сравнили две группы, получавшие гомеопатическое лечение, G-МЗТ + ГОМ и

G-ГОМ. Мы отметили, что G-МЗТ + ГОМ обеспечивает более высокую относительную численность *Megasphaera* ($p = 0,04$), *Eubacterium oxidoreducens* ($p = 0,02$), *Veillonellaceae* ($p = 0,02$) и *Gardnerella* ($p = 0,02$) по сравнению с G-ГОМ. G-ГОМ был обогащен *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0,01$), *Akkermansia muciniphila* ($p = 0,02$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,003$), *Bacteroides acidifaciens* ($p = 0,04$) и *pectinophilus* ($p = 0,03$), *Veilonella* ($p = 0,01$). , по сравнению с G-МЗТ + ГОМ (рис. 8*-20*).

Еще одним интересующим нас вопросом в данном исследовании было выделение того, как изменяется микробиом во времени, с момента назначения пациентам терапевтической схемы (S1) до двух месяцев после начала лечения (S2). Для когорты РС таксономические изменения показаны на рис. 3 с наиболее многочисленными 25 организмами.

Статистически значимые различия между двумя выборками были более преобладающими для типа *Firmicutes*, так как были выявлены сниженные уровни для *Ruminococcus* ($p = 0,03$), *Oscillospira* ($p = 0,0004$), *Anaerotruncus* ($p = 0,02$), *Lachnoclostridium* ($p = 0,01$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,02$) и *Eubacterium oxidoreducens* ($p = 0,04$) у пациентов с РС после лечения по сравнению с исходным образцом. У пациентов, получавших лечение по поводу РС, были представлены более разнообразные бактериальные изменения с увеличением типов *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* $p = 0,04$) после лечения по сравнению с тем, как было до лечения (рис. 21*-25*).

