

# Die Rolle von Multiple Sklerose Therapien auf die Dynamik des menschlichen Darmmikrobioms.

## Abstrakt

Die Darmmikrobiota, die Gesamtheit der Mikroorganismen in unserem Magen-Darm-Trakt, könnte eine Rolle bei Multipler Sklerose (MS), einer demyelinisierenden neurologischen Erkrankung, spielen. Unsere Studie umfasste 50 MS-Patienten und 21 gesunde Kontrollpersonen (HC). Zwanzig Patienten erhielten eine krankheitsmodifizierende Therapie (DMT), Interferon beta1a oder Teriflunomid, 19 DMT kombiniert mit Homöopathie und 11 Patienten akzeptierten nur Homöopathie. Wir haben insgesamt 142 Darmproben gesammelt, zwei für jede Person: bei Studieneinschluss und acht Wochen nach der Behandlung. Wir verglichen das Mikrobiom von MS-Patienten mit dem von HC, wir analysierten seine zeitliche Entwicklung und die Wirkung von Interferon beta1a, Teriflunomid und Homöopathie. Es gab keinen Unterschied in der Alpha-Diversität, nur zwei Beta-Diversitätsergebnisse bezogen sich auf die Homöopathie. Im Vergleich zu HC kam es bei unbehandelten MS-Patienten zu einem Rückgang von Actinobacteria, Bifidobacterium, Faecalibacterium prauznitzii und einem Anstieg von Prevotella stercorea, während bei behandelten Patienten ein Rückgang von Ruminococcus und Clostridium auftrat. Im Vergleich zur ursprünglichen Stichprobe kam es bei behandelten MS-Patienten zu einem Rückgang von Lachnospiraceae und Ruminococcus und einem Anstieg von Enterococcus faecalis. Eubacterium oxidoreducens wurde nach homöopathischer Behandlung reduziert. Die Studie ergab, dass MS-Patienten möglicherweise eine Dysbiose aufweisen. Die Behandlung mit Interferon beta1a, Teriflunomid oder Homöopathie führte zu mehreren taxonomischen Veränderungen. DMTs und Homöopathie könnten die Darmmikrobiota beeinflussen.

## Schlüsselwörter

- *Multiple Sklerose*
- *Darmmikroben*
- *Dysbiose*
- *Krankheitsmodifizierende Therapie*
- *Mikrobiom*

## 1. Einleitung

Die menschliche Darmmikrobiota besteht aus einer großen Vielfalt an Mikroorganismen, die in unserem Magen-Darm-Trakt leben. Sie wird taxonomisch in Arten, Gattungen und Stämme eingeteilt und enthält sowohl nützliche als auch pathogene Mikroben (Rinninella et al., 2019; Camara-Lemarroy et al., 2018). Sie entsteht meist in der frühen Kindheit und hängt von mehreren Faktoren ab, wie z. B. der Art der Entbindung, der Milchernährung, der Entwöhnung und der Medikation. Nach den ersten drei Lebensjahren erreicht es eine teilweise Stabilität

mit kontinuierlichen subtilen Veränderungen, die durch äußere Faktoren verursacht werden: Ernährung, Bewegung, Body-Mass-Index, Umwelteinflüsse und Medikamentenexposition (Rinninella et al., 2019). Ein Mikrobiom besteht aus den gesamten Genen, Proteinen und Metaboliten aller Organismen (Maglione et al., 2021).

Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems, bei der genetische Anfälligkeiten auf Umweltfaktoren treffen. Dazu gehören eine beeinträchtigte Integrität der Blut-Hirn-Schranke, Entzündung, Demyelinisierung, Oligodendrozytenverlust, Gliose und axonale Degeneration. Die Krankheit wird in drei Hauptstadien unterteilt: ein präklinisches Stadium, in dem die Kombination von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren ein pathologischer Auslöser sein könnte, und ein entzündliches Stadium, in dem es zu Episoden neurologischer Funktionsstörungen wie Optikusneuritis, Pyramiden-, Kleinhirn- oder Hirnstammschädigung kommt, sensorischen Symptomen, Blasenfunktionsstörungen und ein letztes neurodegeneratives Stadium des Krankheitsverlaufs, wenn wir eine fortschreitende Behinderung feststellen, vor allem bei der Gangfähigkeit des Patienten. Die Krankheit hat verschiedene klinische Formen: klinisch isoliertes Syndrom (CIS), schubförmig remittierende MS (RRMS), sekundär progrediente MS (SPMS) und primär progrediente MS (PPMS). Die mit MS verbundenen veränderbaren Risikofaktoren wurden eingehend analysiert, um eine spezifische Rolle im pathologischen Prozess, einschließlich der Zusammensetzung des Mikrobioms, zu finden (Baecher-Allan et al., 2018). Aktuelle Studien zeigen, dass MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (HC) eine andere Mikrobiomzusammensetzung aufweisen (Mirza et al., 2020).

Aufgrund der Tatsache, dass das Mikrobiom für jeden Menschen einzigartig ist und eine enorme Vielfalt an Mikroorganismen enthält, ist es schwierig, eine bestimmte gesunde Mikrobiota zu beschreiben (Rinninella et al., 2019). Eine gesunde Mikrobiota erfüllt viele wesentliche Funktionen, darunter Darmpermeabilität und -motilität, Vitaminsynthese und Absorption, aber auch die Entwicklung des angeborenen Immunsystems (Chu et al., 2018). Basierend auf dieser Rolle bei der Immunmodulation weisen neuere Studien auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Mikrobiom und einigen neurologischen immunvermittelten Pathologien hin (Mirza et al., 2020).

Das Konzept der Darmmikrobiota-Hirn-Achse bezieht sich auf verschiedene Kommunikationsmechanismen zwischen dem Magen-Darm-Trakt und dem Nervensystem (Strandwitz, 2018). Mikrobiota kann das Zentralnervensystem (ZNS) auf verschiedenen Wegen beeinflussen. Erstens betrifft es die Netzwerke des Gehirns, es moduliert verschiedene Neurotransmitter (wie Gamma-Aminobuttersäure, Serotonin, Dopamin, Histamin) und es ist mit dem sympathischen oder parasympathischen Nervensystem, insbesondere dem Vagusnerv, verbunden. Zweitens ist es als Stressreaktion am endokrinen Stoffwechsel beteiligt. Die von der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse freigesetzten Kortikoide können die Zusammensetzung der Mikrobiota verändern und die Darmpermeabilität erhöhen. Ein weiterer Mechanismus, durch den die Mikroben das Nervensystem verändern können, ist die Immunregulation. Dazu gehören eine beeinträchtigte Antigenpräsentation, Zytokin- und Lymphozytenproduktion sowie die Differenzierung verschiedener T-Zelltypen im Darm-assoziierten Lymphgewebe (GALT) (Chu et al., 2018). Darmmikroorganismen können Metaboliten (Lipopolysaccharide, Peptidoglykane) freisetzen und der Stoffwechsel kurzkettiger Fettsäuren (SCFAs) ist an der Aktivierung von Mikrogliazellen und der Leckage der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Strandwitz, 2018).

Komplementäre und alternative Medizin, einschließlich der Homöopathie, werden meist mit konventionellen Therapieformen in Verbindung gebracht, um allgemeine Symptome,

Schmerzen, Spastik, Sensibilitätsprobleme, Gehstörungen, Müdigkeit und Gedächtnisverlust zu lindern. Von allen MS-Patienten nutzen oder haben bis zu 30 % eine Form der Komplementär- und Alternativmedizin in Anspruch genommen (Kim et al., 2018). Es wird geschätzt, dass 70–80 % der MS-Patienten eine Verbesserung ihres Allgemeinzustands zeigten (Olsen, 2009). Der Grundsatz der Homöopathie „Ähnliches durch Ähnliches zu behandeln“ basiert auf der Idee, dass eine Krankheit mit Substanzen behandelt werden kann, die bei gesunden Menschen die gleichen pathologischen Symptome hervorrufen (Fisher und Ernst, 2015). Homöopathische Mittel sind stark verdünnte Naturstoffe (Manzalini und Galeazzi, 2019), eine stärker verdünnte Lösung gilt als wirksamer (Chikramane et al., 2010).

