الجمهورية اليمنية
كليـــة العلـــوم
جامعــة صنعــاء
قسم العلـوم الحيـاتية
نيابة الدراسات العليا والبحث العلمي
شعبة الميكروبيولوجي

الجينوم الميكروبي للأمعاء بين ماضغي القات من مرضى التهاب الكبد الفيروسي Bاليمن /في مدينة صنعاء

رسالة

مقدمة إلى قسم العلوم الحياتية، كلية العلوم، جامعة صنعاء، كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم الحياتية، تخصص أحياء دقيقة

كجزء من متطلبات الحصول على درجة الماجستير في الأحياء الدقيقة الطبية

مقدمة من الطالبة

خلود حميد علي الخياط

المشرف الرئيسي

أ.د. سعيد منصر الغالبي

استاذ الميكروبيولوجي الطبي

قسم العلوم الحياتية

كلية العلوم- جامعة صنعاء

2023م-1444هـ

Republic of Yemen
Faculty of Science

Sana'a University
Biological Science Department

Graduated Studies &
Microbiology Section

Scientific Research

Gut Microbiome among Khat-Chewing Hepatitis B Patients in Sana'a City/Yemen

A thesis

Submitted to Biological Department, Faculty of Science, Sana'a University as Partial Fulfillment of the Requirements of Master Degree of Science in Biology Microbiology

By

Khulood Hamid Ali Al-Khyat

Main Supervisor

Prof Dr. Saeed Munasser Al-ghalibi

Professor of Medical Microbiology

Department of Biological Science'

Faculty of Science, Sana'a University

Summary :

The gut microbiota is a collection of trillions of microorganisms that live in the digestive tract and play an important role in maintaining overall health by being involved in various physiological processes. Dysbiosis of the gut microbiome has been linked to several diseases and conditions, including hepatitis B virus (HBV) infection. As well as HBV is a major global health problem and is a significant public health issue in Yemen. However, none of previous studies have investigated the effect of khat chewing on the HBV patients' gut microbiome, therefore this thesis aimed to study the gut microbiota diversity in khat-chewing HBV patients alongside study number of biochemical and hematological parameters among these patients. This study was conducted at the Liver Diseases Consultant Center in Sanaa City/Yemen for six months to fill out the questionnaires and collect blood and fecal samples.

Methods: 80 participants were divided into an even group: HBV patients and healthy. Each of these two groups was further divided into an even subgroup: khat chewers and non-khat chewers. The HBsAg and HCVAb detection tests, complete blood counts (CBC), liver function tests, lipid profiles and kidney function tests. Stool Samples underwent 16S RNA gene sequencing.

Results: A total of 40 (50%) HBV patients and 40 (50%) healthy individuals were included. 23(57.5%) were HBV patients male, 69,6% of them were khat chewers, and 17 (42.5%) were HBV patients female, 23.5% of them were khat chewers. While, 26(65%) were healthy male, 15(75%) of them were khat chewers, and 14(35%) were healthy female, 5(25%) of them were khat chewers. The study found statistically significant associations between khat-chewing HBV infection and some demographic variables as gender, education level, marital status, household incomes, occupations, and residence ($p<0.05$). And between HBV infection (regardless khat chewing) with education level, marital status, household incomes, occupations, residence, blood transfusion ($p<0.05$).

The findings of laboratory parameters showed a statistically significant increase in the values of BT ($p=0.001$), BD ($p=0.011$), AST ($p=0.001$), ALT ($p=0.001$), ALP ($p=0.003$), TGs ($p=0.007$), urea ($p=0.001$), creatinine ($p<0.001$), uric acid ($p<0.001$), lymphocytes($p=0.001$), monocytes ($p<0.001$) and RBC ($p=0.017$), while significantly decrease in the values of albumin ($p<0.001$), HDL-c ($p<0.001$), neutrophils ($p<0.001$), and platelets ($p=0.025$) in the khat-chewing HBV patients compared to non-khat healthy. On another note, there was a statistically significant increase in the values of HDL-c ($p=0.005$), while significantly decrease in the values of BT ($p=0.021$), ALP ($p=0.008$), albumin ($p=0.026$), TGs ($p=0.005$), urea ($p=0.015$) and uric acid ($p<0.001$), total leucocytes ($p=0.001$), eosinophils ($p=0.027$), RBC ($p=0.020$) and platelets ($p=0.013$) in the non-khat HBV patients compared to healthy khat chewers.

