The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Mosul / College of Science

Department of Biology

The Relation Between Gram Negative Gut Microbiota in Osteoporosis and Bone Cancer Patients

Raad Mohammed Mahmood Jumaa

Ph.D. Dissertation

Biology / Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Amera Mahmood Mohammed Alrawi

2025 A.D. **1447 A.H.**

Abstract

The current study focused on finding the relationship between some types of Gram-negative gut microbiota and some bone health parameters such as osteoporosis, osteopenia and bone cancer.. In addition measuring the levels of potassium, calcium and vitamin D3. As well as, studying the relationship between *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and bone health and the relation between this bacterium and the level of vitamin D3. Furthermore, the diagnosis methods used in the current study includes:Vitek 2 system,*16S rRNA* and Metagenomic **.**

On the other hand, the current study includes testing the ability of bee venom, camel milk and royal jelly to inhibit some bacterial isolated from patients. In addition to that, the studying the ability of these materials to inhibit the bone cancer cell line and it's effect on human lymphocytes as normal cells.

A total of (140) samples were collected, comprising (20) stool samples and (20) blood samples from osteoporosis patients, (20) stool samples and (20) blood samples from osteopenia patients, (20) stool samples and (20) blood samples from healthy individuals, in addition to (10) stool samples and (10) blood samples from bone cancer patients. Furthermore, (8) stool samples, comprising (2) samples each from osteoporosis, osteopenia, bone cancer patients and healthy individuals were used for metagenomic analysis.

The curren study reveals that the majority of osteoporosis and osteopenia cases are prevalent in individuals over 50 years old, females being more susceptible to these conditions. Additionaly, potassium and calcium levels were normal in more than of 85% of patients. The vast majority of patients suffer from a deficiency or insufficiency in the level of vitamin D3. Furthermore, 15 (75%) of osteoporosis patients infected with *H. pylori* , moreover, majority of patients and control who infected with *H. pylori* had vitamin D3 less than (29)ng/ml. All isolated bacterial were identified by *16S rRNA* gene and vitek 2 system which included: *Escherichia coli(E. coli*) , *Escherichia fergusonii(E. fergusonii*) in all patients and control samples, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter hormaechei* in osteoporosis and control, *Morganella morganii* in osteopenia and bone cancer samples, *Salmonella bongorii* and *Enterobacter carcenogenus* in osteopenia sample only, *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella pneumoniae, Shigella flexneri*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella grimantii* in

osteoporosis and osteopenia patients samples without control, *Shigella sonnei* in all patients sample without control, while *Escherichia marmotae* in control samples only.Furthermore, (15) strains of different bacterial species were recorded in National Center for Biotechnology Information(NCBI) under the following names: *Shigella flexneri* (RaAm) *Enterobacter cancerogenus* (RaAm1),*Klebsiella pneumoniae* (RaAm2), *Morganella morganii* (RaAm3), *Escherichia fergusonii* (RaAm4), *Klebsiella pneumoniae* (RaAm5), *Shigella sonnei*(RaAm6), *Escherichia fergusonii*(RaAm7), *Shigella sonnei* (RaAm8), *Escherichia marmotae*(RaAm9), *Morganella morganii* (RaAm12), *Enterobacter hormaechei* (RaAm13), *Escherichia coli* (RaAm13), *Klebsiella oxytoca* (RaAm14) and *Klebsialla grimontii* (RaAm15). In addition, 6(8.8%) of isolates bacterial non-lactose ferment were diagnosed as *E. coli*.