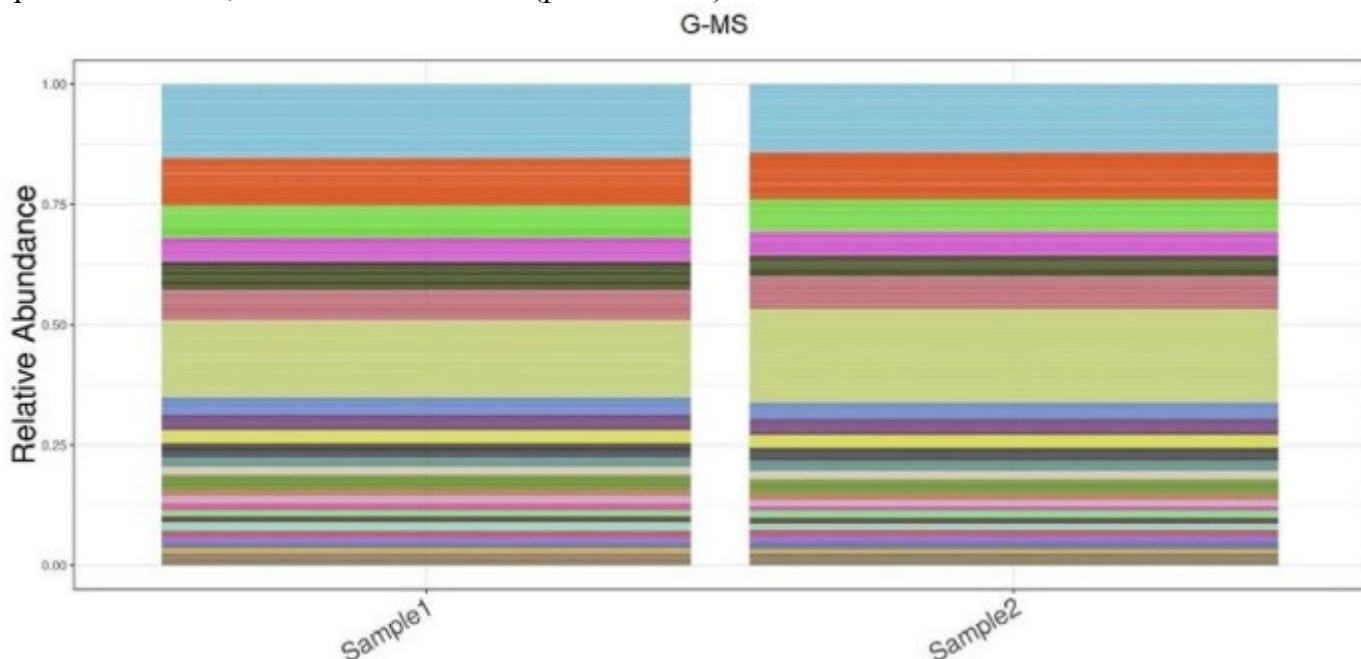


Рис. 3. Линейчатые диаграммы с накоплением: сравнение образца 1 и образца 2 для когорты с РС, топ-25 видов.

- [View Large Image](#)
- [Figure Viewer](#)
- [Загрузить изображение Hi-res image](#)
- [Загрузить \(PPT\)](#)

Группа G-МЗТ + ГОМ показала более низкую относительную численность некоторых компонентов *Firmicutes* (*Oscillospira* $p = 0,01$, *Lachnoclostridium* $p = 0,03$, *Lachnospiraceae* $p = 0,03$) и *Proteobacteria* (*Helicobacteraceae* $p = 0,01$, *Undibacterium* $p = 0,03$) после лечения по сравнению с исходной отметкой. В группе только с гомеопатическим лечением (G-ГОМ) после лечения было снижено количество *Eubacterium oxidoreducens* по сравнению с первым образцом ($p = 0,03$) (рис. 25*-32*).

4. Дискуссия

Наши данные не выявили серьезных изменений в разнообразии между пациентами с РС и ГК до или после любого вида лечения. По сравнению с ГК, у нелеченных пациентов было повышено содержание *Prevotella stercorea* и снижены уровни *Actinobacteria* и *Faecalibacterium prausnitzii*. Таксономические изменения после двух месяцев лечения были немного иными, с повышением уровня *Gemella* и снижением уровня *Ruminococcus* у субъектов с РС. Сравнение между группами после лечения подчеркивает различные таксономические модификации. Например, у пациентов, получавших гомеопатическое лечение, наблюдалось увеличение *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides* по сравнению с комбинированной терапией. Кроме того, были получены значимые результаты бета-разнообразия для группы на гомеопатии по сравнению с группой на гомеопатии в сочетании с терифлуноmidом, а также для группы на гомеопатии по сравнению с группой на интерфероне бета1а. Анализируя изменения, которые произошли во времени между двумя образцами, мы заметили снижение уровней *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae* и *Eubacterium oxidoreducens* среди пациентов, получавших лечение по поводу РС, по сравнению с их исходным образцом. Гомеопатия со временем вызвала уменьшение количества *Eubacterium oxidoreducens*.

Существует консенсус в отношении того, что здоровая микробиота характеризуется балансом между микроорганизмами и хозяином с большим разнообразием, стрессоустойчивостью и стабильностью для поддержания гомеостаза хозяина и иммунных функций. (Freedman et al., 2018).

Хотя внешние факторы могут быстро изменить микробиоту, здоровые устойчивые бактерии возвращаются к своему первоначальному составу и изменяются только при наличии факторов, имеющих устойчивый характер. Более высокое биоразнообразие означает более высокие различия между видами и, следовательно, большее количество биологических функций, которые они могут выполнять, лучшую стабильность, способность противостоять изменениям и восстанавливаться.

(Riccio and Rossano, 2018).

Дисбактериоз относится к дисбалансу бактериального состава с увеличением вредных микроорганизмов и уменьшением полезных видов с изменением состояния в сторону воспаления. (Freedman et al., 2018).

Мы замечаем в профилях микробиоты когорты с РС увеличение количества *Firmicutes* и *Actinobacteria* и уменьшение количества *Bacteroidetes*. Эти изменения характерны для типичной западной диеты с высоким содержанием жиров и сахара, где *Firmicutes* более способны извлекать энергию из пищи, способствуя увеличению веса. С другой стороны, диета, основанная на сложных углеводах, богатая клетчаткой, способствует увеличению *Bacteroidetes* и полезных метаболитов.

(Magne et al., 2020).

