



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

Μετα-ανάλυση δεδομένων μεταγονιδιωματικής

Ευαγγελία-Αθηνά Τόδα

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Επιβλέπων
Παντελεήμων Μπάγκος, Καθηγητής**

Λαμία, 2025



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

Μετα-ανάλυση δεδομένων μεταγονιδιωματικής

Ευαγγελία-Αθηνά Τόδα

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επιβλέποντες:
Μπάγκος Παντελεήμων, Καθηγητης
Μπράλιου Γεωργία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια**

Λαμία, 2025

Με ατομική μου ευθύνη και γνωρίζοντας τις κυρώσεις ⁽¹⁾, που προβλέπονται από της διατάξεις της παρ. 6 του άρθρου 22 του Ν. 1599/1986, δηλώνω ότι:

1. Δεν παραθέτω κομμάτια βιβλίων ή άρθρων ή εργασιών άλλων αυτολεξεί **χωρίς να τα περικλείω σε εισαγωγικά** και χωρίς να αναφέρω το συγγραφέα, τη χρονολογία, τη σελίδα. Η αυτολεξεί παράθεση χωρίς εισαγωγικά χωρίς αναφορά στην πηγή, είναι λογοκλοπή. Πέραν της αυτολεξεί παράθεσης, λογοκλοπή θεωρείται και η παράφραση εδαφίων από έργα άλλων, συμπεριλαμβανομένων και έργων συμφοιτητών μου, καθώς και η παράθεση στοιχείων που άλλοι συνέλεξαν ή επεξεργάστηκαν, χωρίς αναφορά στην πηγή. Αναφέρω πάντοτε με πληρότητα την πηγή κάτω από τον πίνακα ή σχέδιο, όπως στα παραθέματα.
2. Δέχομαι ότι η αυτολεξεί **παράθεση χωρίς εισαγωγικά**, ακόμα κι αν συνοδεύεται από αναφορά στην πηγή σε κάποιο άλλο σημείο του κειμένου ή στο τέλος του, είναι αντιγραφή. Η αναφορά στην πηγή στο τέλος π.χ. μιας παραγράφου ή μιας σελίδας, δεν δικαιολογεί συρραφή εδαφίων έργου άλλου συγγραφέα, έστω και παραφρασμένων, και παρουσίασή τους ως δική μου εργασία.
3. Δέχομαι ότι υπάρχει επίσης περιορισμός στο μέγεθος και στη συχνότητα των παραθεμάτων που μπορώ να εντάξω στην εργασία μου εντός εισαγωγικών. Κάθε μεγάλο παράθεμα (π.χ. σε πίνακα ή πλαίσιο, κλπ), προϋποθέτει ειδικές ρυθμίσεις, και όταν δημοσιεύεται προϋποθέτει την άδεια του συγγραφέα ή του εκδότη. Το ίδιο και οι πίνακες και τα σχέδια
4. Δέχομαι όλες τις συνέπειες σε περίπτωση λογοκλοπής ή αντιγραφής.

Ημερομηνία:/...../20.....

Ο – Η Δηλ.

(Υπογραφή)

(1) «Όποιος εν γνώσει του δηλώνει ψευδή γεγονότα ή αρνείται ή αποκρύπτει τα αληθινά με έγγραφη υπεύθυνη δήλωση του άρθρου 8 παρ. 4 Ν. 1599/1986 τιμωρείται με φυλάκιση τουλάχιστον τριών μηνών. Εάν ο υπαίτιος αυτών των πράξεων σκόπευε να προσπορίσει στον εαυτόν του ή σε άλλον περιουσιακό όφελος βλάπτοντας τρίτον ή σκόπευε να βλάψει άλλον, τιμωρείται με κάθειρξη μέχρι 10 ετών.

Μετα-ανάλυση δεδομένων μεταγονιδιωματικής

Ευαγγελία-Αθηνά Τόδα

Τριμελής Επιτροπή:

Παντελεήμων Μπάγκος, Καθηγητής, Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική

Γεωργία Μπράλιου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική

Παναγιώτα Κοντού, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Μαθηματικών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική, κα. Γεωργία Μπράλιου, για την ανάθεση και επίβλεψη της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή του Τμήματος κ. Παντελή Μπάγκο, για τις τεχνικές του επισημάνσεις σε ζητήματα μεθοδολογίας και στατιστικής επεξεργασίας.

Θα ήθελα να αναφερθώ και να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη μεταδιδάκτορα του τμήματος ΠΕΒ, κα. Αργυρώ Καλογεροπούλου, για την σταθερή υποστήριξη, συνεχή επικοινωνία και την πολύτιμη συμβολή σε όλα τα στάδια της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ το οικογενειακό και φιλικό μου περιβάλλον για τη διαρκή στήριξη και ενθάρρυνση καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας, αλλά και σε κάθε στάδιο των σπουδών μου.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	10
1. Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	13
1.1 Φάσμα Αυτισμού (ASD).....	13
1.2 Το περιοδοντικό μικροβίωμα.....	14
1.3 Άξονας στόμα- έντερο- εγκέφαλος.....	15
1.4 Μετα-Ανάλυση	17
1.5 Αλληλούχιση DNA και Next Generation Sequencing (NGS)	18
1.6 Αλληλούχιση 16s rRNA	19
1.7 ICD-10	20
1.8 Σχετική Αφθονία (Relative Abundance).....	21
1.9 Σημαντικά βακτηριακά φύλα του μικροβιώματος.....	22
1.9.1 Bacteroidetes.....	22
1.9.2 Firmicutes	22
1.9.3 Actinobacteria	22
1.9.4 Proteobacteria	23
1.9.5 Fusobacteria	23
1.10 Άλφα Ποικιλότητα (Alpha Diversity).....	23
1.11 Βάσεις δεδομένων.....	24
1.12 Σκοπός της εργασίας.....	25
2. Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι	27
2.1 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων.....	27
2.1.1 Στρατηγική αναζήτησης.....	27
2.1.2 Αυτοματοποιημένος έλεγχος και επιλογή.....	27
2.2 Οργάνωση και τεκμηρίωση δεδομένων	29
2.3 Μέγεθος Επίδρασης (Effect Size).....	31
2.4 Διάστημα Εμπιστοσύνης (Confidence Interval)	32
2.5 Τυπική Απόκλιση (Standard Deviation)	33
2.6 Τυπικό Σφάλμα (Standard Error).....	34
2.7 Stata.....	35
2.7.1 Η εντολή meta.....	35
3. Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα	37
3.1 Στρατηγική Αναζήτησης.....	39
3.2 Μετα-ανάλυση δεδομένων Άλφα Ποικιλότητας	39

3.2.1 Ανάλυση διαστρωμάτωσης των δεικτών άλφα ποικιλότητα	42
3.2.2 Μετα-ανάλυση της μέσης διαφοράς για άλφα ποικιλότητα	44
3.3 Μετα-ανάλυση σε επίπεδο φύλου (phylum).....	46
3.3.1 Ανάλυση διαστρωμάτωσης στα Proteobacteria	49
3.3.2 Ανάλυση διαστρωμάτωσης στα Actinobacteria	50
3.3.3 Ανάλυση διαστρωμάτωσης στα Fusobacteria.....	51
3.3.4 Ανάλυση διαστρωμάτωσης στους Firmicutes	52
3.3.5 Ανάλυση διαστρωμάτωσης στους Bacteroidetes.....	53
3.4 Μετα-ανάλυση μέσης διαφοράς των δεδομένων σχετικής αφθονίας.....	54
3.4.1 Actinobacteria.....	54
3.4.2 Firmicutes.....	55
3.4.3 Fusobacteria.....	55
3.4.4 Bacteroidetes.....	56
3.4.5 Proteobacteria.....	57
4. Κεφάλαιο 4: Συζήτηση.....	61
4.1 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων για την α-ποικιλότητα	61
4.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων για τη σχετική αφθονία βακτηριακών φύλων.....	62
4.3 Συνολική αξιολόγηση.....	63
5. Βιβλιογραφία	64
6. Παράρτημα Α	67

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών της σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική κατά το χρονικό διάστημα 2024-2025, υπό την επίβλεψη της επίκουρης καθηγήτριας Γεωργίας Μπράλιου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της πιθανής σχέσης μεταξύ του περιοδοντικού μικροβιώματος και του αυτιστικού φάσματος (ASD), μέσω μετα-ανάλυσης δημοσιευμένων ερευνητικών μελετών. Η ενασχόληση με το εν λόγω θέμα μου έδωσε την ευκαιρία να εμβαθύνω σε ένα διαθεματικό πεδίο που συνδυάζει τη βιοπληροφορική, τις νευροεπιστήμες και την ανάλυση δεδομένων, καθώς και να αποκτήσω πρακτική εμπειρία σε τεχνικές επεξεργασίας και αξιολόγησης επιστημονικής βιβλιογραφίας με τη βοήθεια υπολογιστικών εργαλείων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, η μικροβιακή κοινότητα της στοματικής κοιλότητας έχει αναδειχθεί ως σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει όχι μόνο την τοπική, αλλά και τη συστηματική υγεία. Ένας τομέας που συγκεντρώνει ολοένα και μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον είναι η πιθανή εμπλοκή του μικροβιώματος στη ρύθμιση νευροαναπτυξιακών λειτουργιών, μέσω της αμφίδρομης αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο έντερο, την μικροβιακή κοινότητα και στον εγκέφαλο, που είναι γνωστή ως άξονας εντέρου-εγκεφάλου (gut-brain axis). Πρόσφατα, έχει προταθεί η επέκταση αυτής της έννοιας ώστε να περιλαμβάνει και το στοματικό μικροβίωμα, διαμορφώνοντας τον λεγόμενο στοματο-έντερο-εγκεφαλικό άξονα (oral-gut-brain axis).