Die Wahl der Potenz hängt vom Gesundheitszustand ab: Ein niedrigerer Gesundheitszustand bedeutet eine niedrige Potenz, z.B. C30, über einen längeren Zeitraum, bis zu 3 Monate, während eine C200-Behandlung auf einige Tage begrenzt ist. Sie werden im Einzelfall verordnet und berücksichtigen neben spezifischen medizinischen Symptomen auch andere Aspekte sowie besondere psychologische Details oder relevante Alltagsgewohnheiten des Patienten (Whitmarsh, 2003). Einige Symptome bei MS werden häufig durch bestimmte Substanzen gelindert: Causticum bei Harnstörungen, Phosphorus bei Optikusneuritis, Cuprum metallicum und Nux vomica bei Krämpfen, Secale bei sensorischen Symptomen (Whitmarsh, 2003).

Wie weiter unten in diesem Manuskript dargelegt wird, wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass MS-Patienten im Vergleich zu HC-Patienten eine andere Mikrobiota haben. Es wurde beobachtet, dass MS-Behandlungen das Darmmikrobiom verändern können, Homöopathie wurde in diesem Bereich jedoch nicht untersucht.

Die Ziele dieser Studie bestehen darin, zu untersuchen, ob sich die Darmmikrobiota von MS-Patienten aufgrund von immunmodulatorischen Medikamenten oder ergänzenden homöopathischen Behandlungen, einschließlich homöopathischer Behandlung, verändert, und die Unterschiede in der mikrobiellen Taxonomie und Diversität zwischen MS und HC zu bewerten.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Themen

Die Studie war prospektiv, längsschnittlich, analytisch, beobachtend und fallkontroll-orientiert. Sie umfasste zwischen Januar 2019 und Mai 2020 50 mit MS diagnostizierte Patienten aus der neurologischen Abteilung des Notfallkrankenhauses Cluj-Napoca. Einundzwanzig HC wurden rekrutiert. Die ethische Genehmigung wurde eingeholt (Nummer 2394/28.01.2020, Notfallkrankenhaus Cluj-Napoca) und jeder Proband unterzeichnete eine Einverständniserklärung.

Die MS-Gruppe umfasste erwachsene Patienten mit bestätigter schubförmig-remittierender MS (RRMS) oder klinisch isoliertem Syndrom (CIS) gemäß den überarbeiteten McDonald-Diagnosekriterien (Thompson et al., 2018) mit einem EDSS-Score von maximal 5 Punkten, die sich ein Jahr vor Studieneinschluss keiner krankheitsmodifizierenden Therapie (DMT) unterzogen haben. Wir haben Patienten mit fortschreitender MS, unklaren Diagnosekriterien, aktiven Magen-Darm-Erkrankungen, die schwanger waren, stillten oder sich in den letzten 6 Monaten einer Langzeitbehandlung mit Probiotika, Virostatika, Antibiotika, nichtsteroidalen entzündungshemmenden Medikamenten oder Protonenpumpenhemmern unterzogen hatten, ausgeschlossen. Bei 7 aller Patienten traten in der Vergangenheit vorübergehende

leichte Magenbeschwerden auf, die jedoch bei der Aufnahme keine aktiven Magen-Darm-Symptome aufwiesen, 4 Patienten hatten in ihrer Krankengeschichte Bauchoperationen und 4 Patienten litten unter ärztlicher Kontrolle an endokrinen Erkrankungen (hauptsächlich Schilddrüsenerkrankungen). Andere Pathologien (Bluthochdruck, Diabetes) traten in Einzelfällen auf und waren zu Studienbeginn klinisch kompensiert. Die HC-Gruppe bestand aus gesunden Personen ohne MS, die hinsichtlich Alter und Geschlecht mit den MS-Patienten übereinstimmten, bei denen keine Pathologie diagnostiziert wurde und die keine chronische Behandlung erhielten. Alle Probanden gaben an, dass es während der Studie zu keinen größeren Veränderungen in ihrer Ernährung oder ihrem Lebensstil gekommen sei.

Zu Beginn der Studie stellte jeder Proband eine Darmprobe zur Verfügung. Nach der ersten Probe wurde ihnen eine Behandlungsform verschrieben, die von mehreren Faktoren wie Schwere der Erkrankung, Einwilligung des Patienten, Komorbiditäten, Arzneimittelsicherheit und Zugänglichkeit abhängig war (Chikramane et al., 2010). Manche lehnten eine konventionelle Therapie vorerst ab; Sie akzeptierten jedoch die homöopathische Behandlung. Die zweite Probe wurde 2 Monate nach Beginn der Behandlung entnommen.

Bezüglich der homöopathischen Behandlungsverteilung erhielt jeder Patient je nach seinen MS-Symptomen ein anderes individuelles Medikament, darunter eines der folgenden: Phosphorus, Lycopodium, Natrium muriaticum, Lac caninum, Nux vomica, Lachesis, Nitricum acidum, Rhus toxicodendron, Tarentula hispanica, Pulsatilla, Calcium carbonicum, Sulphur, Ignatia, Aconitum oder Causticum, mit einer Konzentration von entweder C30 oder C200. Die Substanzen wurden von einem in Homöopathie akkreditierten Neurologen verschrieben und täglich eingenommen, 7 Globuli sublingual, an 3 aufeinanderfolgenden Tagen für die Patienten, denen eine Konzentration von C200 zugewiesen wurde, und 1 bis 3 Monate für diejenigen mit der C30-Konzentration.

Unsere MS-Patienten wurden entsprechend ihrer Behandlung in separate Gruppen eingeteilt, wie in Tabelle 1 dargestellt. Gruppe G-DMT erhielt eine krankheitsmodifizierende Behandlung: intramuskuläres Interferon Beta 1a, 30 µg/0,5 ml einmal pro Woche (Untergruppe G-IFN) oder orales Teriflunomid 14 mg täglich (Untergruppe G-TER). Gruppe G-DMT + HOM erhielt eine DMT in Kombination mit Homöopathie: G-IFN + HOM Interferon Beta1a und Homöopathie, G-TER + HOM Teriflunomid und Homöopathie. Gruppe G-HOM bestand aus einer homöopathischen Behandlung. Die Kontrollgruppe G-HC bestand aus HC ohne Behandlung.

Tabelle 1 Gruppennamenskonvention.

**Table 1**  
**Group naming convention.**

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

**Table 1** summarizes the acronyms we use for groups identification.

**Abbreviations:** DMT = disease modifying treatment, HC = healthy controls.

Abkürzungen: DMT = krankheitsmodifizierende Behandlung, HC = gesunde Kontrollen.

Tabelle in einem neuen Tab öffnen

## 2.2 Probensammlung

Alle Probanden stellten Stuhlproben entsprechend den Laboranweisungen zur Verfügung: zu jeder Tageszeit, ohne Einschränkungen, in speziellen Stuhlbehältern. Die bereitgestellten Proben wurden bei minus 20 Grad Celsius gelagert und anschließend zur DNA-Extraktion ins Labor geschickt. Jeder Proband sammelte zwei Stuhlproben: eine vor der Behandlung (Probe 1, S1) und eine zwei Monate nach Beginn der Therapie oder Studieneinschreibung (Probe 2, S2).