Metagenomic analysis revealed that the bacterial species are present in osteoporosis and most osteopenia while not in control samples, these includes: *Bacteroides caccae*,*Bacteroides clarus*, *Bacteroides stercoris*,*Bacteroides thetaiotaomicron*, *Barnesiella intestinihominis, Butyricimonas paravirosa*, *Coprobacter fastidiosus, Prevotella corporis, Dialister invisus, Dialister propionicifaciens*, *Fusobacterium gonidiaformans*, *Sneathia sanguinegens, Sutterella wadsworthensis*, *Desulfovibrio piger*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter hormaechei*, *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella variicola*, *Morganella morganii*, *Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella planticola*, *Haemophilus pittmaniae*, *Akkermansia muciniphila*. Also the bacterial species that appeared in bone cancer samples but not in control includes*: Bacteroides stercoris*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Butyricimonas paravirosa*, *Prevotella corporis*, *Morganella morganii, Desulfovibrio piger* and *Akkermansia muciniphila*. On the other hand, bee venom had capacity to inhibit bacterial growth at concentration(5000)µg/ ml in addition to it's ability to inhibit(89.14%) of bone cancer cell line at concentration(80)µg/ml. While camel milk and royal jelly did not show any ability to inhibit bacterial growth up to a concentration of (500000)µg/ml but they had the ability to inhibit (79.50%) and(82.61%) of the bone cancer cell line respectively at a concentration (800) and(80)µg/ml without effect of all three substances on human lymphocytes used as a normal cells.In addition , two types of bacteria were isolated and identified from raw camel milk, namely: *E.coli* and *Enterobacter ludwigii*.

الخلاصة

ركزت الدراسة الحالية على ايجاد العلاقة بين بعض أنواع ميكروبات الأمعاء السالبة لصبغة كرام وبعض معايير صحة العظام كهشاشة العظام,ضعف العظام وسرطان العظم، بالإضافة إلى قياس مستويات البوتاسيوم والكالسيوم وفيتامين D3، فضلاً عن دراسة العلاقة بين بكتيريا الحلزونية البوابية وصحة العظام والعلاقة بين هذه البكتيريا ومستوى فيتامين D3. علاوة على ذلك، طرق التشخيص المستخدمة في الدراسة الحالية تضمنت: نظام فايتك 2,*16S rRNA* وميتاجينوميك.

من ناحية اخرى تضمنت الدراسة الحالية اختبار قدرة سم النحل,حليب الإبل وغذاء ملكات النحل على تثبيط بعض أنواع البكتريا بالإضافة إلى دراسة قدرة هذه المواد على تثبيط الخط الخلوي لسرطان العظم وتاثيرها على الخلايا اللمفاوية البشرية كخلايا طبيعية.

تم جمع (140) عينة وبواقع(20) عينة غائط و (20)عينة دم من مرضى هشاشة العظام, (20) عينة غائط و (20) عينة دم من مرضى ضعف العظام,(20) عينة غائط و(20)عينة دم من الاشخاص الاصحاء, بالاضافة الى (10) عينات غائط و (10) عينات دم من مرضى سرطان العظم. علاوة على ذلك,(8) عينات من عينات الغائط وبواقع (2) عينة لكل من مرضى هشاشة العظام وضعف العظام وسرطان العظم والاشخاص الاصحاء تم استخدامها لغرض اجراء تحليل الميتاجينومك.

الدراسة الحالية كشفت أن غالبية حالات هشاشة العظام وضعف العظام منتشرة لدى الأفراد الذين تزيد أعمارهم عن 50 عامًا و الإناث أكثر عرضة لهذه الحالات. بالإضافة إلى ذلك، كانت مستويات البوتاسيوم والكالسيوم طبيعية في أكثر من 85% من المرضى. الغالبية العظمى من المرضى يعانون من نقص أو عدم كفاية في مستوى فيتامين D3. علاوة على ذلك،15 (75%) من مرضى هشاشة العظام مصابون بالبكتيريا الحلزونية البوابية. وكذلك، فإن غالبية المرضى ومجموعة السيطرة المصابين بهذه البكتريا كان لديهم فيتامين D3 أقل من (29) نانوغرام / مل. جميع العزلات البكتيرية تم تشخيصها بواسطة جين *16S rRNA* و نظام فايتك2 والتي تضمنت: *Escherichia coli*(*E. coli*), *Escherichia fergusonii*(*E. fergusonii*) في جميع عينات المرضى ومجموعة السيطرة. *Proteus mirabilis* و*Enterobacter hormaechei* في مرضى هشاشة العظام والسيطرة, *Morganella morganii* في عينات ضعف العظام وسرطان العظم, *Salmonella bongorii* و *Enterobacter carcenogenus* في عينات ضعف العظام فقط, *Cronobacter sakazakii*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* و *Klebsiella grimantii* في عينات مرضى هشاشة العظام وضعف العظام دون مجموعة السيطرة, *Shigella sonnei* في جميع عينات المرضى دون السيطرة, بينما *Escherichia marmotae* في