Терапия рассеянного склероза может модулировать микробиоту кишечника, но до сих пор нет убедительных доказательств в исследованиях на людях. Бета-интерферон ингибирует Т-клетки и провоспалительные цитокины, стимулирует регуляторные Т-лимфоциты и супрессивные В-клетки, модулирует взаимодействие между микробами и эпителиальными клетками и стабилизирует кишечный барьер путем активизации белков плотных контактов в эндотелиальных клетках. Терифлуноmid ингибирует дигидрооротатдегидрогеназу, синтез пиримидинов и провоспалительных цитокинов и может влиять на микробиом кишечника, подавляя сигнальный путь STAT-6, увеличивая количество специфических Т-регуляторных клеток. (Camara-Lemarroy et al., 2018; Baecher-Allan et al., 2018).

4.1 Сравнение пациентов с РС и ГК на исходном уровне

В нашем исследовании ни один из показателей альфа- или бета-разнообразия существенно не отличался между пациентами с РС и ГК до начала лечения. Это говорит о том, что микробиота пациентов с рассеянным склерозом не проявляет признаков необычных тенденций, что соответствует опубликованным исследованиям. ([Mirza et al., 2020](#)).

На уровне таксономии мы наблюдали несколько организмов, относительная численность которых значительно отличалась между случаями РС и ГК. *Actinobacteria* — полезные микроорганизмы, играющие роль в формировании иммунной системы ([Adamczyk-Sowa et al., 2017](#)), и их уровень ниже среди больных РС. Количество *Bifidobacterium* уменьшилось в нашей когорте РС. В литературе приводятся противоречивые данные об их роли в иммунных заболеваниях, но большинство исследований показали, что *Bifidobacterium* индуцируют противовоспалительный иммунный ответ.

([Budhram et al., 2017](#); [Tankou et al., 2018](#)).

Род *Prevotella* — это хорошо изученные бактерии при РС, участвующие в метаболизме фитоэстрогенов, которые обычно считаются менее распространенными при РС и более присутствующими у пролеченных пациентов.

([Chen et al., 2016](#); [Brown et al., 2021](#)).

Наши пациенты с рассеянным склерозом демонстрировали более высокие уровни одного вида по сравнению с ГК до или после лечения, *Prevotella stercorea*, но нет соответствующих данных о роде *Prevotella*. Вероятно, это связано с тем, что в этом роде есть несколько видов с разной ролью.

([Mirza et al., 2020](#)).

Некоторые бактериальные метаболиты могут непосредственно влиять на центральную нервную систему, например короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), которые играют иммунодепрессивную роль в слизистой оболочке кишечника. *Faecalibacterium prausnitzii* и *Bacteroides coprophilus* участвуют в метаболизме КЦЖК.

([Freedman et al., 2018](#)).

Bacteroides является полезной бактерией, стимулирующей ИЛ-10, и обычно присутствует в более низких количествах в случаях рассеянного склероза. *Faecalibacterium prausnitzii* считается маркером здоровой микробиоты, и она истощена среди пациентов с РС, как это можно наблюдать в литературе ([Tremlett et al., 2016](#)), а также в нашей когорте. Все эти различия в таксономии бактерий по сравнению с ГК предполагают дисбактериоз микробиоты в случаях РС.

4.2 Сравнение групп после лечения

При анализе того, значительно ли лечение (любого рода) рассеянного склероза меняет микробиом, мы отметили, что нет серьезных изменений в альфа- или бета-разнообразии для пациентов с рассеянным склерозом по сравнению с ГК в течение двух месяцев после начала любой формы терапии, как следует из опубликованных исследований ([Mirza et al., 2020](#)).

Что касается изменений в таксономии, то *Ruminococcus* является полезной бактерией и она обычно восстанавливается в случаях РС после МЗТ ([Zhu et al., 2020](#)), наши данные отражают более низкую относительную распространенность среди пациентов с РС по сравнению с ГК для второго образца. *Clostridium* представляет собой бактерию, продуцирующую бутират (соль масляной кислоты), участвующую в производстве регуляторных Т-клеток и противовоспалительного цитокина ИЛ-10 ([Miyake et al., 2015](#)), и ее количество снижается у пациентов с РС после лечения.

