COMPARISON OF GUT MICROBIOTA BETWEEN TYPE-2 DIABETES MELLITUS PATIENTS AND HEALTHY POPULATION ACROSS THE THREE MAJOR MALAYSIAN ETHNIC GROUPS IN AMPANG, SELANGOR

Geetha A/P K. Letchumanan

Thesis submitted in partial fulfilment for the degree of

MASTER OF MEDICAL SCIENCES

UNIVERSITI SAINS ISLAM MALAYSIA

May 2023

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude to 'The Almighty' for easing out the entire journey taken to carry out this research project. The support from my mother, Mdm Anbalagi Muthusamy and family motivated me to be able to always carry out the assigned task.

I also would love to convey a special acknowledgment with heartfelt appreciation to my supervisors, Dr Siva Gowri Pathmanathan, Dr Nizam Baharom, Dr Marlini Muhamad and Dr Fathima Begum Syed Mohideen for aiding me throughout the project until this thesis preparation. The cooperation and help from Dr Sathya Rao Jogulu, Dr Kamini Retnakumar and staff in Klinik Kesihatan Ampang, Selangor is also worth mentioning here. I too would love to acknowledge the support and love from my close friends, Nava Shankara Sivabalan, Nur Fatin Aqilah, Nur Adlina and Muhammad Aliff for their consideration in lending a helping hand in times of need. The help from my colleagues, Raja Rabiyatun Adawiyah Raja Perdaus, Nur Atiqah and all other post-graduate students in the Faculty of Medical and Health Science, USIM is also highly appreciated. A special thanks to Dr Blair Lawley from the University of Otago, New Zealand for his time and help with my research project here at USIM.

The entire journey from project planning to thesis preparation would not have been feasible without all the names mentioned above. I would like to extend my gratitude to all others who have been a part of this project in aiding me till its completion.

ABSTRAK

Diabetes Mellitus Jenis-2 (T2DM) merupakan faktor utama yang meningkatkan risiko penyakit kardiovaskular dan kadar kematian di Malaysia. Baru-baru ini, hasil pelbagai kajian telah mencadangkan disbiosis dalam mikrobiota usus memainkan peranan yang penting dalam penularan penyakit metabolik, termasuk T2DM. Walaubagaimanapun, di Malaysia, mikrobiota usus dalam kalangan etnik berbilang kaum yang mempunyai T2DM masih belum diterokai. Oleh itu, kajian ini bermatlamat untuk mencirikan komposisi mikrobiota usus di kalangan peserta kajian daripada 3 etnik utama di Malaysia (Melayu, Cina dan India) yang terdiri daripada peserta kajian T2DM dan peserta kajian tanpa diabetes (nonDM). Kajian kawalan kes mikrobiota usus di kalangan warga Malaysia ini terdiri daripada 45 T2DM dan 45 nonDM yang telah dipadankan dari segi kumpulan etnik (N=90). Mikrobiota usus ini telah dianalisa melalui proses '16S rDNA sequencing' yang menyasarkan bahagian V3-V4. Sebagai hasilnya, analisa 'sequencing' ini menunjukkan bakteria dominan di antara semua kumpulan kajian ialah filum *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobakteria* dan *Actinobakteria.* Dalam diversiti alpha, kumpulan T2DM menunjukkan pengurangan diversiti dalam kumpulan nonDM. Selain itu, terdapat perbezaan yang signifikan dalam diversiti beta di antara kumpulan nonDM dan T2DM. Secara keseluruhannya, berbanding dengan kumpulan nonDM, peserta kajian T2DM mempunyai peningkatan dalam komposisi filum *Proteobacteria*, *Synergistetes* dan genus *Escherichia-Shigella* berserta dengan penurunan komposisi genus *Anaerostipes*, *Fusicatenibacter* dan *Clostridium*. Tambahan pula, parameter klinikal yang berbeza dalam kalangan T2DM seperti umur, paras glukosa, alkaline phosphatase (ALP), urea, creatinine dan triglyceride (TG) telah berkorelasi secara positif dengan filum *Proteobakteria* berserta dengan genus *Escherichia-Shigella* dengan umur, BMI, urea dan TG. Selain itu, korelasi secara negatif antara BMI, FPG dan TG dengan genus *Anaerostipes*, BMI dan TG dengan genus *Fusicatenibacter* berserta dengan FPG dan TG dengan genus *Clostidium* turut direkodkan. Kajian ini juga telah menjalankan 'systematic review' untuk mengumpulkan bukti berkaitan dengan perubahan komposisi dan diversiti mikrobiota usus dalam peserta kajian pra-diabetes (preDM) dan pesakit yang baru di diagnosa dengan T2DM (newDM), yang telah dibandingkan dengan peserta kajian tanpa diabetes (nonDM). Secara keseluruhannya, hasil penyelidikan daripada 18 kertas kajian (5, 489 orang peserta kajian), kumpulan preDM dan newDM telah menunjukkan pengurangan diversiti microbiota usus dan pengurangan genus bakteria seperti *Faecalibacterium prausnitzii, Roseburia*, *Dialister*, *Flavonifractor*, *Alistipes, Haemophilus*, *Akkermansia muciniphila* dan peningkatan genus bakteria seperti *Lactobacillus, Streptococcus*, *Escherichi*a, *Veillonella* dan *Collinsella.* Genus *Lactobacillus* juga berkolerasi secara positif dengan paras glukosa, HbA1c dan HOMA-IR. Secara kesimpulannya, hasil kajian ini boleh mengutuhkan pemahaman kita tentang perubahan diversiti dan komposisi microbiota usus dalam penyakit T2DM di kalangan tiga etnik utama dari Malaysia. Selain itu, 'systematic review' yang dijalankan telah meningkatkan pemahaman tentang disbiosis mikrobiota usus yang berlaku semasa perubahan toleransi glukosa pada peringkat awal penyakit T2DM.

ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2DM) is a major risk factor for cardiovascular diseases and the leading cause of death in Malaysia. Accumulating evidence suggests that dysbiosis in the gut microbiota composition plays an important role in the pathogenesis of several metabolic disorders including T2DM. However, in Malaysia, the association between the gut microbiota composition of the multi-ethnic community with T2DM remains unexplored. Hence, this study aimed to investigate the gut microbiota composition in T2DM subjects when compared to non-diabetic subjects (nonDM) among the three major ethnic groups in Malaysia i.e., Malays, Chinese and Indians. This case-control study consisted of 45 T2DM and 45 nonDM participants, matched by ethnicity (N=90). The composition of gut microbiota was investigated using 16S rDNA sequencing targeting the V3 – V4 hypervariable regions. Phyla *Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria,* and *Actinobacteria* were found to be dominant across all study groups. Alpha diversity measures found significantly reduced diversity in the overall T2DM group. Also, a significant difference in beta diversity between the T2DM and nonDM groups was reflected in Malay and Indian ethnicity. In comparison to the respective nonDM groups, T2DMs had increased prevalence and/or abundance of phyla *Proteobacteria*, *Synergistetes* and genus *Escherichia-Shigella* as well as the reduction of genera *Anaerostipes*, *Fusicatenibacter* and *Clostridium.* In addition, the altered clinical characteristics found among T2DMs, i.e., age, fasting plasma glucose (FPG), alkaline phosphatase (ALP), urea, creatinine, and triglyceride (TG) associated positively with phylum *Proteobacteria* as well as genus *Escherichia-Shigella* specifically with age, BMI, urea and TG. On the other hand, negative correlations were observed between BMI, FPG and TG with genus *Anaerostipe*s, BMI and TG with genus *Fusicatenibacter* along with FPG and TG with genus *Clostridiu*m. This study also conducted a systematic review to summarise the existing evidence related to microbiota composition and diversity in prediabetic (preDM) and newly diagnosed T2DM (newDM) individuals in comparison to nonDM. In a total of 18 studies (5,489 participants), the preDM and newDM individuals exhibited low gut microbial diversity along with a decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii, Roseburia, Dialister, Flavonifractor, Alistipes, Haemophilus, Akkermansia muciniphila* and increased abundance of *Lactobacillus, Streptococcus*, *Escherichi*a, *Veillonella* and *Collinsella*. *Lactobacillus* was also found to positively correlate with FPG, HbA1c and HOMA-IR. In conclusion, findings from this study have provided us with a better insight into the diversity and composition of the diabetic gut microbiota in a multi-ethnic Malaysian population, while the systematic review has improved our understanding of gut microbial dysbiosis during the early stages of glucose intolerance.