عينات السيطرة فقط. علاوة على ذلك، تم تسجيل خمسة عشر سلالة من أنواع بكتيرية مختلفة في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) وفق الأسماء التالية:

Shigella flexneri (RaAm) *Enterobacter cancerogenus* (RaAm1),*Klebsiella pneumoniae* (RaAm2), *Morganella morganii* (RaAm3), *Escherichia fergusonii* (RaAm4), *Klebsiella pneumoniae* (RaAm5), *Shigella sonnei*(RaAm6), *Escherichia fergusonii*(RaAm7), *Shigella sonnei* (RaAm8), *Escherichia marmotae*(RaAm9), *Morganella morganii* (RaAm12), *Enterobacter hormaechei* (RaAm13), *Escherichia coli* (RaAm13), *Klebsiella oxytoca* (RaAm14) و (RaAm15) *Klebsialla grimontii* .

بالاضافة الى ذلك, 6(8.8%) عزلات بكتيرية غير المخمرة للاكتور تم تشخيصها على انها *E. coli*. اما تحليل الميتاجينومي اظهرت أن الأنواع البكتيرية الموجودة في عينات هشاشة العظام ومعظم عينات ضعف العظام دون عينات مجموعة السيطرة تشمل:*Bacteroides caccae* , *Bacteroides clarus* , *Bacteroides thetaiotaomicron,Bacteroides stercoris* , *Coprobacter* ,*Barnesiella intestinihominis, Butyricimonas paravirosa* *Dialister propionicifaciens*, , *Prevotella corporis, Dialister invisus,fastidiosus* *Sutterella* , *Sneathia sanguinegens,Fusobacterium gonidiaformans* *Enterobacter asburiae, Enterobacter* , *Desulfovibrio piger,wadsworthensis* *Klebsiella* , *Klebsiella pneumoniae,Enterobacter hormaechei ,aerogenes* *Raoultella* ,*Morganella morganii, Raoultella ornithinolytica ,variicola* *Haemophilus pittmaniae,. Akkermansia muciniphila ,planticola* ايضا,الانواع البكتيرية التي ظهرت في عينات مرضى سرطان العظم دون مجموعة السيطرة تضمنت: *Bacteroides* *Prevotella , Butyricimonas paravirosa,stercoris, Bacteroides thetaiotaomicron* *Akkermansia muciniphila.* و *Desulfovibrio piger,corporis, Morganella morganii*

من ناحية أخرى، كان لسم النحل القدرة على تثبيط نمو البكتيريا عند تركيز (5000) ميكروجرام/مل بالإضافة إلى قدرته على تثبيط (89.14%) من خط الخلوي لسرطان العظم عند تركيز (80) ميكروجرام / مل. في حين لم يظهر حليب الإبل وغذاء ملكات النحل أي قدرة على تثبيط نمو البكتيريا حتى تركيز (500000) ميكروجرام / مل ولكن كان لديهم القدرة على تثبيط (79.50%) و (82.61%) من خط الخلوي لسرطان العظم على التوالي وعند تركيز (800) و (80) ميكروجرام / مل دون تأثير جميع المواد الثلاثة على الخلايا الليمفاوية البشرية التي استخدمت كخلايا طبيعية. بالاضافة الى ذلك, نوعين من البكتريا تم عزلها وتشخيصها من حليب الابل الخام وهما: *E.coli* و *Enterobacter ludwigii*

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

العلاقة بين مايكروبايوتا الأمعاء السالبة لصبغة كرام لدى المصابين بهشاشة و سرطان العظام

رعد محمد محمود جمعة

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / احياء مجهرية

باشراف

الاستاذ الدكتورة

اميرة محمود محمد الراوي

١٤٤٧هـ

٢٠٢٥ م