Различия между группами после двух месяцев терапии указывают на возможное вмешательство искажающих факторов: МЗТ или гомеопатическое лечение, - на микробиом кишечника. Гомеопатия может влиять на микробиоту кишечника, как показывают наши данные. Изменения между пациентами, получавшими любую форму МЗТ (G-МЗТ) и комбинацию МЗТ и гомеопатии (G-МЗТ + ГОМ), незначительны, но мы

заметили большое количество существенных различий в относительной численности бактерий между подгруппами, где изменения частично непоследовательны и противоречивы. Пара G-ИФН и G-ИФН + ГОМ описывает возможное влияние гомеопатии на пациентов, получавших интерферон бета1а, в то время как пара G-ТЕР и G-ТЕР + ГОМ предполагает его влияние на пациентов, получающих терифлуноמיד.

По сравнению с комбинированной терапией у пациентов, получавших гомеопатию, наблюдалось увеличение *Akkermansia muciniphila*, спорного вида с неизвестной ролью в созревании иммунитета, повышенного среди нелеченых пациентов с рассеянным склерозом ([Cekanaviciute et al., 2017](#)).

Эксперименты *in vitro* указывают на его провоспалительную роль, но исследования *in vivo* не воспроизвели эти эффекты, а наоборот, этот вид может иметь благотворное действие при некоторых метаболических нарушениях. Хотя выбор терапии не влиял на альфа-разнообразие ни в одной группе, мы обнаружили отдельные различия в бета-разнообразии, как и в нашем исследовании ([Mirza et al., 2020](#)).

Наши результаты были связаны с гомеопатией и интерфероном бета1А как видами лечения, которое могло изменить разнообразие микробиома. Бета-разнообразие в группе, получавшей гомеопатическое лечение, отличалось от группы, получавшей комбинацию гомеопатии и терифлуномида. Кроме того, группа, получавшая гомеопатию, имела бета-разнообразие, отличное от группы, получавшей интерферон бета1А, все значения *p* представлены в Таблице 3. При статистически незначимом значении *p*, равном 0,06, близком к 0,05, группа, получавшая лечение интерфероном, имела незначительное изменение бета-разнообразия по сравнению с группой интерферона и гомеопатии. Эти результаты предполагают, что гомеопатия может играть роль в бета-разнообразии пациентов с рассеянным склерозом, но необходимы дальнейшие исследования.

Анализируя относительное обилие в выбранных типах и видах, мы заметили снижение количества *Firmicutes* в группе, получавшей комбинированную терапию, по сравнению с другими группами, но не являющееся статистически значимым. *Firmicutes* связаны с более коротким временем рецидива рассеянного склероза ([Sand and aranzini, 2018](#)), и, таким образом, сочетание этих двух методов лечения может быть полезным для замедления прогрессирования заболевания.

Две полезные бактерии, участвующие в метаболизме КЦЖК: *Bacteroides* и *Faecalibacterium prauznitzii*, - имеют одинаковую относительную численность для ГК и группы гомеопатии, примерно 12% для *Bacteroides* и, соответственно, 7% для *Faecalibacterium*. Это говорит о том, что гомеопатическое лечение может играть определенную роль в поддержании баланса этих здоровых микроорганизмов.

4.3 Сравнение по времени (между вторым и первым образцом)

Изменения микробиома во времени были проанализированы для когорты РС, где результаты описывают эффекты всех методов лечения, примененных в нашем исследовании: МЗТ, гомеопатии или их комбинации. У пациентов, получавших лечение по поводу РС, наблюдались более разнообразные бактериальные изменения из нескольких типов, что позволяет предположить, что лечение может оказывать положительное влияние на микробиоту в целом. У пациентов после лечения наблюдалась более низкая относительная численность *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*, *Eubacterium oxidoreducens*, как и ожидалось согласно опубликованным исследованиям ([Mirza et al., 2020](#)).

Lachnospiraceae участвует в снижении проницаемости слизистой за счет продукции КЦЖК и повышенной экспрессии белков плотных контактов в эпителиальных клетках. ([Rinninella et al., 2019](#)).

Для двух групп, включая гомеопатию, G-МЗТ + ГОМ и G-ГОМ, бактерии, более распространенные до лечения, были ослаблены во втором образце. Это говорит о том, что

гомеопатическое лечение или его комбинация с МЗТ оказали влияние на микробиоту кишечника после двух месяцев лечения.