HBV infection showed a statistically significant increase in values of AST ($p=0.031$), ALT ($p=0.038$), and monocytes ($p=0.033$), while significantly decrease in the value of albumin ($p<0.001$), total leucocyte ($p=0.002$), neutrophils ($p<0.001$), lymphocytes ($p<0.001$) and platelets ($p=0.001$) in HBV patients compared to healthy individuals. On the other hand, there are a statistically significant increase in AST ($p=0.003$), ALT ($p=0.003$), and lymphocytes ($p=0.013$), while significantly decrease in the values of albumin ($p<0.001$), total leucocytes ($p<0.001$), neutrophils ($p=0.008$), and platelets ($p=0.006$) in the khat-chewing HBV patients compared to healthy khat chewers. Furthermore, there are a statistically significant increase in the values of lymphocytes ($p=0.010$), while significantly decrease in the values of albumin ($p<0.001$) and neutrophils ($p=0.004$) in the non-khat HBV patients and non-khat healthy people.

The variable of Khat-chewing showed statistically significant increase in the values of BT (p=0.003), BD (p=0.039), AST (p=0.002), ALT (p=0.001), ALP (p=0.042), TGs (p=0.038), urea (p=0.003), creatinine (p<0.001), uric acid (p<0.001), monocytes (p=0.010) and RBC (p=0.033), while significantly decrease in HDL-c (p=0.010) in the khat-chewing patients compared to non-khat patients. On the other hand, it showed a statistically significant increase in the values of BT (p=0.007), BD (p=0.023), ALP (p<0.001), TGs (p=0.001), urea (p=0.007), creatinine (p=0.008), uric acid (p=0.004), total leucocytes (p=0.004), Eosinophils (p=0.042), RBC (p=0.010), while significantly decrease in the values of albumin (p=0.006) and HDL-c (p<0.001) in healthy khat chewers compared to non-khat healthy.

The gut metagenomic alpha diversity showed no significant differences in Chao1, evenness, Shannon and Simpson's diversity between healthy and patients, nor between the four subgroups (padj>0.05).

Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and proteobacteria were the most abundant phyla accounting for 97.11% in patients and 99.01% in healthy groups. The higher Faecalibacterium, Bacteroides, Blautia and Dialister (11.83%, 5.74%, 4.76% and 2.1%, respectively) and lower Prevotella 9, Bifidobacterium, Alloprevotella, Agathobacter, Clostridium sensu stricto 1 and Lactobacillus (10.09%, 2.16%, 2.35%, 2.15%, 1.93% and 1.79%, respectively) were the most noticeable changed among the genus level in HBV patients compared to healthy individuals. On the other hand, khat chewers showed lower Prevotella 9 (13.97% and 8.82%), Bifidobacterium (3.17% and 2.32%), Lactobacillus (2.51% and 0.48%) in healthy and patients, respectively.

Conclusion: khat-chewing with/or HBV infection have a significant an impact on the function of the immune system, hepatotoxicity, nephrotoxicity and contribute to arthritis by decreasing lymphocytes, neutrophils and increasing AST, ALT, creatinine and uric acid. Besides, khat chewing may increase the risk during HBV infection and could also impact the speed of disease progression and treatment outcomes as it has an effect on the gut microbiome diversity. More studies required to study the significant effect of HBV infection with/or khat chewing on the gut microbiome.

الملخص العربي

الميكروبيوم المعوي هو مجموعة من ملايين الكائنات الحية الدقيقة التي تعيش في الجهاز الهضمي وتلعب دورًا هامًا في الحفاظ على الصحة العامة من خلال المشاركة في عدة عمليات فيزيولوجية. وقد تم ربط عدم توازن الميكروبيوم المعوي بعدة أمراض وحالات، بما في ذلك عدوى فيروس التهاب الكبد ب (.(HBVكما أن HBVيعتبر مشكلة صحية عالمية رئيسية وأيضا مسألة صحية عامة هامة في اليمن. ومع ذلك، لم يقم أي دراسات سابقة بدراسة تأثير مضغ القات على الميكروبيوم المعوي لدى مرضى فيروس التهاب الكبد (HBV) B، لذلك كان هدف هذه الرسالة هو دراسة الميكروبيوم المعوي لدى مرضى فيروس التهاب الكبد (HBV) Bالذين يمضغون القات، بالإضافة إلى دراسة عدد من المعايير الكيموحيوية والهيماتولوجية لدى هؤلاء المرضى.

تم إجراء هذه الدراسة في مركز استشارات أمراض الكبد في مدينة صنعاء / اليمن لمدة ستة أشهر لملء الاستبيانات وجمع عينات الدم والبراز.