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εξετάζει τη σχέση μεταξύ του περιοδοντικού μικροβιώματος και του αυτιστικού φάσματος (ASD), μέσω μετα-ανάλυσης δημοσιευμένων μελετών που συγκρίνουν δείγματα από άτομα με ASD και νευροτυπικά άτομα. Η ανάλυση εστιάζει σε δείκτες μικροβιακής ποικιλότητας (Shannon, Shannon Evenness) και στις σχετικές αφθονίες βασικών βακτηριακών φύλων.

Η εργασία αποσκοπεί να συμβάλει στη διεπιστημονική κατανόηση της σχέσης μεταξύ μικροβιώματος και αυτισμού, αναδεικνύοντας τη σημασία της μετα-ανάλυσης ως μέσου για τη σύνθεση και ερμηνεία ποικίλων δεδομένων, και θέτοντας τις βάσεις για μελλοντικές μελέτες στον τομέα της νευρομικροβιακής αλληλεπίδρασης.

Λέξεις κλειδιά: Περιοδοντικό μικροβίωμα, αυτιστικό φάσμα (ASD), μετα-ανάλυση, στοματο-έντερο-εγκεφαλικός άξονας, μικροβιακή ποικιλότητα.

ABSTRACT

Over the past few years, the microbial community of the oral cavity has emerged as a significant factor influencing not only local but also systemic health. One area garnering increasing research interest is the potential involvement of the microbiome in regulating neurodevelopmental functions, through the bidirectional interaction between the gut, the microbial community, and the brain, known as gut- brain axis. An extension of this concept to the oral microbiome has recently been proposed, resulting in the formulation of the oral–gut–brain axis.

This thesis examines the relationship between the periodontal microbiome and Autism Spectrum Disorder (ASD), through a meta- analysis of published studies comparing samples from individuals with ASD and neurotypical individuals. The analysis focuses on microbial diversity indices (Shannon, Shannon Evenness) and the relative abundances of key bacterial phyla.

The aim of this work is to contribute to the interdisciplinary understanding of the relationship between the microbiome and autism, highlighting the importance of meta-analysis as a means for synthesizing and interpreting diverse data, and laying the groundwork for future studies in the field of neuro-microbial interaction.

Key words: Periodontal microbiome, Autism Spectrum Disorder (ASD), meta-analysis, microbial diversity, oral-gut-brain axis.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Φάσμα Αυτισμού (ASD)

Το φάσμα του Αυτισμού (Autism Spectrum Disorder-ASD) αποτελεί μία σύνθετη νευροαναπτυξιακή διαταραχή, η οποία επηρεάζει την κοινωνική επικοινωνία, την αλληλεπίδραση και τη συμπεριφορά του ατόμου. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από περιορισμένα και επαναλαμβανόμενα μοτίβα συμπεριφοράς, καθώς και από δυσκολίες στην κατανόηση και χρήση μη λεκτικών μορφών επικοινωνίας. Η ποικιλομορφία των συμπτωμάτων και η ετερογένεια στην ένταση τους περιγράφονται με τον όρο «φάσμα», υποδηλώνοντας ότι κάθε άτομο με ASD παρουσιάζει μοναδικό κλινικό προφίλ.

Τα συμπτώματα συνήθως εμφανίζονται από τα πρώτα χρόνια της ζωής και σχετίζονται με την αναπτυξιακή πορεία του ατόμου, επηρεάζοντας συχνά τις ικανότητες κοινωνικής αλληλεπίδρασης, τη γλωσσική ανάπτυξη και την προσαρμοστική συμπεριφορά [1]. Η διάγνωση βασίζεται στα διαγνωστικά κριτήρια του DSM-5, τα οποία περιλαμβάνουν ελλείμματα στην κοινωνική αλληλεπίδραση και επικοινωνία, καθώς και περιορισμένα ή στερεοτυπικά μοτίβα ενδιαφερόντων και συμπεριφορών [2].

Σε επιδημιολογικό επίπεδο, οι πιο πρόσφατες πληροφορίες από τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των ΗΠΑ (CDC, 2023) δείχνουν ότι το ποσοστό διάγνωσης του ASD ανέρχεται σε περίπου 1 στα 31 παιδιά ηλικίας 8 ετών (περίπου 3,2%), με τη διαταραχή να παρατηρείται πιο συχνά στα αγόρια σε σύγκριση με τα κορίτσια [3]. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι το ASD επηρεάζει περίπου το 1% του παγκόσμιου πληθυσμού παιδιών [4].

Η αιτιολογία του αυτιστικού φάσματος είναι πολυπαραγοντική. Σημαντικά ερευνητικά στοιχεία υπογραμμίζουν τη συμμετοχή γενετικών παραμέτρων και περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως οι περιγεννητικές επιπλοκές ή η έκθεση σε τοξικές ουσίες κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Παράλληλα, η διερεύνηση του ρόλου του μικροβιώματος και της λειτουργικής σύνδεσης εντέρου- εγκεφάλου (gut- brain axis) συγκεντρώνει ολοένα και μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, καθιστώντας τη μελέτη

της σχέσης ανάμεσα στις μικροβιακές κοινότητες και τις νευροαναπτυξιακές εκφάνσεις πεδίο εντατικής επιστημονικής ανάλυσης [5].

1.2 Το περιοδοντικό μικροβίωμα

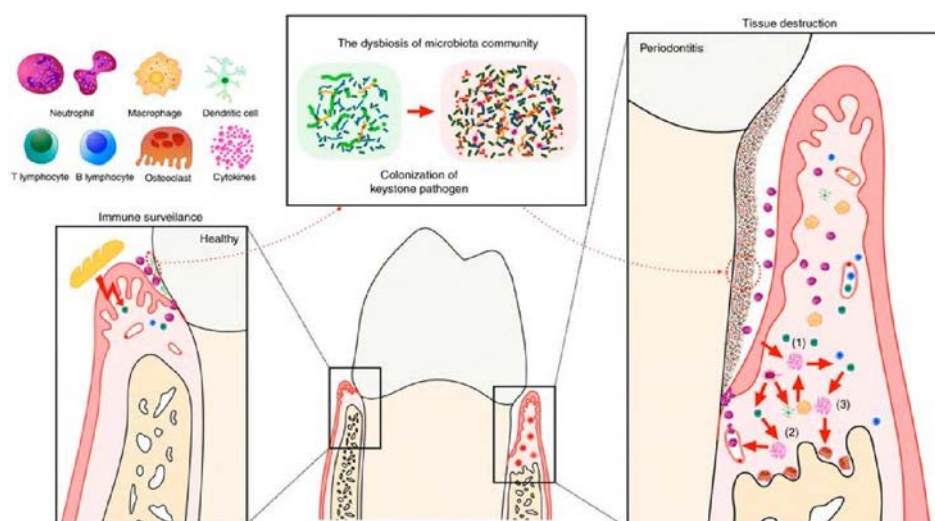
Το περιοδοντικό μικροβίωμα αναφέρεται στο σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν τους περιοδοντικούς ιστούς (ούλα, θυλάκους περιοδοντίου, οστούς στήριξης δοντιών κ.α.) και αποτελεί τμήμα του μικροβιώματος της στοματικής κοιλότητας. Η στοματική κοιλότητα φιλοξενεί μία εξαιρετικά πολύπλοκη και ποικιλόμορφη μικροβιακή κοινότητα -περισσότερα από 700 διαφορετικά είδη βακτηρίων, ιών, μυκήτων και αρχαίων- που εγκαθίστανται σε ποικίλες επιφάνειες (γλώσσα, δόντια, ουλοβλεννογόνο) και συμβάλουν στην τοπική και συστηματική υγεία.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί οργανώνονται σε βιομεμβράνες (οδοντική πλάκα) και βρίσκονται σε δυναμική συμβιωτική ισορροπία με τον ξενιστή, διαδραματίζοντας κομβικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του περιοδοντίου.