Гомеопатическое лечение не изучалось применительно к микробиоте кишечника у пациентов с рассеянным склерозом, и не было найдено соответствующих исследований, с которыми можно было бы сравнить наши результаты. Наши пациенты, которые получали только гомеопатическое лечение, демонстрировали относительную стабильность после 2 месяцев лечения, с единственной статистически значимой модификацией *Eubacterium oxidoreducens*, менее распространенной во втором образце. Также, в группе, получавшей комбинацию терапий, есть несколько видов бактерий, которые были менее распространены во втором образце. Эти результаты позволяют предположить, что пациенты, получающие гомеопатическое лечение, могут иметь более стабильный микробиом.

4.4 Сильные стороны и ограничения

Наше исследование вносит свой вклад в эту область медицины, потому что оно анализирует образцы кишечника в динамике, сравнивая не только воздействие лечения, но и изменения, происходящие во времени. Кроме того, оно уникально тем, что также представляет гомеопатическое лечение как возможный фактор, способный принципиально повлиять на результаты исследования.

В качестве возможных ограничивающих факторов нельзя исключать или количественно оценивать всю совокупность факторов окружающей среды и диеты, которые могут влиять на микробиоту и менять ее в течение двух месяцев. Необходимы дальнейшие исследования.

5. Выводы

Микробиота пациентов с РС характеризуется дисбактериозом с различными таксономическими изменениями по сравнению с ГК. У нелеченных пациентов с рассеянным склерозом мы обнаруживаем более высокое содержание *Prevotella stercorea* и снижение количества *Actinobacterium*, *Bifidobacterium* и *Faecalibacterium prauznitzii*.

Лечение интерфероном бета 1a, терифлуномидом или гомеопатией повлекло за собой несколько таксономических изменений. Пациенты, получавшие лечение по поводу РС, имели другую микробиоту по сравнению с ГК, с уменьшенным количеством *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* и *Clostridiales* и более высокой распространенностью *Gemella*, *Megasphaera* и *Prevotella stercorea*.

Сравнивая второй образец с первым, мы выявили изменения в микробиоте пациентов с РС во времени, такие как уменьшение *Lachnospiraceae* и *Ruminococcus* и увеличение *Enterococcus faecalis*. Эти динамические изменения могут быть связаны с лечением рассеянного склероза.

В целом воздействие лечения оказало небольшое влияние на разнообразие микробиома. Единственные обнаруженные нами статистически значимые модификации разнообразия предполагают влияние гомеопатического лечения на индексы бета-разнообразия по сравнению с эффектом иммуномодулирующих препаратов. *Eubacterium oxidoreducens* также уменьшилось после гомеопатического лечения. Наши результаты показывают, что гомеопатическое лечение также влияет на микробиоту кишечника.

В этом исследовании подчеркивается важная роль кишечной микробиоты при РС и предлагаются пути дальнейшего изучения. Микробиом представляет собой обширную экосистему, на которую влияют многочисленные факторы, которые невозможно полностью количественно оценить. Наш проект был посвящен динамическим изменениям микробиоты и возможному влиянию некоторых специфических МЗТ, а также гомеопатии как комплементарной и альтернативной медицине, используемой в клинической практике.

Информация о финансировании

Данное исследование не получало финансирования.

Этическое одобрение

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией, и одобрено Комитетом по этике окружной больницы скорой помощи г. Клуж-Напока, код 2394/28.01.2020.

Заявление об информированном согласии

От всех участников исследования было получено информированное согласие.

Заявление об авторском вкладе CRediT

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 Vithoukias:** Conceptualization, Supervision.

Доступность данных

Данные и другая информация по этому исследованию доступны от соответствующего автора по запросу из соображений конфиденциальности.

Заявление о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности

Мы благодарим лабораторию CosmosID за помощь в анализе наших образцов и поддержку статистического анализа.

Приложение А. Дополнительные данные

- [Download .docx \(3.67 MB\)](#)

[Help with docx files](#)

Дополнительный материал

Анализ главных координат Жаккара, тепловые карты, размер эффекта линейного дискриминантного анализа и линейчатые диаграммы с накоплением.

Список литературы

1.

- Adamczyk-Sowa M.
- Medrek A.
- Madej P.
- Michlicka W.
- Dobrakowski P.