تم تقسيم 80 مشاركًا إلى مجموعتين متساويتين: مرضى HBVوأصحاء. تم تقسيم كل من هاتين المجموعتين إلى مجموعتين فرعيتين متساويتين: ماضغي وغير ماضغي للقات. تم تطبيق اختبارات الكشف عن HBsAgوHCVAb، وقراءات صورة الدم الكاملة ((CBCواختبارات وظائف الكبد وتحاليل الدهون واختبارات وظائف الكلى.

من جهة أخرى تمت خضوع عينات البراز لتحليل التسلسل الجيني للـ S RNA.16

النتائج: تم تضمين مجموعة مكونة من 40 (50٪) مريضًا بفيروس التهاب الكبد ب ((HBVو40 (50٪) فردًا سليمًا. كان 23 (57.5٪) من مرضى HBVمن الذكور، و14(69.6٪) من هؤلاء الذكور يمضغون القات، وكان 17 (42.5٪) من مرضى HBVمن الإناث، و4(23.5٪) من هؤلاء الإناث يمضغن القات. في حين كان 26 (65٪) من الاصحاء ذكور، و15 (75٪) من هؤلاء الذكور كانوا يمضغون القات، وكان 14 (35٪) من الأصحاء اناث، و5 (25٪) من هؤلاء الإناث يمضغن القات.

وجدت الدراسة ارتباطات ذات دلالة إحصائية بين الإصابة بفيروس التهاب الكبد ب ((HBV وحالة مضغ القات مع الجنس ومستوى التعليم والحالة الاجتماعية والدخل الأسري والمهنة ومكان الإقامة ((p <0.05، في حين لم يكن هناك ارتباط ذو دلالة إحصائية مع العمر والتدخين ونقل الدم (.(p> 0.05وأيضا بين الإصابة بفيروس التهاب الكبد ب (- (HBVبغض النظر عن مضغ القات- ومستوى التعليم والحالة الاجتماعية والدخل الأسري والمهنة ومكان الإقامة وعملية نقل الدم p <0.05).)

أظهرت نتائج معلمات المختبر أن هناك زيادة ذات دلالة إحصائية في قيم (BT (p = 0.001، (p = 0.011)BD، (p = 0.001)، AST (p =0.003)، ALP (p ، (p = 0.007) TGs =، واليوريا ((p = 0.001، و الكرياتينين (,(p<0.001وحمض اليوريك (p <0.001)، والخلايا اللمفاوية ((p = 0.001، والخلايا النسيجية الوحيدة ((p <0.001، وكريات الدم الحمراء (,(p = 0.017وانخفاضًا ذو دلالة إحصائية في قيم الألبومين ((p <0.001،HDL- (p <0.001)،c Neutrophils (p <0.001) ، والصفائح الدموية ((p = 0.025بين مرضى HBVالذين يمضغون القات والأفراد الأصحاء غير ماضغي القات. على صعيد اخر، أظهرت النتائج أن هناك زيادة ذات دلالة إحصائية في قيم الدهون العالية الكثافة (HDL-c (p = 0.010 وانخفاضًا ذا دلالة إحصائية في (ALP (p = 0.008، والألبومين ((p = 0.026، TGs(p=0.005%)، واليوريا ((p=0.015، و اليوريك اسد (, (p<0.001وإجمالي كريات الدم

البيضاء ((p = 0.001، والخلايا الحمضية ((p = 0.027، وكريات الدم الحمراء ((p = 0.020، والصفائح الدموية ((p = 0.013بين مرضى HBVالغير ماضغي القات والأفراد الأصحاء الذين يمضغون القات.

أظهرت الإصابة ب HBV، بغض النظر عن حالة مضغ القات، زيادة ذات دلالة إحصائية في قيم AST (p = 0.031)،ALT (p = 0.038) ، حمض اليوريك ((p = 0.038، والخلايا النسيجية الوحيدة ((p = 0.033وانخفاضًا ذا دلالة إحصائية في قيم الألبومين ((p <0.001، HDL-c (p = 0.11)، وإجمالي كريات الدم البيضاء ((p = 0.002، الخلايا الحبيبية المتعادلة (p <0.001)، والخلايا اللمفاوية ((p <0.001، وقراءة الصفائح الدموية ((p = 0.001في مرضى HBVمقارنة بالأفراد الأصحاء. من جهة اخرى، هناك زيادة ذات دلالة إحصائية في قيم AST (p = 0.003)،ALT (p = 0.003) ، والخلايا اللمفاوية ((p = 0.013، وانخفاضًا ذا دلالة إحصائية في قيم الألبومين ((p <0.001، وإجمالي كريات الدم البيضاء ((p <0.001، والخلايا الحبيبية المتعادلة ((p = 0.008، والصفائح الدموية ((p = 0.006بين المرضى الذين يمضغون القات والأصحاء الذين يمضغون القات. إلى جانب ذلك هناك زيادة ذات دلالة إحصائية في الخلايا اللمفاوية ((p = 0.010، وانخفاضًا ذا دلالة إحصائية في قيم الألبومين ((p <0.001، والدهون العالية الكثافة HDL-c (p = 0.010)، والخلايا الحبيبية المتعادلة ((p=0.004بين المرضى الذين لا يمضغون القات والأصحاء الذين لا يمضغون القات.