Μέσω των φυσικών αμυντικών μηχανισμών, αυτό το μικροβιακό οικοσύστημα ενεργεί ως προστατευτικός φραγμός, εμποδίζοντας τον αποικισμό από παθογόνους μικροοργανισμούς και αποτρέποντας έτσι δυνητικές λοιμώξεις στην στοματική κοιλότητα. Επιπλέον, ένα υγιές περιοδοντικό μικροβίωμα συμβάλλει στην αποφυγή κοινών οδοντικών παθήσεων (όπως η τερηδόνα και η ουλίτιδα/ περιοδοντίτιδα) μέσω του ανταγωνισμού και της ρύθμισης της ανάπτυξης δυνητικά παθογόνων βακτηρίων.

Η σύνθεση του περιοδοντικού μικροβιώματος παραμένει σταθερή υπό φυσιολογικές συνθήκες (ευβίωση), ωστόσο επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η διατροφή, η στοματική υγιεινή, το κάπνισμα, και η ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή. Όταν αυτή η οικολογική ισορροπία διαταραχθεί- μία κατάσταση που ονομάζεται δυσβίωση- ορισμένοι ευκαιριακοί μικροοργανισμοί ενδέχεται να πολλαπλασιαστούν ανεξέλεγκτα και να μετατραπούν σε παθογόνους, προκαλώντας περιοδοντικές νόσους. Η μικροβιακή ανισορροπία στο περιοδόντιο, δεν επιδρά όμως μόνο τοπικά, αλλά δύναται να έχει ευρύτερες συνέπειες στον οργανισμό (Εικόνα 1).

Τα κυρίαρχα βακτηριακά φύλα που εντοπίζονται στο περιοδοντικό μικροβίωμα περιλαμβάνουν κυρίως τα Actinomycetota, Bacteroidota και Spirochaetota, ενώ επίσης συχνά απαντώνται τα Fusobacteriota και Firmicutes. Η παρουσία και σχετική αφθονία αυτών των φύλων έχει παρατηρηθεί τόσο σε ρηχές όσο και σε βαθιές περιοδοντικές θυλάκες, υποδεικνύοντας τον βασικό τους ρόλο στη διαμόρφωση της περιοδοντικής μικροβιακής κοινότητας [6].



Εικόνα 1 Υγής περιοδοντικός ιστός και η παθογένεια της χρόνιας περιοδοντίτιδας.

1.3 Άξονας στόμα- έντερο- εγκέφαλος

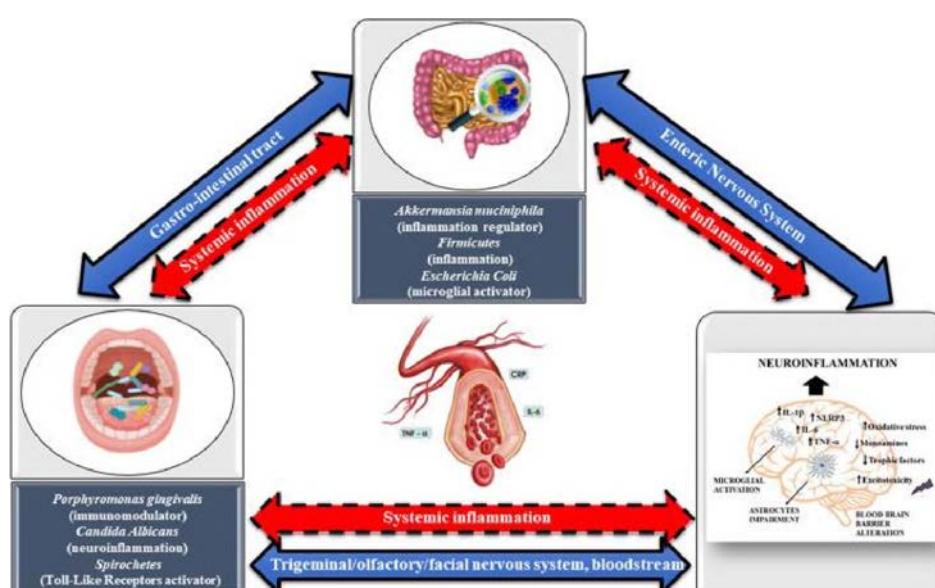
Η περιοδοντίτιδα αποτελεί μία χρόνια φλεγμονώδη νόσο των στηρικτικών ιστών των δοντιών, η οποία σήμερα θεωρείται χαρακτηριστικό παράδειγμα πάθησης που προκύπτει από ανισορροπία του μικροβιώματος. Με άλλα λόγια, η αλλαγή στη σύνθεση του περιοδοντικού μικροβιακού οικοσυστήματος- με επικράτηση παθογόνων και μείωση των ωφέλιμων συμβιωτικών μικροβίων- είναι η κύρια αιτία που πυροδοτεί τη φλεγμονώδη καταστροφή των περιοδοντικών ιστών. Η δυσβίωση αυτή οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή χαμηλού βαθμού, η οποία μπορεί στη συνέχεια να προκαλέσει βλάβες και σε απομακρυσμένα όργανα και ιστούς.

Πέρα από την τοπική φλεγμονή, έχει προταθεί ότι η δυσβίωση του περιοδοντικού μικροβιώματος μπορεί να σχετίζεται με συστηματικές παθήσεις μέσω ενός πολύπλοκου δικτύου αλληλεπίδρασης, που ονομάζεται άξονας στόμα- έντερο-

εγκέφαλος (oral- gut- brain axis). Ο άξονας αυτός περιγράφει τις αμφίδρομες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του στοματικού μικροβιώματος, του εντερικού μικροβιώματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος, μέσω νευρικών, ενδοκρινών και ανοσολογικών μηχανισμών (Εικόνα 2).

Καθημερινά, σημαντικός αριθμός μικροοργανισμών από τη στοματική κοιλότητα καταπίνεται και έχει τη δυνατότητα να επιβιώσει στο γαστρεντερικό σωλήνα, μεταβάλλοντας τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας. Ταυτόχρονα, υπάρχουν άμεσες νευρικές συνδέσεις, μεταξύ του στόματος και του εγκεφάλου, όπως μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου. Παράλληλα, προϊόντα από μικρόβια και φλεγμονώδεις παράγοντες που παράγονται από παθογόνα βακτήρια μπορούν να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα, επηρεάζοντας έτσι τη συστηματική ομοιόσταση και τις εγκεφαλικές λειτουργίες.

Μέσω αυτών των οδών, η στοματική δυσβίωση έχει τη δυναμική να επιδράσει όχι μόνο στη στοματική υγεία, αλλά και σε νευροβιολογικές διαδικασίες, υποδεικνύοντας μια δυνητική συμβολή της σε νευροαναπτυξιακές και νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Ο άξονας στόμα- έντερο- εγκέφαλος, επομένως, αναδεικνύεται -ως ένας νέος μηχανισμός που εξηγεί τη δυνητική επίδραση χρόνιων φλεγμονών του περιοδοντίου σε συστήματα εκτός της στοματικής κοιλότητας, ακόμη και στον εγκέφαλο [5][7].



Εικόνα 2 Απεικόνιση του άξονα στόμα-έντερο-εγκέφαλος

1.4 Μετα-Ανάλυση

Η επιστημονική διερεύνηση την σχέσης ανάμεσα στο περιοδοντικό μικροβίωμα και το αυτιστικό φάσμα (ASD) βασίζεται σε ποικίλες μελέτες, οι οποίες διαφέρουν όσον αναφορά το δείγμα, τη μεθοδολογία, και τα εργαλεία ανάλυσης. Αυτή η ετερογένεια αναδεικνύει την ανάγκη για μία μέθοδο που να διευκολύνει τη συγκέντρωση των διαθέσιμων στοιχείων σε ένα συνολικό, αξιόπιστο αποτέλεσμα. Σε αυτό το πλαίσιο, η μετα-ανάλυση αποδεικνύεται να είναι ένα σημαντικό στατιστικό εργαλείο.

Η μετα-ανάλυση αποτελεί μία οργανωμένη διαδικασία συγχώνευσης των ευρημάτων διαφόρων ανεξάρτητων μελετών που διερευνούν το ίδιο ερευνητικό ερώτημα. Παρέχει τη δυνατότητα αύξησης της στατιστικής ισχύος, ελάφρυνσης της πιθανότητας σφάλματος και εξαγωγής πιο γενικευμένων και αξιόπιστων συμπερασμάτων, κυρίως όταν οι επιμέρους μελέτες διαθέτουν μικρά δείγματα ή εμφανίζουν αντιφατικά ευρήματα (Haidich, 2010). Όπως τονίζουν οι Borenstein και συν. (2009), η μετα-ανάλυση αποτελεί βασικό συστατικό της τεκμηριωμένης ιατρικής, διότι συγκεντρώνει και αποτιμά το σύνολο των διαθέσιμων ερευνητικών δεδομένων (Εικόνα 3) .