## 2.3 Die 16rRNA-Sequenzierung und statistische Analyse

Die metagenomische Analyse des überall vorhandenen ribosomalen RNA-Gens (rRNA) der 16S-Untereinheit verwendete spezifische hypervariable Regionen (V1-V3, V3-V4, ITS1 und ITS2) in der gesamten Illumina MiSeq-Plattform. Das Ergebnis sind die OTUs (operative taxonomische Einheiten), Mikroorganismen, die eine DNA-Ähnlichkeit von mindestens 97 % mit einer Labordatenbank aufweisen, klassifiziert in bestimmte Taxa, mit ihrer Häufigkeit und relativen Häufigkeit.

Die Diversität der Darmmikrobiota ist ein mathematisches Maß für die Variabilität, die durch Reichtum (Anzahl verschiedener Arten) und Gleichmäßigkeit (Einheitlichkeit verschiedener Arten) gekennzeichnet ist. Für die Alpha-Diversität, die Diversität innerhalb der Stichprobe, ist der Chao-Index ein Schätzer für den Artenreichtum. Shannon und Simpson sind Parameter

sowohl für den Artenreichtum als auch für die Gleichmäßigkeit, ihre Werte steigen mit der Anzahl der Arten und einer gleichmäßigeren Verteilung (Kim et al., 2017).

Unter Verwendung der Häufigkeitsmatrizen wurde jede Paarkombination mit dem Wilcoxon-Rangsummentest analysiert. Für die Beta-Diversität, die Diversität zwischen Stichproben, haben wir den Bray-Curtis- und den Jaccard-Index verwendet, wobei der grafische Abstand zwischen ihnen den Unterschied anzeigt. Die Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) wurde aus relativen Häufigkeitsmatrizen erhalten. Die LEfSe-Zahlen (Linear Discriminant Analysis Effect Size) verwenden relative Häufigkeitsmatrizen, um die unterschiedliche Organismenhäufigkeit zwischen MS und HC zu berechnen, mit einem Alpha-Wert von 0,05 und einem logarithmischen linearen Diskriminanzanalyse-Score-Schwellenwert (LDA) von 2,0. Alle Merkmale haben einen Wert von entweder weniger als  $-2,0$  oder mehr als  $2,0$ . Die für MS-Patienten angereicherten Bakterien sind rot dargestellt, während diejenigen, die bei HC häufiger vorkommen, grün gefärbt sind. In den gestapelten Balken zur relativen Häufigkeit stellt jeder Balken die durchschnittliche relative Häufigkeit der 25 wichtigsten Arten dar, ausgewählt nach den im Verhältnis zu beiden Gruppen am häufigsten vorkommenden Arten. Außerdem wurden Heatmaps erstellt.

### 3. Ergebnisse

Die MS-Gruppe bestand aus 31 Frauen und 19 Männern mit einem Durchschnittsalter von  $30,5 \pm 9,9$  Jahren, bei 44 von ihnen wurde RRMS und bei 6 CIS diagnostiziert, ein mittlerer EDSS-Wert (Expanded Disability Status Scale) von 1,8 Punkten und eine mittlere Erkrankungsdauer von 3,4 Jahren. Alle MS-spezifischen Merkmale sind in Tabelle 2 dargestellt. Die meisten von ihnen waren naiv (ohne vorherige krankheitsmodifizierende Behandlung (DMT)), nur 4 Patienten erhielten eine Behandlung, die im Vorjahr unterbrochen wurde.

Tabelle 2: Multiple Sklerose (MS)-spezifische Merkmale unserer Kohorte.

**Table 2**

**Multiple sclerosis (MS) specific characteristics of our cohort.**

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

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

Abkürzungen: MS = Multiple Sklerose, *n* = Anzahl der Patienten, SD = Standardabweichung, *y* = Jahre, RRMS = schubförmig remittierende MS, CIS = klinisch isoliertes Syndrom, EDSS = Expanded Disability Status Scale, MMSE = Mini-Mental State Exam.

Die gesunde Kontrollgruppe (HC) wurde unter Berücksichtigung von Personen mit ähnlichen demografischen Merkmalen wie die MS-Gruppe zusammengestellt: 62 % Frauen und 38 % Männer, ein Durchschnittsalter von 28 ± 9,7 Jahren.

### 3.1 Mikrobiomvielfalt

Wir untersuchten allgemeine Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung mithilfe der Alpha- und Beta-Diversität. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Alpha-Diversität zwischen MS-Patienten und HC-Patienten vor ( $p = 0,85$ ) und nach der Behandlung ( $p = 0,95$ ). Außerdem gab es keinen Unterschied zwischen anderen Gruppenkombinationen für Probe 2 (S2): G-DMT vs. G-DMT + HOM ( $p = 0,89$ ), G-DMT + DOM vs. G-HOM ( $p = 0,98$ ), G-DMT vs. G-HOM ( $p = 0,64$ ) und ihre Untergruppen, G = IFN + HOM vs. G-TER + HOM ( $p = 0,23$ ), G-IFN vs. G-IFN + HOM ( $p = 0,06$ ) zwischen Stichprobe 1 (S1) und S2 für MS-Patienten ( $p = 0,93$ ), G-DMT + HOM ( $p = 0,38$ ) oder G-HOM ( $p = 0,79$ ). Außerdem gab es keinen Unterschied in der Alpha-Diversität zwischen den mit DMT behandelten MS-Patienten (G-DMT kombiniert mit G-DMT + HOM) und den Patienten, die keine DMT erhielten (G-HOM),  $p = 0,81$ . Alle *p*-Werte sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 Übersicht aller p-Werte für die mikrobielle Diversität.

**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	<b>p = 0.007</b>	<b>p = 0.012</b>
G-IFN vs G-HOM (S2)	p = 0.2	p = 0.35	p = 0.72	<b>p = 0.012</b>	<b>p = 0.016</b>
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
S1vsS2 (G-MS)	p = 0.93	p = 0.26	p = 0.36	p = 0.88	p = 0.93
S1vsS2 (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

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

\*Werte in Fettschrift sind statistisch signifikant. Diese Tabelle enthält spezifische Vergleiche zwischen unseren Kohorten und den angewandten Diversitätsindizes sowie den p-Wert jedes Tests. Abkürzungen: S1 = Probe 1; S2 = Probe 2.

Als wir die Beta-Diversität analysierten, gab es einen Unterschied für S2 zwischen G-HOM und G-TER + HOM ( $p = 0,007$ ) (Abb. 1) und zwischen G-HOM und G-IFN ( $p = 0,012$ ), statistisch gesehen jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den MS-Patienten und HC oder zwischen den beiden Proben für MS-Patienten (alle  $p > 0,05$ ). Weitere Ergebnisse sind in Tabelle 3 und Abb. 1\* (\*ergänzende Datendateien) aufgeführt.

Abb. 1 Bray-Curtis-Hauptkoordinatenanalyse (PCoA), Homöopathie + Teriflunomid (G-TER + HOM) vs. Homöopathiegruppe (G-HOM), Probe 2.