أظهر عامل مضغ القات زيادة ذات دلالة إحصائية في قيم BT (p=0.003)، BD (p = 0.039)،AST (p = 0.002)، ALT (p = 0.001)، ALP (p = 0.042) ، TGs (p = 0.038)، اليوريا ((p = 0.003، و الكرياتينين ((p<0.001، وحمض اليوريك ((p< 0.001، الخلايا النسيجية الوحيدة ((p = 0.010، و كريات الدم الحمراء ((p = 0.033، و انخفاضًا ذا دلالة إحصائية في HDL-c (p = 0.010)بين المرضى اللذين يمضغون القات مقارنة بالمرضى اللذين لا يمضغون القات. من جهة أخرى، أظهر مضغ القات زيادة ذات دلالة إحصائية في قيم BT (p = 0.007)،BD (p = 0.023)، ALP (p <0.001)، TGs (p = 0.001) ، اليوريا ((p = 0.007، والكرياتينين ((p=0.008، وحمض اليوريك ((p = 0.004، إجمالي كريات الدم البيضاء ((p = 0.004، الخلايا الحمضية ((p=0.042، وكريات الدم الحمراء ((p = 0.010، وانخفاضًا ذا دلالة إحصائية في قيم الألبومين ((p = 0.006و (p < 0.001) HDL-cبين الاصحاء ماضغي القات مقارنة بالأفراد الأصحاء غير ماضغي القات.

تحليل الميتاجينوم المعوي اظهر انه لا يوجد فرق معنوي في التنوع البكتيري داخل المجموعة الواحدة او داخل المجموعات الفرعية باستخدام مؤشرات Chao1, evenness, Simpson و .Shannon (padj=1)أيضا لا يوجد هناك فروقات معنوية بين المجموعات المختلفة بمقياس weighted Unifracحيث (.padj=0.819)

كانت Actinobacteriaو Bacteroidetesو Firmicutesو Proteobacteriaأكثر الشعب وفرةً، حيث بلغت نسبتها 97.11% في المرضى و99.01% في الاصحاء. كما أظهرت النتائج ارتفاعًا في الأجناس التالية Faecalibacteriumو Bacteroidesو Blautiaو Dialister بنسب 11.83% و5.74% و4.76% و2.1% على التوالي، وانخفاضًا في الأجناس التالية Prevotella9و Bifidobacteriumو Alloprevotellaو Agathobacter و Clostridium sensu stricto 1و Lactobacillusبنسب 10.09% و2.16% و2.35% و2.15% و1.93% و1.79% على التوالي، وذلك على مستوى الأجناس، كانت هذه التغيرات

الأكثر وضوحًا بين مرضى فيروس التهاب الكبد ب المقارنة مع الأفراد الأصحاء. من ناحية أخرى، أظهر متعاطو القات انخفاضًا في Prevotella 9 (بنسب 13.97% و8.82%) و Bifidobacterium (بنسب 3.17% و2.32%) و Lactobacillus (بنسب 2.51% و0.48%) في الأفراد الأصحاء والمرضى على التوالي.

الاستنتاج: يؤثر مضغ القات مع/أو لدى مرضى فيروس التهاب الكبد B (HBV) بشكل كبير على وظيفة الجهاز المناعي وسمية الكبد وسمية الكلى، ويساهم في الإصابة بالتهاب المفاصل عن طريق تقليل عدد الخلايا الليمفاوية والعدلات وزيادة نسبة AST و ALT والكرياتينين وحمض اليوريك. بالإضافة إلى ذلك، قد يزيد مضغ القات من خطر الإصابة بفيروس التهاب الكبد B (HBV) ويؤثر على سرعة تقدم المرض ونتائج العلاج حيث أنه يؤثر على تنوع البكتيريا المعوية. هناك حاجة إلى إجراء المزيد من الدراسات لدراسة التأثير الهام للإصابة بفيروس التهاب الكبد ب و/أو مضغ القات على تنوع البكتيريا المعوية.