Η διαδικασία της μετα-ανάλυσης περιλαμβάνει μια σειρά αυστηρά καθορισμένων βημάτων: τον σαφή προσδιορισμό του ερευνητικού ερωτήματος, τη συστηματική αναζήτηση βιβλιογραφίας με βάση προκαθορισμένων κριτηρίων, την επιλογή μελετών βάσει συγκεκριμένων κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού, την αξιολόγηση της ποιότητάς τους και την εξαγωγή των απαραίτητων δεδομένων. Ακολουθεί η στατιστική ανάλυση των στοιχείων χρησιμοποιώντας κατάλληλα μοντέλα (σταθερών ή τυχαίων επιδράσεων), η εκτίμηση της ετερογένειας, καθώς και η αξιολόγηση της μεροληψίας που προέρχεται από τη δημοσίευση και οι αναλύσεις ευαισθησίας [8].

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, επιλέχθηκε η εφαρμογή μιας μετα-αναλυτικής προσέγγισης με σκοπό την συστηματική αξιολόγηση των διαθέσιμων μελετών που εξετάζουν τη σχέση του περιοδοντικού μικροβιώματος με το αυτιστικό φάσμα. Με αυτή την προσέγγιση, επιδιώκεται η ενίσχυση της τεκμηρίωσης της έρευνας και η ανάδειξη ενδεχόμενων βιολογικών μηχανισμών σύνδεσης, στη βάση των συγκεντρωμένων δεδομένων της διεθνούς βιβλιογραφίας.



Εικόνα 3 Ιεραρχία επιπέδων τεκμηρίωσης στην βασισμένη σε ενδείξεις ιατρική

1.5 Αλληλούχιση DNA και Next Generation Sequencing (NGS)

Η αλληλούχιση του DNA αποτελεί μία βασική μέθοδο της μοριακής βιολογίας, η οποία επιτρέπει τον προσδιορισμό της ακριβούς διάταξης των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (A,T,C,G) που απαρτίζουν το μόριο του DNA. Η κατανόηση αυτής της αλληλουχίας είναι απαραίτητη για την ερμηνεία της γενετικής πληροφορίας που φέρει ένας οργανισμός, διευκολύνοντας την ταυτοποίηση γονιδίων, την ανίχνευση μεταλλάξεων και την ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας ανάμεσα σε διάφορους οργανισμούς ή πληθυσμούς.

Η τεχνολογία αλληλούχισης DNA έχει εξελιχθεί ραγδαία τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Η μέθοδος Sanger, η οποία επικράτησε από τη δεκαετία του 1970 μέχρι τις αρχές του 21^{ου} αιώνα, αν και εξαιρετικά αξιόπιστη, παρουσίαζε χαμηλούς ρυθμούς παραγωγής και περιορισμένη αποδοτικότητα. Η ανάπτυξη των τεχνολογιών επόμενης γενιάς (Next- Generation- Sequencing- NGS) έφερε επανάσταση στο πεδίο, διευκολύνοντας την ταυτόχρονη αλληλούχιση εκατομμυρίων DNA μορίων με αυξημένη ταχύτητα, ακρίβεια και σημαντικά μειωμένο κόστος. Μέσω των NGS τεχνικών επιτεύχθηκε η ευρεία ανάλυση ολόκληρων γονιδιωμάτων και μεταγραφωμάτων, με σημαντικές εφαρμογές τόσο στην έρευνα όσο και στις διαγνωστικές διαδικασίες [9].

1.6 Αλληλούχιση 16s rRNA

Μία από τις κυριότερες χρήσεις των τεχνολογιών NGS είναι η μελέτη του μικροβιώματος μέσω της αλληλουχίας του γονιδίου 16s rRNA. Το συγκεκριμένο γονίδιο βρίσκεται σε όλα τα βακτήρια και περιέχει τόσο συντηρημένες όσο και υπερμεταβλητές περιοχές, οι οποίες επιτρέπουν την ταυτοποίηση και φυλογενετική ταξινόμηση των βακτηρίων, συνήθως στο επίπεδο του γένους ή του είδους. Η αλληλούχιση του 16s rRNA με τη μέθοδο αλληλούχισης υψηλής απόδοσης αποτελεί καθιερωμένη μέθοδο για την εξερεύνηση της βακτηριακής ποικιλότητας σε σύνθετα μικροβιώματα, όπως το περιοδοντικό, χωρίς να είναι αναγκαία η καλλιέργεια μικροβίων.

Η διαδικασία περιλαμβάνει την απομόνωση DNA από τα δείγματα, την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδίου 16S rRNA (π.χ. V3–V4) μέσω PCR, τη δημιουργία βιβλιοθηκών αλληλούχισης και την αλληλούχιση σε πλατφόρμες όπως το Illumina MiSeq. Τα δεδομένα υποβάλλονται σε επεξεργασία μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης, περιλαμβάνοντας φιλτράρισμα, ταξινόμηση σε λειτουργικές μονάδες (Operational Taxonomic Units – OTUs ή Amplicon Sequence Variants – ASVs), και αντιστοίχιση σε βάσεις δεδομένων όπως οι SILVA και Greengenes.

Στο πλαίσιο της παρούσας μετα-ανάλυσης, επιλέχθηκαν αποκλειστικά έρευνες που χρησιμοποίησαν τεχνολογίες NGS και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA, με σκοπό την εξασφάλιση της ομοιομορφίας της μεθοδολογίας και της συγκρισιμότητας των μικροβιακών δεδομένων. Η κοινή αυτή τεχνολογική βάση διευκόλυνε τη στατιστικά έγκυρη σύγκριση των αποτελεσμάτων από διάφορες έρευνες, ενισχύοντας την συνολική αξιοπιστία της μετα-αναλυτικής μεθόδου [10].

1.7 ICD-10

Η Διεθνής Στατιστική Ταξινόμηση Νοσημάτων και Συναφών Υγειονομικών Προβλημάτων, 10^η Αναθεώρηση (ICD- 10), αποτελεί ένα διεθνώς αποδεκτό σύστημα ταξινόμησης που έχει δημιουργηθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ). Το ICD-10 έχει ευρεία εφαρμογή στην κωδικοποίηση, καταγραφή και ανάλυση ασθενειών, διαγνώσεων και άλλων καταστάσεων που σχετίζονται με την υγεία, σε κλινικό και ερευνητικό επίπεδο. Η κύρια λειτουργία του είναι να προσφέρει ένα τυποποιημένο σύστημα αναφοράς που καθιστά δυνατή τη συγκρισιμότητα των δεδομένων υγείας ανάμεσα σε διαφορετικές χώρες, πληθυσμούς και χρονικές περιόδους .

Η οργανωτική δομή του ICD- 10 περιλαμβάνει 21 ομάδες παθήσεων, όπου οι διαγνώσεις κατατάσσονται σύμφωνα με αλφαριθμητικούς κωδικούς. Αυτή η οργανωμένη κατηγοριοποίηση διευκολύνει την επιδημιολογική μελέτη, τη στατιστική τεκμηρίωση και την ανάπτυξη δημόσιων υγειονομικών πολιτικών.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, το ICD- 10 εφαρμόστηκε για την ταξινόμηση και ομαδοποίηση των νοσημάτων που περιγράφονται στις μελέτες της μετα- ανάλυσης. Η εφαρμογή του συγκεκριμένου συστήματος θεωρήθηκε απαραίτητη για να εξασφαλιστεί η συνέπεια στην κατηγοριοποίηση των παθολογιών και η συγκρισιμότητα ανάμεσα στις διαφορετικές μελέτες που περιλήφθηκαν. Επιπλέον, η εφαρμογή ενός παγκοσμίως αναγνωρίσιμου και τυποποιημένου συστήματος, όπως το ICD-10, προσφέρει εγκυρότητα και αξιοπιστία στη διαδικασία επεξεργασίας και ανάλυσης των πληροφοριών.

Ειδικότερα, στις μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση εξετάστηκε το αυτιστικό φάσμα και συγκεκριμένα η αυτιστική διαταραχή, η οποία κατατάσσεται στον κωδικό F84.0 του ICD-10, ώστε να διασφαλιστεί η ομοιογένεια ως προς τα διαγνωστικά κριτήρια των παθήσεων που μελετώνται [11].

1.8 Σχετική Αφθονία (Relative Abundance)

Η σχετική αφθονία (relative abundance), στο πλαίσιο των μελετών μικροβιώματος, αναφέρεται στο ποσοστό ενός συγκεκριμένου ταξινομικού πληθυσμού (taxon) που καταγράφεται σε έναν πίνακα χαρακτηριστικών, σε σχέση με το άθροισμα όλων των πληθυσμών του δείγματος. Το μέτρο αυτό αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό των συνθετικών δεδομένων, στα οποία οι τιμές αναπαρίστανται ως αναλογίες ή πιθανότητες που αθροίζουν σε μια σταθερά.