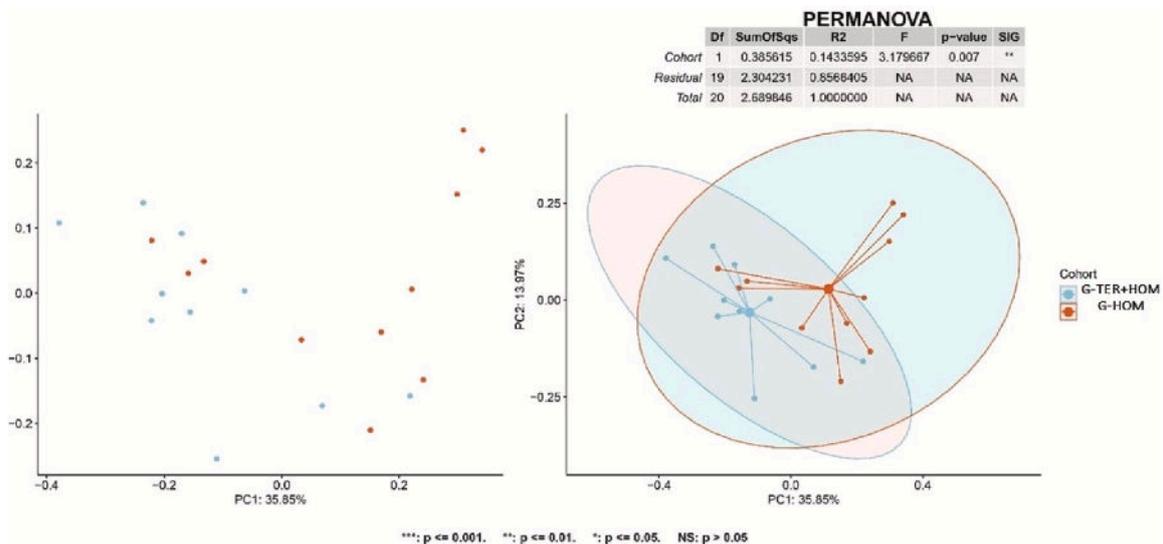


Fig. 1. Bray-Curtis Principal coordinate analysis (PCoA), homeopathy + teriflunomide (G-TER + HOM) vs homeopathy group (G-HOM), sample 2. Bray-Curtis diversity value quantifies the difference between the group with homeopathy and teriflunomide and the group with homeopathy, after two months treatment.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

### 3.2 Taxonomische Unterschiede

Die Ergebnisse der 16S-Analyse umfassen die Häufigkeit und relative Häufigkeit der Arten. Für die MS-Kohorte identifizierten wir 51 operative taxonomische Einheiten (OTUs) auf Stammebene, wobei die Mehrheit aus Firmicutes (49,45 %), Bacteroidetes (34,3 %), Actinobacteria (4,77 %) und Proteobacteria (3,6 %) besteht. Auf Artenebene analysierten wir 1505 OTUs mit der höchsten relativen Häufigkeit von *Prevotella copri* (10,75 %) und *Bacteroides* (10,3 %), gefolgt von *Faecalibacterium prausnitzii* (6,63 %) und *Blautia* (4,49 %). Wir haben taxonomische Unterschiede zwischen unserer MS-Kohorte (G-MS) und unserer HC-Kohorte (G-HC) vor jeder Behandlung analysiert (S1). Unbehandelte MS-Patienten zeigten im Vergleich zu HC eine erhöhte relative Häufigkeit von *Lentisphaerae*-Stamm ( $p = 0,005$ ) und *Prevotella stercorea*-Arten ( $p = 0,02$ ) (*Bacteroidetes*-Stamm). Sie hatten einen verringerten Gehalt an *Actinobacteria* phylum ( $p = 0,01$ ) mit seinen Arten *Bifidobacterium* ( $p = 0,01$ ) und *Bifidobacterium jugendlichis* ( $p = 0,007$ ) sowie einen verringerten Gehalt an *Bacteroides coprophilus* ( $p = 0,02$ ) (aus *Bacteroidetes* phylum). Der *Firmicutes*-Stamm hat die relative Häufigkeit von *Faecalibacterium prausnitzii* ( $p = 0,03$ ), *Lachnospiraceae* ( $p = 0,01$ ), *Staphylococcus hominis* ( $p = 0,02$ ) und dem *Staphylococcus*-Bakterium ( $p = 0,02$ ) verringert. *Proteobacteria* phylum ist bei *Haemophilus* ( $p = 0,04$ ) und *Escherichia coli* ( $p = 0,04$ )

zurückgegangen. Die anderen statistisch signifikanten Unterschiede sind in Abb. 2A, Abb. dargestellt. 2\*-4\*.

Abb. 2A

Abb. 2: Lineare Diskriminanzanalyse-Effektgröße (Lefse) auf Speziesebene zwischen Multiple-Sklerose-Patienten (G-MS) und gesunden Kontrollpersonen (G-HC) vor jeder Behandlung (Probe 1).

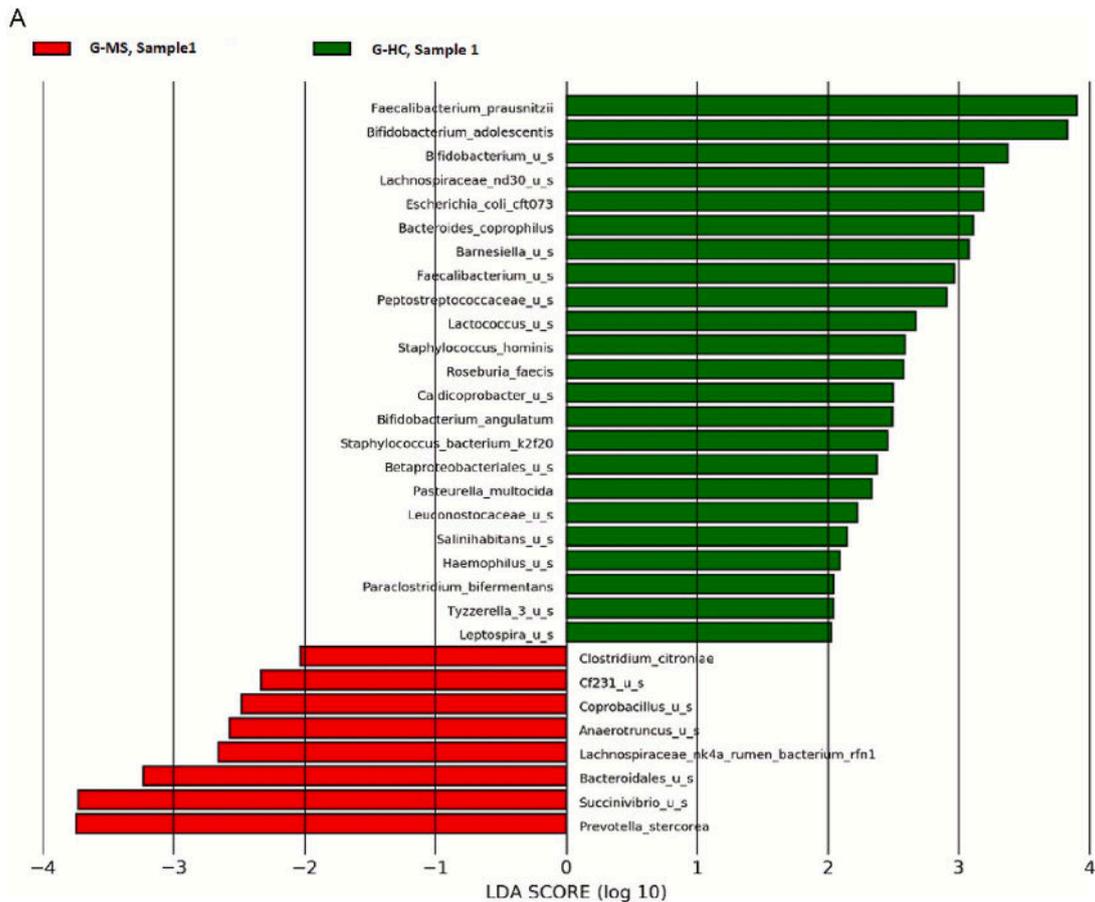


Fig. 2A. Linear Discriminant Analysis Effect Size (Lefse) at species level between multiple sclerosis patients (G-MS) and healthy controls (G-HC) before any treatment (sample 1).