Does the gut microbiota influence immunity and inflammation in multiple sclerosis pathophysiology?.

J Immunol Res. 2017; **2017**: 1-14

[View in Article](#)

- [Scopus \(49\)](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

2.

- Baecher-Allan C.
- Kaskow B.J.
- Weiner H.L.

Multiple sclerosis: mechanisms and immunotherapy.

Neuron. 2018 Feb; **97**: 742-768

[View in Article](#)

- [Scopus \(458\)](#)
- [PubMed](#)
- [Abstract](#)
- [Full Text](#)
- [Full Text PDF](#)
- [Google Scholar](#)

3.

- Brown J.
- Quattrochi B.
- Everett C.
- Hong B.Y.
- Cervantes J.

Gut commensals, dysbiosis, and immune response imbalance in the pathogenesis of multiple sclerosis.

Mult. Scler. 2021 May; **27**: 807-811

[View in Article](#)

- [Scopus \(9\)](#)
- [PubMed](#)

- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

4.

- Budhram A.
- Parvathy S.
- Kremenchutzky M.
- Silverman M.

Breaking down the gut microbiome composition in multiple sclerosis.

Mult. Scler. 2017 Apr; **23**: 628-636

[View in Article](#)

- [Scopus \(28\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

5.

- Camara-Lemarroy C.R.
- Metz L.
- Meddings J.B.
- Sharkey K.A.
- Wee Yong V.

The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics.

Brain. 2018 Jul 1; **141**: 1900-1916

[View in Article](#)

- [Scopus \(97\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

6.

- Cekanaviciute E.
- Yoo B.B.
- Runia T.F.
- Debelius J.W.
- Singh S.
- Nelson C.A.
- et al.

Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2017 Oct 3; **114**: 10713-10718

[View in Article](#)

- [Scopus \(544\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

7.

- Chen J.
- Chia N.
- Kalari K.R.
- Yao J.Z.
- Novotna M.
- Paz Soldan M.M.
- et al.

Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls.

Sci. Rep. 2016 Jun; **6**: 28484

[View in Article](#)

- [Scopus \(557\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

8.

- Chikramane P.S.
- Suresh A.K.
- Bellare J.R.
- Kane S.G.

Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: a nanoparticulate perspective.

Homeopathy. 2010 Oct; **99**: 231-242

[View in Article](#)

- [Scopus \(152\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

9.

- Chu F.
- Shi M.
- Lang Y.
- Shen D.
- Jin T.
- Zhu J.
- et al.

Gut microbiota in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: current applications and future perspectives.

Mediat. Inflamm. 2018; **2018**: 1-17

[View in Article](#)

- [Scopus \(83\)](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

10.

- Fisher P.
- Ernst E.

Should doctors recommend homeopathy?.

BMJ. 2015 Jul 14; **351**h3735

[View in Article](#)

- [PubMed](#)
- [Google Scholar](#)

11.

- Freedman S.N.
- Shahi S.K.
- Mangalam A.K.

The “gut feeling”: breaking down the role of gut microbiome in multiple sclerosis.

Neurotherapeutics. 2018 Jan; **15**: 109-125

[View in Article](#)

- [Scopus \(90\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

12.

- Kim B.R.
- Shin J.
- Guevarra R.B.
- Lee J.H.
- Kim D.W.
- Seol K.H.
- et al.

Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities.

J. Microbiol. Biotechnol. 2017 Dec 28; **27**: 2089-2093

[View in Article](#)

- [Scopus \(409\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)

- [Google Scholar](#)

13.

- Kim S.
- Chang L.
- Weinstock-Guttman B.
- Gandhi S.
- Jakimovski D.
- Carl E.
- et al.

Complementary and alternative medicine usage by multiple sclerosis patients: results from a prospective clinical study.

J. Altern. Complement. Med. 2018 Jun; **24**: 596-602

[View in Article](#)

- [Scopus \(26\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

14.

- Maglione A.
- Zuccalà M.
- Tosi M.
- Clerico M.
- Rolla S.

Host genetics and gut microbiome: perspectives for multiple sclerosis.

Genes. 2021 Jul 29; **12**: 1181

[View in Article](#)

- [Scopus \(5\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

15.

- Magne F.
- Gotteland M.
- Gauthier L.
- Zazueta A.
- Pesa S.
- Navarrete P.
- et al.