Οι τεχνολογίες αλληλούχισης υψηλής απόδοσης (HTS), όπως η αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA, παράγουν δεδομένα που είναι εγγενώς συνθετικά, καθώς καταγράφουν περιορισμένο αριθμό αλληλουχιών (reads). Κατά συνέπεια, οι παρατηρούμενες μετρήσεις αντιπροσωπεύουν σχετική και όχι απόλυτη πληροφόρηση για τις ταξινομικές ομάδες σε ένα δείγμα.

Λόγω της φύσης των τεχνολογιών HTS, ο συνολικός αριθμός μετρήσεων αποτελεί ένα τυχαίο δείγμα που αντανακλά τη σχετική αφθονία των μορίων στο οικοσύστημα και δεν σχετίζεται άμεσα με τον απόλυτο αριθμό μορίων στο δείγμα εισόδου. Συχνά εφαρμόζονται μέθοδοι κανονικοποίησης για τη μετατροπή των δεδομένων σε σχετικές αφθονίες, όπου το άθροισμα των αφθονιών ισούται με την μονάδα. Ωστόσο, είναι ζωτικής σημασίας να ληφθούν υπόψη οι μεροληψίες που εισάγονται από τις διαφορές στα κλάσματα δειγματοληψίας μεταξύ των δειγμάτων κατά την ανάλυση της διαφορικής αφθονίας (DA).

Η έννοια της σχετικής αφθονίας και η ανάλυσή της χρησιμοποιείται σε όλη την έρευνα του μικροβιώματος για την κατανόηση των μικροβιακών συνθέσεων σε διάφορα οικοσυστήματα και των συσχετίσεών τους με διαφορετικές συνθήκες ή φαινοτύπους. Η σχετική αφθονία αποτελεί θεμελιώδες μέτρο κατά τον χαρακτηρισμό της σύνθεσης του ανθρώπινου μικροβιώματος στο πλαίσιο ασθενειών όπως η παχυσαρκία, οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου και ο HIV, καθώς συμβάλλει στον εντοπισμό μεταβολών στα μικροβιακά οικοσυστήματα υπό διαφορετικές συνθήκες [10].

1.9 Σημαντικά βακτηριακά φύλα του μικροβιώματος

Τα βακτηριακά φύλα αποτελούν τις ανώτερες ταξινομικές κατηγορίες των μικροοργανισμών που συνθέτουν το μικροβίωμα. Η σύνθεσή τους και η σχετική αφθονία τους έχει συνδεθεί με ποικίλες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Στην παρούσα εργασία εξετάζονται πέντε κυρίαρχα φύλα του ανθρώπινου μικροβιώματος, τα οποία έχειδειχθεί ότι σχετίζονται με τη μικροβιακή ισορροπία, τη φλεγμονώδη απόκριση και ενδεχομένως με νευροαναπτυξιακές διαταραχές όπως το αυτιστικό φάσμα [10].

1.9.1 *Bacteroidetes*

Το φύλο *Bacteroidetes* αποτελεί σημαντικό μέρος του ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος, βοηθώντας στην πέψη σύνθετων πολυσακχαριτών και στην παραγωγή βραχείας αλυσού λιπαρών οξέων, όπως το βουτυρικό οξύ, που είναι σημαντικά για την υγεία του εντέρου. Αυτά τα βακτήρια συμβάλλουν στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και παρέχουν προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς [12].

1.9.2 *Firmicutes*

Τα *Firmicutes* αποτελούν ένα από τα κυρίαρχα φύλα στο ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα, φημισμένα για την ικανότητά τους να ζυμώνουν σύνθετους υδατάνθρακες και να παράγουν λιπαρά οξέα βραχείας αλυσού, όπως το βουτυρικό, το οξικό και το προπιονικό οξύ. Αυτά τα SCFAs συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού, στη ρύθμιση των ανοσοποιητικών αντιδράσεων και στην υποστήριξη των μεταβολικών διαδικασιών [13].

1.9.3 *Actinobacteria*

Παρόλο που αποτελούν ένα μικρό ποσοστό του εντερικού μικροβιώματος, τα *Actinobacteria*, όπως τα *Bifidobacterium*, είναι κρίσιμα για τη διατήρηση της εντερικής ομοιόστασης. Συμβάλλουν στην πέψη των σακχάρων, στην παραγωγή βιταμινών και στην ενίσχυση της ανοσοποιητικής αντίδρασης. Η εμφάνισή τους σχετίζεται με την ευεξία του εντέρου και την αποτροπή φλεγμονωδών παθήσεων [7].

1.9.4 *Proteobacteria*

Τα *Proteobacteria* αποτελούν μια κατηγορία Gram-αρνητικών βακτηρίων που βρίσκονται σε περιορισμένες ποσότητες στο φυσιολογικό εντερικό μικροβίωμα. Παρόλα αυτά, η υπερβολική ανάπτυξή τους έχει συσχετιστεί με δυσβίωση και φλεγμονώδεις παθήσεις, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. Η αύξηση των *Proteobacteria* μπορεί να δείχνει ανισορροπία στο μικροβίωμα και συνδέεται με την ανάπτυξη διάφορων παθήσεων [14].

1.9.5 *Fusobacteria*

Τα *Fusobacteria* είναι αναερόβια, Gram-αρνητικά βακτήρια που εντοπίζονται κυρίως στη στοματική περιοχή. Ορισμένα βακτήρια, όπως το *Fusobacterium nucleatum*, σχετίζονται με περιοδοντικές παθήσεις και έχουν ανιχνευθεί σε καρκινικούς όγκους του παχέος εντέρου, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου. Η εμφάνισή τους σε υψηλά επίπεδα μπορεί να συσχετίζεται με φλεγμονώδεις και καρκινικές καταστάσεις [15].

1.10 Άλφα Ποικιλότητα (Alpha Diversity)

Η άλφα ποικιλομορφία αναφέρεται στην ποικιλομορφία εντός ενός δείγματος, εξετάζοντας την κατανομή των μικροοργανισμών, τόσο ως προς τον αριθμό διαφορετικών ειδών (πλούτος) όσο και ως προς το βαθμό ομοιομορφίας στην αφθονία τους (ομαλότητα). Αποτελεί έναν γενικό όρο που περιλαμβάνει τον πλούτο των ειδών, την ομαλότητα και την συνολική μικροβιακή ποικιλομορφία εντός ενός δείγματος.. Η μικροβιακή ποικιλομορφία είναι συχνά ευαίσθητη σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το τραύμα, η φαρμακευτική αγωγή, η υγιεινή και η διατροφή.

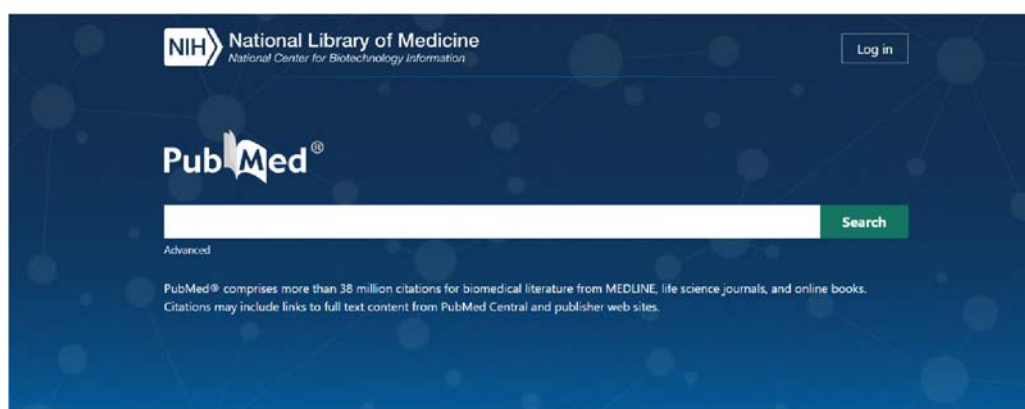
Οι βασικές μετρικές της άλφα ποικιλομορφίας περιλαμβάνουν τον πλούτο, τη φυλογενετική ποικιλομορφία, την εντροπία και την κυριαρχία. Ο πλούτος αναφέρεται στον αριθμό των διαφορετικών μικροοργανισμών σε ένα δείγμα, ενώ η ομαλότητα περιγράφει τον βαθμό ισοκατανομής της αφθονίας μεταξύ των ειδών. Υψηλός πλούτος σηματοδοτεί αυξημένο αριθμό ASVs (Amplicon Sequence Variants) ή φυλογενετικά

ανόμοιων ASVs. Αντίστοιχα, υψηλές τιμές ομαλότητας υποδηλώνουν πιο ισορροπημένη κατανομή μεταξύ των μικροοργανισμών.

Οι συνήθεις μετρικές πλούτου είναι οι Chao1, ACE, Observed OTUs/ASVs και Faith's PD. Ο δείκτης Shannon χρησιμοποιείται την ποσοτικοποίηση της εντροπίας, καθώς ενσωματώνει τόσο τον πλούτο όσο και την κυριαρχία σε μία συνολική τιμή [16].