Als wir die zweiten Proben analysierten, waren die Ergebnisse für die mit MS behandelten Patienten im Vergleich zu den HC leicht unterschiedlich, mit reduzierten Bifidobacterium- ( $p = 0,02$ ), Ruminococcus- ( $p = 0,04$ ) und Clostridiales- ( $p = 0,01$ ) und einer höheren Prävalenz von Gemella ( $p = 0,04$ ), Megasphaera ( $p = 0,02$ ) und Prevotella stercorea ( $p = 0,02$ ) für MS-Patienten im Vergleich zu HC (Abb. 2B, Abb. 5\*-7\*).

B

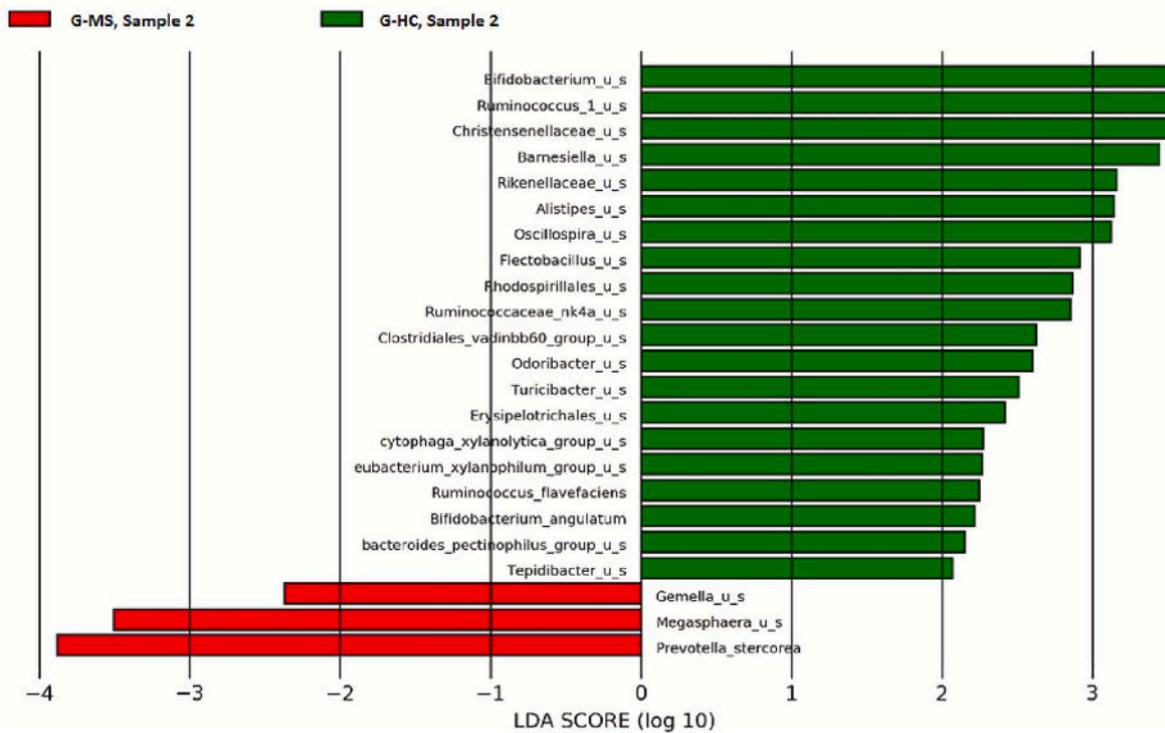


Fig. 2B. Lefse analysis at species level between multiple sclerosis patients (G-MS) and healthy controls (G-HC) after two months of treatment (sample 2).

Wir analysierten verschiedene Vergleiche zwischen Gruppen nach einer zweimonatigen Behandlung. Bei der Analyse der Mikrobiota der MS-Patienten, die DMT (G-DMT) erhielten, im Vergleich zu den Patienten, die sich einer komplementären homöopathischen Behandlung (G-DMT + HOM) unterzogen, haben wir die folgenden Ergebnisse dargelegt. Im Vergleich zu G-DMT + HOM hatte G-DMT eine erhöhte relative Häufigkeit von *Catenibacterium* ( $p = 0,02$ ), *Lachnospiraceae* ( $p = 0,02$ ), *Sharpea* ( $p = 0,02$ ) und *Gammaproteobacteria* ( $p = 0,02$ ) und einen verringerten Gehalt an *Shuttleworthia* ( $p = 0,04$ ), *Cytophaga* ( $p = 0,03$ ) und *Pansen* ( $p = 0,02$ ). Cyanobakterien ( $p = 0,002$ ), *Catenibacterium* ( $p = 0,01$ ), *Alloprevotella* ( $p = 0,03$ ), *Lachnospiraceae* ( $p = 0,003$ ), *Clostridium* ( $p = 0,01$ ), *Prevotella copri* ( $p = 0,04$ ), *Prevotella stercorea* ( $p = 0,03$ ) kommen nach der Behandlung in der G-IFN-Untergruppe häufiger vor als in G-IFN + HOM. Auf der anderen Seite zeigt G-IFN + HOM höhere Konzentrationen an Proteobakterien ( $p = 0,02$ ), *Escherichia shigella* ( $p = 0,01$ ), *Barnesiella* ( $p = 0,03$ ), *Serratia* ( $p = 0,008$ ) und *Lactobacillus zeae* ( $p = 0,02$ ). In der G-TER-Gruppe sind *Escherichia shigella* ( $p = 0,007$ ), *Lactobacillus* ( $p = 0,01$ ), *Enterobacter* ( $p = 0,02$ ) und *Enterococcus faecalis* ( $p = 0,03$ ) häufiger als in G-TER + HOM, während G-TER + HOM zeigt höhere Anzeichen von *Rickenellaceae* ( $p = 0,01$ ) und *Lachnospiraceae* ( $p = 0,02$ ). Wir verglichen auch die beiden Gruppen, die eine homöopathische Behandlung erhalten hatten, G-DMT + HOM und G-HOM. Wir haben dargelegt, dass G-DMT + HOM im Vergleich zu G-HOM eine höhere relative Häufigkeit für *Megasphaera* ( $p = 0,04$ ), *Eubacterium oxidoreducens* ( $p = 0,02$ ), *Veillonellaceae* ( $p = 0,02$ ) und *Gardnerella* ( $p = 0,02$ ) aufweist. G-HOM war angereichert mit *Faecalibacterium prausnitzii* ( $p = 0,01$ ), *Akkermansia muciniphila* ( $p = 0,02$ ), *Lachnospiraceae* ( $p = 0,003$ ), *Bacteroides acidifaciens* ( $p = 0,04$ ) und *Pectinophilus* ( $p = 0,03$ ) sowie *Veillonella* ( $p = 0,01$ ), im Vergleich zu G-DMT + HOM (Abb. 8\*-20\*).