الخُلاصَة

في ماليزيا، مرض السكري من النوع الثاني (T2DM) هو السبب الرئيسي للوفيات، حيث أنه من أخطر عوامل الأمراض القلبية والوعائية. وهناك الكثير من الأدلة التي تُشير إلى أن عدم التوازُن في تركيبة البكتيريا الموجودة في الأمعاء، والمعروفة باسم "dysbiosis"، تُسهِم بشكل كبير في تَطوُّر العديد من اضطرابات التمثيل الغذائي، مُتضمِّنًا مرض السكري من النوع الثاني. ومع ذلك، لم يُجرَى أي تحقيق في دراسة العلاقة بين تركيبة بكتيريا الأمعاء لدى سكان ماليزيا المُتعدِّدَة الأعراق ومرض السكري من النوع الثاني. يَهدِفُ هذا البحث إلى تحليل تركيب البكتيريا الموجودة في الأمعاء لدى مرضى السكري من النوع الثاني (T2DM) مُقارَنَةً بذلك لدى الأفراد غير المصابين بالسكري (nonDM) بين ثلاثة عرقيات رئيسية في ماليزيا، وهم الملايو والصينيون والهنود. لقد شَمِلَت هذه الدراسة 90 مشارك إجمالًا، 45 منهم مصابون بالسكري من النوع الثاني (T2DM)، و45 آخرون غيرُ مُصابين بمرض السكري (nonDM)، وقد أُختيروا حسب عِرقهم ومُراعاة التوافق بين المجموعتين. استخدم الباحثون تقنية تسلسل 16S rDNA لتحليل تركيب البكتيريا الموجودة في الأمعاء والتي استَهدَفَت المناطق القابلة للتباين العالي V4 - V3. وقد عُثِرَ على الفصائل *Firmicutes*، و*Bacteroidetes*، و*Proteobacteria*، و*Actinobacteria* كأبرز الفصائل عبر جميع مجموعات الدراسة. وقد أَشارَت نتائج قياسات التنوُّع ألفا إلى انخفاض ملحوظ في التنوع داخل مجموعة الأشخاص المصابين بالسكري من النوع الثاني بشكل عام. وأَظهَرَت الجماعات العرقية الماليزية والهندية اختلافًا ملحوظًا في تنوُّع القياس بيتا بين مجموعات الأشخاص المُصابين بالسكري من النوع الثاني والأشخاص الغير مُصابين بالسكري. بالمقارنة مع الأشخاص غير المصابين بالسكري، لُوحِظَ أن مرضى السكري من النوع الثاني يزداد لديهم انتشار البكتيريا *Proteobacteria*، و*Synergistetes* و*Escherichia-Shigella*، بالإضافة إلى قِلَّة الأنواع *Anaerostipes*، و*Fusicatenibacter* و*Clostridium*. كما أن الخصائص السريرية المُعدَّلة المُكتَشَفَة لدى مرضى السكري من النوع الثاني - مثل العمر، وسكري الدم الصائم (FPG)، والفوسفاتيز القلوية (ALP)، واليوريا، والكرياتينين، وثلاثي الغليسريد (TG) - أَظهَرَت علاقة ايجابية مع بكتيريا *Proteobacteria* وبكتيريا *Escherichia-Shigella*. وعلى وجه التحديد، كان العمر ومؤشر كتلة الجسم واليوريا وثلاثي الغليسريد (TG) مرتبطين بشكل ملحوظ بالنوع *Escherichia-Shigella*. وعلى الجانب الآخر، لُوحظَت علاقات عكسية بين؛ مؤشر كتلة الجسم وسكر الدم الصائم وثلاثي الغليسريد (TG) مع بكتيريا *Anaerostipes*، مؤشر كتلة الجسم وثلاثي الغليسريد (TG) مع البكتيريا *Fusicatenibacter*، سكر الدم الصائم وثلاثي الغليسريد (TG) مع البكتيريا *Clostridium*. لقد أجرَت هذه الدراسة أيضًا مراجعة نظامية لتقديم نظرة عامة على الأدلة الحالية المتعلقة بتركيبة وتنوُّع البكتيريا الموجودة في الأمعاء لدى الأفراد المصابين بمرحلة ما قبل السكري (preDM) أو الذين شُخِّصوا حديثًا بالسكري من النوع الثاني (newDM) بالمقارنة مع الأفراد غير المصابين بالسكري. وشَمَلت المراجعة 18 دراسة بمشاركة إجمالية بَلَغتْ 5489 مشارك، والتي أظهرت أن الأفراد المصابين بمرحلة ما قبل السكري والذين شُخِّصوا حديثًا بالسكري من النوع الثاني لديهم تنوُّع حيوي منخفض في أمعائهم، مع انخفاض وفرة البكتيريا *Faecalibacterium prausnitzii* و*Roseburia* و*Dialister* و*Flavonifractor* و*Alistipes* و*Haemophilus* و*Akkermansia muciniphila*، وزيادة وفرة البكتيريا *Lactobacillus* و*Streptococcus* و*Escherichia* و*Veillonella* و*Collinsella*. تَبَيَّن أيضًا أن البكتيريا *Lactobacillus* تَرتَبِط بشكل إيجابي مع سكر الدم الصائم (FPG)، والهيموجلوبين المُعدَّل (HbA1c)، ومؤشر التحمل للأنسولين (HOMA-IR). لتلخيص النتائج، لقد أَسهَمَت نتائج هذه الدراسة في إلقاء الضوء على تركيبة وتنوُّع البكتيريا الموجودة في الأمعاء لدى الأفراد من مُختَلِف الأعراق، والذين يعانون من السكري من النوع الثاني في ماليزيا. كما ساهَمَت المُراجَعَة النظامية في تحسين فهمنا لعدم التوازن في الميكروبات الموجودة في الأمعاء في المراحل الأولى من عدم تحمُّل الجلوكوز.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF APPENDICES