1.11 Βάσεις δεδομένων

Η αναζήτηση των μελετών που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), η οποία αποτελεί μία από τις πιο αξιόπιστες και ευρέως χρησιμοποιούμενες βιβλιογραφικές βάσεις δεδομένων στον χώρο των βιοϊατρικών επιστημών (Εικόνα 4). Η PubMed αναπτύσσεται και διαχειρίζεται από το National Center for Biotechnology Information (NCBI) και περιλαμβάνει περισσότερες από 38 εκατομμύρια αναφορές σε επιστημονικά άρθρα από περιοδικά καταχωρημένα στο MEDLINE, καθώς και από επιλεγμένες πηγές επιστημονικής βιβλιογραφίας και ηλεκτρονικά βιβλία. Προσφέρει προηγμένες δυνατότητες αναζήτησης με τη χρήση λέξεων-κλειδιών, boolean τελεστών, καθώς και ιατρικών θεματικών όρων (MeSH), επιτρέποντας στο χρήστη να εντοπίσει σχετική, έγκυρη και τεκμηριωμένη βιβλιογραφία [17].



Εικόνα 4 PubMed: Βάση Δεδομένων

1.12 Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση της ενδεχόμενης συσχέτισης μεταξύ του περιοδοντικού μικροβιώματος και του αυτιστικού φάσματος διαταραχών (ASD) μέσω μετα-ανάλυσης δημοσιευμένων μελετών. Η εργασία εστιάζει στην ποσοτική σύνθεση των διαθέσιμων επιστημονικών δεδομένων που συγκρίνουν τη σύσταση του περιοδοντικού μικροβιώματος μεταξύ ατόμων με αυτισμό και ομάδων ελέγχου.

Η μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε με στόχο την εκτίμηση της συνολικής επίδρασης (effect size), τον υπολογισμό της ετερογένειας μεταξύ των μελετών, καθώς και την ανάδειξη συγκεκριμένων ομάδων βακτηρίων που ενδέχεται να διαφοροποιούνται συστηματικά στους αυτιστικούς πληθυσμούς. Μέσω αυτής της ανάλυσης επιχειρείται να ενισχυθεί η κατανόηση του δυναμικού ρόλου του στοματικού μικροβιώματος στη βιολογία του αυτισμού.

Τα ευρήματα της μελέτης δύνανται να συμβάλουν στην ανάδειξη πιθανών μικροβιακών δεικτών για διαγνωστικούς ή προγνωστικούς σκοπούς, καθώς και να θέσουν τη βάση για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τον άξονα στόμα-έντερο-εγκέφαλος και την επίδραση της μικροβιακής δυσβίωσης σε νευροαναπτυξιακές διαταραχές.

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων

2.1.1 Στρατηγική αναζήτησης

Η αναζήτηση των μελετών που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση αποτέλεσε μία οργανωμένη και διεξοδική διαδικασία συγκέντρωσης και αξιολόγησης δεδομένων από προϋπάρχουσες μελέτες που σχετίζονται με το υπό διερεύνηση ζήτημα. Η διαδικασία αυτή συνέβαλε στη διατύπωση μιας σαφώς καθορισμένης ερευνητικής ερώτησης, προσανατολισμένης στο αντικείμενο της εργασίας, η οποία αποτέλεσε τη βάση για την υλοποίηση της μετα-ανάλυσης. Ακολουθήθηκε δομημένη στρατηγική αναζήτησης και επιλογής μελετών, με σκοπό τη διασφάλιση της σχετικότητας και της επιστημονικής εγκυρότητας των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν.

Η προσέγγιση αυτή αξιοποιήθηκε στην παρούσα εργασία με σκοπό να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση του περιοδοντικού μικροβιώματος με νευρολογικές ή ψυχικές διαταραχές. Η αναζήτηση περιορίστηκε στη βάση δεδομένων PubMed, ακολουθώντας μία προκαθορισμένη στρατηγική με χρήση κατάλληλων λέξεων-κλειδίων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι όροι: “periodontitis AND microbiome AND (AUTISM OR ANXIETY OR stress or DEPRESSION OR NEUROLOGICAL)”, ενώ στη συνέχεια η αναζήτηση επεκτάθηκε με την χρήση των όρων: “(mental health disorders OR neuropsychiatric) AND (oral OR dental OR saliva) AND (microbiome OR microbiota)”.

2.1.2 Αυτοματοποιημένος έλεγχος και επιλογή

Για να διευκολυνθεί η διαδικασία επιλογής των άρθρων, δημιουργήθηκε ένα απλό πρόγραμμα text mining σε Python, το οποίο ανίχνευε και επισήμαινε αυτόματα όρους-στόχους στα abstracts των δημοσιεύσεων, όπως “16S”, “NGS”, “shotgun”, “sequencing” και “review”. Το εργαλείο περιλάμβανε λογική αναγνώρισης μεταβλητών (π.χ. “16s”, “16S”) και εξήγαγε το σχολιασμένο κείμενο σε διαφορετικό αρχείο για ευκολότερη αξιολόγηση. Παράδειγμα της αυτόματης επισήμανσης όρων-

στόχων παρουσιάζεται στην *Εικόνα 5*. Τα αποτελέσματα της αυτόματης σήμανσης επαληθεύτηκαν μέσω κλασικού τύπου μεθοδολογίας, δηλαδή με χειροκίνητη ανάγνωση και αξιολόγηση των περιλήψεων, ώστε να διασφαλιστεί η εγκυρότητα και η πληρότητα της επιλογής των μελετών.

Αξιοποιήθηκαν οι βιβλιοθήκες python-docx και nltk (Natural Language Toolkit), οι οποίες είναι θεμελιώδεις στην επεξεργασία εγγράφων και φυσικής γλώσσας αντίστοιχα. Η βιβλιοθήκη python-docx προσέφερε τη δυνατότητα ανάγνωσης, τροποποίησης και μορφοποίησης εγγράφων Word, όπως η δυνατότητα υπογράμμισης, έντονης γραφής και χρωματισμού των λέξεων-στόχων [18].

Η βιβλιοθήκη nltk, ένα από τα πιο διαδεδομένα εργαλεία στην επεξεργασία φυσικής γλώσσας (Natural Language Processing - NLP), αξιοποιήθηκε για την εφαρμογή της τεχνικής tokenization. Η διαδικασία tokenization περιλαμβάνει την κατανομή του κειμένου σε θεμελιώδεις μονάδες, συνήθως λέξεις ή σημεία στίξης (tokens), διευκολύνοντας την ακριβή ανίχνευση λέξεων-κλειδιών μέσα σε κάθε παράγραφο

Για την επιλογή των μελετών, καθορίστηκαν συγκεκριμένα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού. Συγκεκριμένα, περιλήφθηκαν μόνο άρθρα που έκαναν χρήση της τεχνικής 16S rRNA gene sequencing μέσω τεχνολογίας Next Generation Sequencing (NGS), ενώ εξαιρέθηκαν δημοσιεύσεις που βασίζονταν σε άλλες μεθόδους αλληλούχισης (όπως shotgun metagenomics) ή αφορούσαν δευτερογενή βιβλιογραφία (όπως ανασκοπήσεις). Μετά την σήμανση ακολούθησε χειροκίνητος έλεγχος του πλήρους κειμένου για την επιβεβαίωση της καταλληλότητας του σύμφωνα με τα προαναφερθέντα κριτήρια, καθώς και την ύπαρξη απαιτούμενων δεδομένων για τη μετανάλυση.

Παρόλο που η αρχική αναζήτηση κάλυπτε ένα ευρύτερο φάσμα νευροψυχιατρικών διαταραχών, όπως το άγχος, τη κατάθλιψη και το στρες, κατά την αξιολόγηση των μελετών διαπιστώθηκε ότι τα διαθέσιμα και επαρκώς ποσοτικοποιημένα δεδομένα σχετίζονταν κυρίως με τον αυτισμό (ASD). Γι' αυτό τον λόγο, το τελικό ερευνητικό αποτέλεσμα της μετανάλυσης επικεντρώθηκε αποκλειστικά στη σύνδεση του περιοδοντικού μικροβιώματος με το αυτιστικό φάσμα.

OBJECTIVES : The use of probiotics could promote the balance of the subgingival microbiota to contribute to periodontal health . This study aimed to identify the potential of bacteria commonly associated with healthy periodontal tissues as probiotic candidates .

MATERIAL AND METHODS : A systematic **review** was conducted according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses guidelines using the PubMed , Scopus , Science Direct , ProQuest , and Ovid databases as well as the combination of Medical Subject Headings (MeSH) and non-MeSH terms .

Based on the selection criteria , original studies published in English and identifying the microorganisms present in the periodontium of healthy individuals and patients with periodontitis using the high-throughput **16S** ribosomal gene **sequencing** technique were included .