Ein weiterer interessanter Punkt unserer Forschung bestand darin, hervorzuheben, wie sich das Mikrobiom im Laufe der Zeit verändert, vom Zeitpunkt der Verschreibung eines Therapieschemas an die Patienten (S1) bis zwei Monate nach Beginn der Behandlung (S2). Für die MS-Kohorte sind die taxonomischen Veränderungen in Abb. 3 mit den am häufigsten vorkommenden 25 Organismen dargestellt. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Proben waren bei Firmicutes phylum häufiger, da reduzierte Werte für Ruminococcus ( $p = 0,03$ ), Oscillospira ( $p = 0,0004$ ), Anaerotruncus ( $p = 0,02$ ), Lachnoclostridium ( $p = 0,01$ ), Lachnospiraceae ( $p = 0,02$ ) und Eubacterium oxidoreducens ( $p = 0,04$ ) bei den MS-Patienten nach der Behandlung im Vergleich zur Ausgangsprobe festgestellt wurden. Die mit MS behandelten Patienten wiesen vielfältigere bakterielle Veränderungen auf, mit einem Anstieg von Firmicutes phylum (Sulfobacillus  $p = 0,02$ , Enterococcus faecalis  $p = 0,02$ ), Bacteroidetes (Hymenobacter  $p = 0,04$ ), Proteobacteria ( $p = 0,04$ ) und Actinobacteria (Amycolatopsis  $p = 0,04$ ), Fusobacterium (Leptotrichiaceae  $p = 0,04$ ) nach der Behandlung im Vergleich zu vorher (Abb. 21\*-25\*).

Abb. 3

Abb. 3 Gestapelte Balkendiagramme: Vergleich zwischen Probe 1 und Probe 2 für die MS-Kohorte, Top-25-Arten.

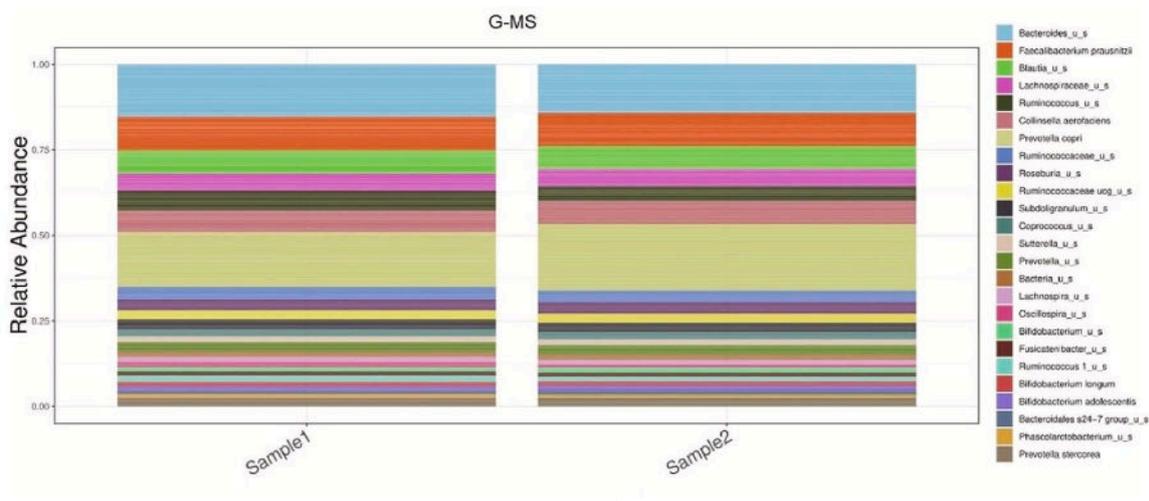


Fig. 3. Stacked Bars Charts: comparison between sample 1 and sample 2 for MS cohort, top 25 species.

Die G-DMT + HOM-Gruppe wies nach der Behandlung eine geringere relative Häufigkeit einiger Firmicutes-Komponenten (Oscillospira  $p = 0,01$ , Lachnoclostridium  $p = 0,03$ , Lachnospiraceae  $p = 0,03$ ) und Proteobakterien (Helicobacteraceae  $p = 0,01$ , Undibacterium  $p = 0,03$ ) auf Grundlinie. Die Gruppe mit ausschließlich homöopathischer Behandlung (G-HOM) wies nach der Behandlung im Vergleich zur ersten Probe einen Rückgang von Eubacterium oxidoreducens auf ( $p = 0,03$ ) (Abb. 25\*-32\*).

## 4. Diskussion

Unsere Daten zeigten keine wesentlichen Veränderungen in der Diversität zwischen MS-Patienten und HC-Patienten, weder vor noch nach irgendeiner Art von Behandlung. Im Vergleich zu HC zeigten unbehandelte Patienten einen Anstieg von Prevotella stercora und verringerte Werte von Actinobacteria und Faecalibacterium prausnitzii. Die taxonomischen Veränderungen nach zweimonatiger Behandlung waren leicht unterschiedlich, mit erhöhten

Gemella-Werten und verringerten Ruminococcus-Werten bei MS-Patienten. Vergleiche zwischen Gruppen nach der Behandlung betonen unterschiedliche taxonomische Modifikationen. Beispielsweise kam es bei Patienten, die eine homöopathische Behandlung erhielten, im Vergleich zur Kombinationstherapie zu einem Anstieg von Faecalibacterium prausnitzii, Akkermansia muciniphila und Bacteroides. Außerdem gab es signifikante Beta-Diversitätsergebnisse für die Behandlung mit Homöopathie im Vergleich zu Homöopathie in Kombination mit Teriflunomid und auch für Homöopathie im Vergleich zu Interferon Beta1a. Bei der Analyse der zeitlichen Veränderungen zwischen den beiden Proben stellten wir einen Rückgang der Ruminococcus-, Lachnospiraceae- und Eubacterium oxidoreducens-Werte bei mit MS behandelten Patienten im Vergleich zu ihrer Ausgangsprobe fest. Die Homöopathie führte mit der Zeit zu einer Reduktion von Eubacterium oxidoreducens.

Es besteht Konsens darüber, dass eine gesunde Mikrobiota durch ein Gleichgewicht zwischen den Mikroorganismen und dem Wirt gekennzeichnet ist, mit großer Diversität, Widerstandsfähigkeit und Stabilität, um die Homöostase und Immunfunktionen des Wirts aufrechtzuerhalten (Freedman et al., 2018). Obwohl äußere Faktoren die Mikrobiota schnell verändern können, kehren gesunde, stabile Bakterien nur bei anhaltenden Gewohnheiten zu ihrer ursprünglichen Zusammensetzung zurück und verändern sich. Eine höhere Artenvielfalt bedeutet größere Unterschiede zwischen den Arten und damit mehr biologische Funktionen, die sie ausüben können, eine bessere Stabilität, die Fähigkeit, Veränderungen zu widerstehen und sich zu erholen (Riccio und Rossano, 2018). Unter Dysbiose versteht man ein Ungleichgewicht in der Bakterienzusammensetzung mit einer Zunahme schädlicher Mikroorganismen und einem Rückgang nützlicher Arten mit einer Veränderung hin zu einem entzündlichen Zustand (Freedman et al., 2018).

Wir stellen in den Mikrobiotaprofilen unserer MS-Kohorte einen Anstieg der Firmicutes- und Actinobakterien und einen Rückgang des Bacteroidetes-Stamms fest. Diese Veränderungen sind spezifisch für eine typische westliche Ernährung mit hohem Fett- und Zuckergehalt, bei der Firmicutes besser in der Lage sind, Energie aus der Nahrung zu extrahieren und so die Gewichtszunahme zu fördern. Andererseits fördert eine Ernährung, die auf komplexen Kohlenhydraten basiert und reich an Ballaststoffen ist, die Zunahme von Bacteroidetes und nützlichen Metaboliten (Magne et al., 2020).

MS-Therapien könnten die Darmmikrobiota modulieren, aber in Studien am Menschen gibt es bisher keine ausreichenden Belege dafür. Interferon beta hemmt T-Zellen und proinflammatorische Zytokine, stimuliert Tregs und unterdrückende B-Zellen, moduliert die Interaktion zwischen Mikroben und Epithelzellen und stabilisiert die Darmbarriere durch Hochregulierung von Tight-Junction-Proteinen in Endothelzellen. Teriflunomid hemmt die Dihydroorotatdehydrogenase, die Pyrimidinsynthese und proinflammatorische Zytokine und könnte das Darmmikrobiom beeinflussen, indem es den STAT-6-Signalweg unterdrückt und so die Anzahl spezifischer T-Reg-Zellen erhöht (Camara-Lemmarroy et al., 2018; Baecher-Allan et al., 2018).