LIST OF ABBREVIATIONS

2HPP	2-hour postprandial
Alb	Albumin
ALT	Alanine transaminase
ASV	Amplicon sequence variant
ALP	Alkaline phosphatase
BMI	Body Mass Index
CGI	Combined glucose intolerance
Cl	Chloride
Cr	Creatinine
CRP	C-reactive protein
CVD	Cardiovascular diseases
ECG	Electrocardiogram
FDR	False Discovery Rate
FPG	Fasting plasma glucose
FSL	Fasting serum lipids
gDNA	Genomic DNA
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) receptor agonists
HbA1c	Hemoglobin A1c
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol
HDL/TC	Ratio of HDL-C/total cholesterol
HGM	Human gut microbiota
HOMA-IR	Homeostasis model assessment-estimated insulin resistance
IFG	Impaired fasting glucose
IL-6	Interleukin-6
K	Potassium
LBP	Lipopolysaccharide-binding protein
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol
LFT	Liver function tests
LPS	Lipopolysaccharide
Na	Sodium
NGS	Next-generation sequencing
newDM	Newly diagnosed T2DM participants
nonDM	Non-diabetic/healthy participants
OAD	Oral anti-diabetic agents/medication
OGTT	Oral glucose tolerance test
PCoA	Principal coordinate analysis
PCR QC	Polymerase chain reaction quality control
preDM	Pre-diabetics
RP	Renal profile
SCFA	Short-chain fatty acids
Sp.	Species
T2DM	Type 2 diabetes Mellitus disease/participants
TB	Total bilirubin
TC	Total cholesterol
TG	Triglyceride
TP	Total protein
TNF	Tumor necrosis factor
Ur	Urea
WHR	Waist-to-hip ratio