RESULTS : Out of 659 articles , 12 met the criteria for this **review** . These articles were published from 2012 to 2020 and mainly originated from the United States , China , and Spain . Most of these studies reported adequate criteria for selecting participants , using standardized clinical criteria , and compliance

Εικόνα 5 Παράδειγμα αυτόματης σήμανσης λέξεων-στόχων στα abstracts των μελετών με χρήση εργαλείου text mining σε Python. Ο σχετικός κώδικας παρουσιάζεται στο Παράρτημα Α.

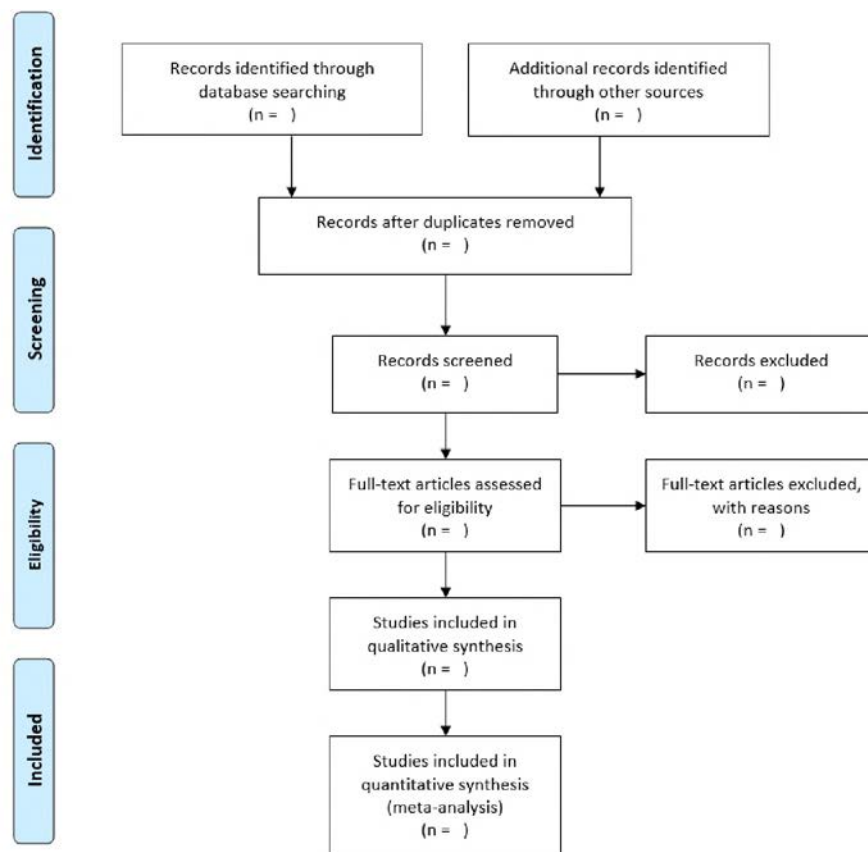
2.2 Οργάνωση και τεκμηρίωση δεδομένων

Τα δεδομένα από τις μελέτες που πληρούσαν τα προκαθορισμένα κριτήρια ένταξης καταγράφηκαν και οργανώθηκαν σε φύλλο εργασίας Excel. Για κάθε μελέτη καταχωρήθηκαν πληροφορίες όπως το PubMed ID, το όνομα του πρώτου συγγραφέα, το έτος δημοσίευσης, η χώρα προέλευσης, ο τύπος δείγματος (π.χ. σάλιο, οδοντική πλάκα) και η κατηγορία συμμετεχόντων (ASD ή νευροτυπικοί). Παράλληλα, στο ίδιο έγγραφο καταγράφηκαν τα απαραίτητα στατιστικά στοιχεία για την εκτέλεση της μετανάλυσης, όπως η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση και το τυπικό σφάλμα ανά ομάδα, για τους δείκτες Shannon και Shannon Evenness, καθώς και οι τιμές αφθονίας των κύριων βακτηριακών φύλων. Σε περιπτώσεις όπου μία μελέτη παρείχε διακριτά αποτελέσματα για διαφορετικούς τύπους βιολογικών δειγμάτων (όπως σάλιο και οδοντική πλάκα στη μελέτη Qiao et al., 2018), κάθε δείγμα αντιμετωπίστηκε ως ξεχωριστή μονάδα ανάλυσης στη μετα-ανάλυση, προκειμένου να αξιοποιηθούν πλήρως τα διαθέσιμα δεδομένα.

Η διαδικασία επιλογής και τεκμηρίωσης των μελετών παρουσιάζεται μέσω διαγράμματος ροής PRISMA- 2009, το οποίο απεικονίζει την πορεία από την αρχική αναζήτηση μέχρι την τελική ένταξη των μελετών (Εικόνα 6). Το διάγραμμα καταγράφει τον αριθμό των αρχικά εντοπισμένων εγγραφών, την αποβολή διπλότυπων, τη

διαδικασία ελέγχου τίτλων και περιλήψεων, καθώς και τον τελικό αριθμό μελετών που συμπεριλήφθηκαν, σύμφωνα με τα προκαθορισμένα κριτήρια.

Η οργανωμένη αυτή καταγραφή επέτρεψε την ομοιογενή επεξεργασία των στοιχείων και την στατιστική τους ανάλυση με τη βοήθεια του λογισμικού Stata.



Εικόνα 6 Prisma- 2009 διάγραμμα ροής για την επιλογή μελετών για μετανάλυση

Για τη διασφάλιση της εγκυρότητας και της ομοιογένειας των δεδομένων, εφαρμόστηκαν συγκεκριμένα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού για την επιλογή των μελετών που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση:

Κριτήρια ένταξης των μελετών:

- Άτομα με διάγνωση αυτιστικού φάσματος (ASD) σύμφωνα με το ICD-10: F84.0
- Ανάλυση βασισμένη σε ανθρώπινα δείγματα (Homo sapiens)
- Προσδιορισμός του μικροβιώματος με τεχνική 16S rRNA sequencing
- Παρουσία δεδομένων τόσο από άτομα με ASD όσο και από ομάδα ελέγχου (νευροτυπικοί)
- Παροχή στατιστικών δεικτών (μέση τιμή, τυπική απόκλιση, τυπικό σφάλμα).

2.3 Μέγεθος Επίδρασης (Effect Size)

Το effect size (ES) αντικατοπτρίζει τον βαθμό εκδήλωσης ενός φαινομένου σε έναν πληθυσμό ή, ισοδύναμα, το πόσο απέχει η πραγματικότητα από την μηδενική υπόθεση. Όταν η μηδενική υπόθεση είναι αληθής, το effect size ισούται με μηδέν. Όταν είναι ψευδής, το ES αποκτά μη μηδενική τιμή, και όσο μεγαλύτερη είναι αυτή, τόσο πιο έντονα εμφανίζεται το υπό εξέταση φαινόμενο. Το effect size αποτελεί ουσιαστική παράμετρο της στατιστικής ανάλυσης, καθώς επιτρέπει την αποτίμηση της πρακτικής σημαντικότητας ενός αποτελέσματος, ανεξάρτητα από το μέγεθος του δείγματος.

Το μέγεθος της επίδρασης μπορεί να εκφραστεί σε διαφορετικές μονάδες, όπως ποσοστιαία απόκλιση, μονάδες IQ, ή συσχέτιση τύπου Pearson's r . Προκειμένου να επιτευχθεί συγκρισιμότητα μεταξύ ποικίλων ερευνών και πεδίων, έχουν προταθεί γενικευμένοι δείκτες effect size, όπως ο τυποποιημένος δείκτης διαφοράς μέσων όρων (standardized mean difference - SMD), ο οποίος προκύπτει από τη διαίρεση της διαφοράς μέσων όρων με την κοινή τυπική απόκλιση των πληθυσμών.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι effect size, ανάλογα με τα δεδομένα και τον τύπο της στατιστικής ανάλυσης:

- Cohen's d: αξιολογεί τη διαφορά μεταξύ δύο μέσων όρων σε μονάδες τυπικής απόκλισης.
- Pearson's r: αποτυπώνει τη γραμμική συσχέτιση ανάμεσα σε δύο συνεχείς μεταβλητές, με εύρος από -1 έως +1.
- Odds Ratio (OR) και Risk Ratio (RR): χρησιμοποιούνται σε μελέτες που εκτιμούν την επίδραση ενός παράγοντα στην πιθανότητα εμφάνισης ενός συμβάντος, και είναι συχνά παρόντα σε επιδημιολογικές και κλινικές αναλύσεις.

Στο πλαίσιο της παρούσας μετα-ανάλυσης, το effect size υπήρξε ο κύριος στατιστικός δείκτης για την εκτίμηση της διαφοράς ανάμεσα στις ομάδες (άτομα με αυτισμό σε σύγκριση με νευροτυπικά). Ο υπολογισμός των effect size σε κάθε μελέτη, σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης (95% CI), κατέστησε δυνατή την ποσοτική σύνθεση των αποτελεσμάτων και τη δημιουργία ενός συνολικού μεγέθους επίδρασης, εξετάζοντας τη διασπορά των τιμών μεταξύ των μελετών (ετερογένεια) και το στατιστικό τους βάρος [19].