#### 4.1 Vergleich zwischen MS-Patienten und HC zu Studienbeginn

In unserer Studie unterschied sich vor Beginn der Behandlung keine der Alpha- oder Beta-Diversitätskennzahlen signifikant zwischen den MS-Patienten und den HC-Patienten. Dies deutet darauf hin, dass die Mikrobiota der MS-Patienten keine Anzeichen ungewöhnlicher Trends aufweist, was mit Literaturrecherchen übereinstimmt (Mirza et al., 2020). Auf Taxonomieebene beobachteten wir mehrere Organismen, die eine deutlich unterschiedliche relative Häufigkeit zwischen den MS-Fällen und den HC-Fällen aufwiesen. Actinobakterien sind

ein nützlicher Mikroorganismus, der an der Bildung des Immunsystems beteiligt ist (Adamczyk-Sowa et al., 2017) und bei MS-Patienten seltener vorkommt. Bifidobacterium ist in unserer MS-Kohorte verringert. Die Literatur liefert widersprüchliche Daten zu seiner Rolle bei Immunerkrankungen, aber die meisten Studien haben gezeigt, dass Bifidobacterium eine entzündungshemmende Immunantwort induziert (Budhram et al., 2017; Tankou et al., 2018). Die Gattung Prevotella ist ein gut untersuchtes Bakterium bei MS, das am Phytoörogenstoffwechsel beteiligt ist und allgemein als weniger verbreitet bei MS und häufiger bei behandelten Patienten gilt (Chen et al., 2016; Brown et al., 2021). Unsere MS-Patienten wiesen vor oder nach der Behandlung höhere Konzentrationen einer Art auf als HC, Prevotella stercorea, zeigten aber keine relevanten Daten zur Gattung Prevotella. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass es in dieser Gattung mehrere Arten mit unterschiedlichen Rollen gibt (Mirza et al., 2020).

Einige bakterielle Metaboliten können das Zentralnervensystem direkt beeinflussen, beispielsweise kurzkettige Fettsäuren (SCFA), die in der Darmschleimhaut eine immunsuppressive Rolle spielen. Faecalibacterium prausnitzii und Bacteroides coprophilus sind am SCFA-Metabolismus beteiligt (Freedman et al., 2018). Bacteroides ist ein nützliches Bakterium, das IL-10 fördert und bei MS-Fällen im Allgemeinen in geringeren Mengen vorhanden ist. Faecalibacterium prausnitzii hat sich als Marker für eine gesunde Mikrobiota etabliert und ist bei MS-Patienten erschöpft, wie in der Literatur (Tremlett et al., 2016) und auch in unserer Kohorte beobachtet werden kann. Alle diese Unterschiede in der bakteriellen Taxonomie im Vergleich zur HC lassen auf eine Dysbiose der MS-Mikrobiota schließen.

#### 4.2 Vergleich zwischen den Gruppen nach der Behandlung

Bei der Analyse, ob die Behandlung (jeglicher Art) für MS das Mikrobiom signifikant verändert, stellten wir fest, dass es in den zwei Monaten nach Beginn jeglicher Therapieform keine wesentliche Veränderung der Alpha- oder Beta-Diversität bei den MS-Patienten im Vergleich zu den HC-Patienten gab, wie die Literaturrecherche nahelegt (Mirza et al., 2020). Was die Änderungen der Taxonomie anbelangt, ist Ruminococcus ein nützliches Bakterium und kommt in MS-Fällen nach DMT normalerweise wieder vor (Zhu et al., 2020). Unsere Daten spiegeln eine geringere relative Häufigkeit bei den MS-Patienten im Vergleich zu den HC für die zweite Probe wider. Clostridium ist ein Butyrat produzierendes Bakterium, das an der Produktion regulatorischer T-Zellen und des entzündungshemmenden Zytokins IL-10 beteiligt ist (Miyake et al., 2015) und bei MS-Patienten nach der Behandlung reduziert ist.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen nach zweimonatiger Therapie verdeutlichen einen möglichen Eingriff von Störfaktoren: DMT oder homöopathische Behandlung des Darmmikrobioms. Homöopathie könnte einen Einfluss auf die Darmmikrobiota haben, wie unsere Daten nahelegen. Die Veränderungen zwischen Patienten, die irgendeine Form von DMT (G-DMT) und einer Kombination aus DMT und Homöopathie (G-DMT + HOM) erhielten, sind subtil, wir stellen jedoch eine große Anzahl signifikanter Unterschiede hinsichtlich der relativen Bakterienhäufigkeit zwischen den Untergruppen fest, mit Veränderungen die teilweise inkonsistent und widersprüchlich sind. Das Paar G-IFN und G-IFN + HOM skizziert einen möglichen Einfluss der Homöopathie auf mit Interferon beta1a behandelte Patienten, während das Paar G-TER und G-TER + HOM ihren Einfluss auf Teriflunomid-Patienten nahelegt. Im Vergleich zur Kombinationstherapie zeigten Patienten, die Homöopathie erhielten, einen Anstieg von Akkermansia muciniphila, einer umstrittenen Art mit einer unbekanntem Rolle bei der Immunreifung, die bei unbehandelten MS-Patienten erhöht war (Cekanaviciute et al.,

2017). In-vitro-Experimente zeigen seine entzündungsfördernde Rolle, aber in-vivo-Studien haben diese Wirkungen nicht reproduziert, sondern im Gegenteil gezeigt, dass es eine positive Funktion bei einigen Stoffwechselstörungen haben könnte. Obwohl die Therapiewahl bei keiner Gruppe Einfluss auf die Alpha-Diversität hatte, fanden wir vereinzelte Unterschiede in der Beta-Diversität, ähnlich wie bei unserer Literaturrecherche (Mirza et al., 2020). Unsere Ergebnisse standen im Zusammenhang mit Homöopathie und Interferon Beta1A als Behandlungen, die die Mikrobiomvielfalt verändern könnten. Die Beta-Diversität der Gruppe, die homöopathische Behandlung erhielt, unterschied sich von der Gruppe, die mit einer Kombination aus Homöopathie und Teriflunomid behandelt wurde. Außerdem wies die mit Homöopathie behandelte Gruppe eine andere Beta-Diversität auf als die mit Interferon Beta1A behandelte Gruppe. Alle p-Werte sind in Tabelle 3 dargestellt. Mit einem statistisch nicht signifikanten p-Wert von 0,06, nahe bei 0,05, hatte die Gruppe mit Interferon-Behandlung eine geringfügige Veränderung der Beta-Diversität im Vergleich zur Interferon- und Homöopathie-Gruppe. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Homöopathie möglicherweise eine Rolle bei der Beta-Diversität von MS-Patienten spielt, es sind jedoch weitere Studien erforderlich.

Bei der Analyse der relativen Häufigkeit in den ausgewählten Stämmen und Arten stellen wir einen Rückgang für Firmicutes in der Gruppe fest, die die Kombinationstherapie erhielt, im Vergleich zu anderen Gruppen, was jedoch statistisch nicht signifikant ist. Firmicutes sind mit kürzeren Rückfallzeiten bei MS verbunden (Sand und Baranzini, 2018), daher könnte die Kombination dieser beiden Therapien dazu beitragen, das Fortschreiten der Krankheit zu verzögern.