The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients?.

Nutrients. 2020 May 19; **12**: 1474

[View in Article](#)

- [Scopus \(613\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

16.

- Manzalini A.
- Galeazzi B.

Explaining homeopathy with quantum electrodynamics.

Homeopathy. 2019 Aug; **108**: 169-176

[View in Article](#)

- [Scopus \(9\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

17.

- Mirza A.
- Forbes J.D.
- Zhu F.
- Bernstein C.N.
- Van Domselaar G.
- Graham M.
- et al.

The multiple sclerosis gut microbiota: a systematic review.

Multiple Scleros. Relat. Disord. 2020 Jan; **37**101427

[View in Article](#)

- [PubMed](#)
- [Google Scholar](#)

18.

- Miyake S.
- Kim S.
- Suda W.
- Oshima K.
- Nakamura M.
- Matsuoka T.
- et al.

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. 2015 Sep 14; **10**: e0137429

[View in Article](#)

- [Scopus \(498\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

19.

- Olsen S.A.

A review of complementary and alternative medicine (CAM) by people with multiple sclerosis.

Occup. Ther. Int. 2009 Mar; **16**: 57-70

[View in Article](#)

- [Scopus \(93\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

20.

- Riccio P.
- Rossano R.

Diet, gut microbiota, and vitamins D + a in multiple sclerosis.

Neurotherapeutics. 2018 Jan; **15**: 75-91

[View in Article](#)

- [Scopus \(78\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

21.

- Rinninella E.
- Raoul P.
- Cintoni M.
- Franceschi F.
- Miggiano G.
- Gasbarrini A.
- et al.

What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases.

Microorganisms. 2019 Jan 10; **7**: 14

[View in Article](#)

- [Scopus \(1219\)](#)
- [PubMed](#)

- [Crossref](#)
 - [Google Scholar](#)
- 22.

- Sand I.K.
- Baranzini S.E.

The microbiome and MS: the influence of the microbiota on MS risk and progression—session chair summary.

Mult. Scler. 2018 Apr; **24**: 587-589

[View in Article](#)

- [Scopus \(1\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

- 23.
- Strandwitz P.

Neurotransmitter modulation by the gut microbiota.

Brain Res. 2018 Aug; **1693**: 128-133

[View in Article](#)

- [Scopus \(540\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

- 24.
- Tankou S.K.
 - Regev K.
 - Healy B.C.
 - Cox L.M.
 - Tjon E.
 - Kivisakk P.
 - et al.

Investigation of probiotics in multiple sclerosis.

Mult. Scler. 2018 Jan; **24**: 58-63

[View in Article](#)

- [Scopus \(73\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

- 25.
- Thompson A.J.
 - Banwell B.L.

- Barkhof F.
- Carroll W.M.
- Coetzee T.
- Comi G.
- et al.

Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria.

Lancet Neurol. 2018 Feb; **17**: 162-173

[View in Article](#)

- [Scopus \(3285\)](#)
- [PubMed](#)
- [Abstract](#)
- [Full Text](#)
- [Full Text PDF](#)
- [Google Scholar](#)

26.

- Tremlett H.
- Fadrosh D.W.
- Faruqi A.A.
- Zhu F.
- Hart J.
- Roalstad S.
- et al.

Gut microbiota in early pediatric multiple sclerosis: a case-control study.

Eur. J. Neurol. 2016 Aug; **23**: 1308-1321

[View in Article](#)

- [Scopus \(216\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)

27.

- Whitmarsh T.E.

Homeopathy in multiple sclerosis.

Complement Therap Nurs Midwifery. 2003 Feb; **9**: 5-9

[View in Article](#)

- [Scopus \(4\)](#)
- [PubMed](#)
- [Abstract](#)
- [Full Text](#)
- [Full Text PDF](#)
- [Google Scholar](#)

28.

- Zhu S.
- Jiang Y.
- Xu K.
- Cui M.
- Ye W.
- Zhao G.
- et al.

The progress of gut microbiome research related to brain disorders.

J. Neuroinflammation. 2020 Dec; **17**: 25

[View in Article](#)

- [Scopus \(171\)](#)
- [PubMed](#)
- [Crossref](#)
- [Google Scholar](#)