Die beiden am SCFA-Metabolismus beteiligten nützlichen Bakterien, *Bacteroides* und *Faecalibacterium prausnitzii*, weisen für die HC- und die Homöopathiegruppe ähnliche relative Häufigkeiten auf, nämlich etwa 12 % für *Bacteroides* bzw. 7 % für *Faecalibacterium*. Dies deutet darauf hin, dass eine homöopathische Behandlung möglicherweise dazu beiträgt, das Gleichgewicht dieser gesunden Mikroorganismen aufrechtzuerhalten.

#### 4.3 Zeitvergleich (zwischen der zweiten und der ersten Probe)

Für die MS-Kohorte wurden zeitliche Veränderungen des Mikrobioms analysiert, wobei die Ergebnisse die Auswirkungen aller in unserer Studie angewendeten Behandlungen skizzieren: DMT, Homöopathie oder eine Kombination aus beiden. Mit MS behandelte Patienten zeigten vielfältigere bakterielle Veränderungen mehrerer Stämme, was darauf hindeutet, dass die Behandlung einen positiven Einfluss auf die Mikrobiota im Allgemeinen haben könnte. Die Patienten wiesen nach der Behandlung eine geringere relative Häufigkeit von *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus* und *Eubacterium oxidoreducens* auf, wie aus der Literaturrecherche hervorgeht (Mirza et al., 2020). *Lachnospiraceae* ist an der Verringerung der Schleimhautpermeabilität durch die Produktion von SCFAs und die erhöhte Expression von Tight-Junction-Proteinen in Epithelzellen beteiligt (Rinninella et al., 2019).

Bei den beiden Gruppen einschließlich Homöopathie, G-DMT + HOM und G-HOM, wurden die vor der Behandlung häufiger vorkommenden Bakterien in der zweiten Probe abgeschwächt. Dies deutet darauf hin, dass eine homöopathische Behandlung oder ihre Kombination mit DMT nach zweimonatiger Behandlung einen Einfluss auf die Darmmikrobiota hatte.

Homöopathische Behandlungen wurden nicht auf die Darmmikrobiota von MS-Patienten untersucht und es wurden keine relevanten Studien gefunden, mit denen unsere Ergebnisse verglichen werden könnten. Unsere Patienten, die nur eine homöopathische Behandlung erhielten, zeigten nach zweimonatiger Behandlung eine relative Stabilität, wobei die einzige statistisch signifikante Modifikation von *Eubacterium oxidoreducens* in der zweiten Probe

weniger häufig vorkam. Außerdem gab es in der Gruppe, die mit einer Kombination von Therapien behandelt wurde, einige Bakterienarten, die in der zweiten Probe weniger häufig vorkamen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass homöopathisch behandelte Patienten möglicherweise ein stabileres Mikrobiom haben.

#### 4.4 Stärken und Grenzen

Unsere Studie leistet einen Beitrag in diesem medizinischen Bereich, da sie Darmproben dynamisch analysiert und nicht nur die Behandlungsexposition vergleicht, sondern auch die Veränderungen, die im Laufe der Zeit auftreten. Einzigartig ist auch, dass als möglicher Nebeneffekt auch eine homöopathische Behandlung eingeführt wird.

Als mögliche limitierende Faktoren können alle Umwelt- und Nahrungsstoffe, die die Mikrobiota innerhalb von zwei Monaten beeinträchtigen und verändern können, nicht ausgeschlossen oder quantifiziert werden. Weitere Studien sind erforderlich.

## 5. Schlussfolgerungen

Die MS-Mikrobiota ist durch Dysbiose mit verschiedenen taxonomischen Veränderungen im Vergleich zu HC gekennzeichnet. Bei unbehandelten MS-Patienten finden wir eine höhere Häufigkeit von *Prevotella stercorea* und eine Verringerung von *Actinobacteria*, *Bifidobacterium* und *Faecalibacterium prauznitzii*. Die Behandlung mit Interferon beta1a, Teriflunomid oder Homöopathie führte zu mehreren taxonomischen Veränderungen. Mit an MS erkrankten behandelten Patienten hatten im Vergleich zu HC eine andere Mikrobiota mit weniger *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* und *Clostridiales* und einer höheren Prävalenz von *Gemella*, *Megasphaera* und *Prevotella stercorea*.

Beim Vergleich der zweiten mit der ersten Probe haben wir die Veränderungen der MS-Mikrobiota im Laufe der Zeit dargelegt, wie z. B. eine Abnahme von *Lachnospiraceae* und *Ruminococcus* und eine Zunahme von *Enterococcus faecalis*. Diese dynamischen Veränderungen können auf die MS-Behandlung zurückzuführen sein.

Insgesamt hatte die Behandlungsexposition einen geringen Einfluss auf die Mikrobiomvielfalt. Die einzigen statistisch signifikanten Diversitätsmodifikationen, die wir fanden, implizierten die Wirkung einer homöopathischen Behandlung auf die Beta-Diversitätsindizes im Vergleich zur Wirkung immunmodulatorischer Medikamente. Auch *Eubacterium oxidoreducens* wurde nach homöopathischer Behandlung reduziert. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass homöopathische Behandlungen auch eine Rolle bei der Beeinflussung der Darmmikrobiota spielen.

Diese Studie skizziert die wichtige Rolle der Darmmikrobiota bei MS und zeigt weitere zu untersuchende Wege auf. Das Mikrobiom ist ein riesiges Ökosystem, das von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird, die nicht vollständig quantifiziert werden können. Unser Projekt konzentrierte sich auf dynamische Veränderungen in der Mikrobiota und den möglichen Einfluss einiger spezifischer DMTs sowie auf die Homöopathie als Komplementär- und Alternativmedizin, die in der klinischen Praxis eingesetzt wird.

## Finanzierung

Diese Forschung erhielt keine externe Finanzierung.

## Ethische Genehmigung

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission des Cluj Emergency County Hospital, Code 2394/28.01.2020, genehmigt.  
Einverständniserklärung

Von allen an der Studie beteiligten Probanden wurde eine Einverständniserklärung eingeholt.  
CRediT-Autorenbeitragsklärung

Vitalie Vacaras: Konzeptualisierung, Methodik, Ressourcen, Schreiben – Rezension und Bearbeitung, Supervision. Dafin F. Muresanu: Konzeptualisierung. Anca-Dana Buzoianu: Konzeptualisierung. Cristina Nistor: Methodik, Ressourcen, formale Analyse, Schreiben – Rezension und Bearbeitung. Stefan Cristian Vesa: Schreiben – Originalentwurf, Schreiben – Rezension & Lektorat, Betreuung. Andreea Cristina Paraschiv: Methodik, Ressourcen, Formale Analyse. Daniela Botos-Vacaras: Methodik, Ressourcen. Cristiana Vacaras: Methodik, Ressourcen. George Vithoulkas: Konzeptualisierung, Supervision.

## Datenverfügbarkeit

Die Daten und andere Informationen dieser Studie sind aus Datenschutzgründen auf Anfrage beim entsprechenden Autor erhältlich.

## Erklärung konkurrierender Interessen

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

## Danksagungen

Wir freuen uns über die Hilfe des CosmosID-Labors bei der Analyse unserer Proben und für die Unterstützung bei der statistischen Analyse.

## Anhang A. Ergänzende Daten

### Ergänzungsmaterial

Jaccard-Hauptkoordinatenanalyse, Heatmaps, lineare Diskriminanzanalyse, Effektgrößendiagramme und gestapelte Balkendiagramme.

## Literaturverzeichnis

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

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

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

Budhram, A., Parvathy, S., Kremenutzky, 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., Zuccala, M., Tosi, M., Clerico, M., Rolla, S., 2021 Jul 29. Host genetics and gut microbiome: perspectives for multiple sclerosis. *Genes.* 12 (8), 1181.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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