2.4 Διάστημα Εμπιστοσύνης (Confidence Interval)

Διάστημα εμπιστοσύνης στη στατιστική είναι ένα εύρος τιμών που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση μιας άγνωστης παραμέτρου ενός πληθυσμού. Καθορίζεται από ένα επίπεδο εμπιστοσύνης (συνήθως 95%), το οποίο εκφράζει τον βαθμό αβεβαιότητας της εκτίμησης. Το ποσοστό αυτό αναφέρεται στην αναλογία των διαστημάτων εμπιστοσύνης που θα περιείχαν την πραγματική τιμή της παραμέτρου του πληθυσμού, εάν η διαδικασία εκτίμησης επαναλαμβανόταν σε πολυάριθμα δείγματα [20].

Ένα διάστημα εμπιστοσύνης περιλαμβάνει ένα άνω και ένα κάτω όριο, τα οποία προσδιορίζουν το εύρος εντός του οποίου αναμένεται να εμπίπτει η εκτίμηση κατά την επαναληπτική δειγματοληψία. Τα όρια αυτά υπολογίζονται σύμφωνα με τη στατιστική του δείγματος, η οποία τροποποιείται κατάλληλα προκειμένου να ενσωματώνει την αβεβαιότητα της εκτίμησης. Το άνω όριο προκύπτει με την πρόσθεση του περιθωρίου σφάλματος (margin of error) στη στατιστική του δείγματος, ενώ το κάτω όριο με την

αφαίρεση του περιθωρίου σφάλματος. Ο μαθηματικός τύπος του διαστήματος εμπιστοσύνης έχει την εξής μορφή:

$$\text{εκτιμώμενη τιμή} \pm \text{περιθώριο σφάλματος}$$

Το περιθώριο σφάλματος υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας το τυπικό σφάλμα (standard error, SE) της εκτίμησης με τον συντελεστή εμπιστοσύνης (M) που αντιστοιχεί στο επιλεγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης [41]. Κατ' επέκταση, το διάστημα εμπιστοσύνης διατυπώνεται ως εξής:

$$\text{εκτιμώμενη τιμή} \pm M \times SE$$

2.5 Τυπική Απόκλιση (Standard Deviation)

Στην παρούσα μετα-ανάλυση, η τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) αξιοποιείται ως δείκτης μεταβλητότητας των αποτελεσμάτων ανάμεσα στις επιμέρους μελέτες που διερευνούν τη σύνδεση του περιοδοντικού μικροβιώματος με τις διαταραχές του αυτιστικού φάσματος (ASD). Ειδικότερα, η SD χρησιμοποιείται:

- για να περιγράψει τη διασπορά των τιμών μέσα σε κάθε μελέτη (π.χ. συγκέντρωση βακτηρίων)
- για τον υπολογισμό του σταθμισμένου μέσου όρου και της ετερογένειας ανάμεσα στις μελέτες (μέσω του δείκτη I^2)

Η τυπική απόκλιση ενός δείγματος υπολογίζεται από τον τύπο:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2}$$

Όπου:

- x_i : η τιμή κάθε παρατήρησης
- $\bar{x}$: ο μέσος όρος των παρατηρήσεων
- n : το μέγεθος του δείγματος

Οι τυπικές αποκλίσεις που προκύπτουν από τις επιμέρους μελέτες χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της σταθμισμένης μέσης διαφοράς (Weighted Mean Difference) και του σφάλματος των εκτιμήσεων, ώστε να προσδιοριστεί η συνολική επίδραση και η συνέπεια των αποτελεσμάτων. Η παρουσία σημαντικής ετερογένειας, σε συνδυασμό με τις τιμές της τυπικής απόκλισης, αξιολογήθηκε με τους δείκτες Cochran's Q και I^2 όπως προτείνεται από τον Higgins et al. (2003) [8][21].

2.6 Τυπικό Σφάλμα (Standard Error)

Το Τυπικό Σφάλμα (Standard Error) αποτελεί μέτρο της αβεβαιότητας γύρω από την εκτίμηση ενός στατιστικού μεγέθους, όπως ο μέσος όρος, ή η σταθμισμένη μέση διαφορά. Αντιπροσωπεύει τη μεταβλητότητα της τιμής το δείγματος σε σχέση με την πραγματική τιμή στον πληθυσμό, εφόσον η δειγματοληψία επαναλαμβανόταν πολλές φορές.

Ο πιο συνηθισμένος τύπος για το Τυπικό Σφάλμα του Μέσου Όρου είναι:

$$SE = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Όπου:

s: η τυπική απόκλιση του δείγματος

n: το μέγεθος του δείγματος

Στο πλαίσιο της παρούσας μετα-ανάλυσης, το standard error χρησιμοποιήθηκε:

- για τον υπολογισμό των σταθμισμένων μέσων διαφορών
- για τη στατιστική στάθμιση κάθε μελέτης στο συνολικό μοντέλο,
- για τον υπολογισμό των διαστημάτων εμπιστοσύνης (Confidence Intervals) των εκτιμήσεων [8][21]

2.7 Stata

Το Stata αποτελεί ένα ευρέως αναγνωρισμένο πρόγραμμα για στατιστική ανάλυση, διαχείριση δεδομένων και δημιουργία γραφημάτων, το οποίο αναπτύσσεται και διανέμεται από την εταιρεία StataCorp. Αποτελεί ένα καθιερωμένο εργαλείο στη βιοστατιστική, την επιδημιολογία, την κοινωνική έρευνα και τις οικονομικές επιστήμες, λόγω της ευχρηστίας του, της ακρίβειας των αποτελεσμάτων και της δυνατότητας αυτοματοποίησης των αναλύσεων μέσω εντολών. Το Stata υποστηρίζει πληθώρα στατιστικών μεθόδων, όπως παλινδρόμηση, ανάλυση διακύμανσης, ανάλυση επιβίωσης, μοντέλα χρονοσειρών και panel data.

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε η έκδοση 13.0 του Stata για τη διεξαγωγή μετα-ανάλυσης, χρησιμοποιώντας εντολές όπως η `metan`, οι οποίες επιτρέπουν τον υπολογισμό συνολικών εκτιμήσεων, γραφημάτων (forest plots), καθώς και την εκτίμηση της ετερογένειας μεταξύ των μελετών (π.χ. μέσω του στατιστικού I^2). Η αξιοποίηση του Stata βοήθησε στην ακριβή επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων, διευκολύνοντας την αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων και την δημιουργία καθαρών γραφημάτων [22].

2.7.1 Η εντολή `metan`

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, η μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της εντολής “**metan**”, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτέλεση τόσο μοντέλων σταθερών επιδράσεων όσο και τυχαίων επιδράσεων.

Η εντολή `metan` ακολουθεί μια διαδικασία δύο σταδίων:

1. Υπολογισμός συνοπτικής στατιστικής (όπως διαφορά μέσων όρων ή λόγος πιθανοτήτων) για κάθε επιμέρους μελέτη.
2. Συνδυασμός των στατιστικών αυτών μέσω σταθμισμένου μέσου όρου, ώστε να προκύψει η συνολική επίδραση.

Η γενική σύνταξη της εντολής είναι η εξής:

metan varlist [if] [in] [, precalculated effect estimates options]

Η παράμετρος varlist περιλαμβάνει τις απαραίτητες μεταβλητές, ανάλογα με τη μορφή των δεδομένων:

- Για συνεχή δεδομένα, περιλαμβάνονται το μέγεθος δείγματος, ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση ανά ομάδα (n0 mean0 sd0 n1 mean1 sd1)
- Για δυαδικά δεδομένα, περιλαμβάνονται αριθμοί γεγονότων και μεγέθη δείγματος (r0 n0 r1 n1)
- Για προϋπολογισμένες εκτιμήσεις, δίνονται απευθείας η τιμή επίδρασης και το τυπικό σφάλμα της.

Για την εκτίμηση της συνολικής επίδρασης χρησιμοποιήθηκε μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (random-effects model), το οποίο λαμβάνει υπόψη την ετερογένεια μεταξύ των μελετών και θεωρεί ότι η πραγματική επίδραση ενδέχεται να διαφέρει από μελέτη σε μελέτη.

Η επιλογή του συγκεκριμένου μοντέλου βασίστηκε στην παρατηρούμενη ετερογένεια των δεδομένων, τόσο σε επίπεδο πληθυσμών όσο και σε επίπεδο μεθοδολογικών διαφορών. Η ετερογένεια αξιολογήθηκε με χρήση του στατιστικού Q του Cochran και του δείκτη I^2 .

Ανάλογα με τον τύπο των μεταβλητών, εφαρμόστηκαν διαφορετικές προσεγγίσεις για την εκτίμηση του μεγέθους επίδρασης: για τις συνεχείς μεταβλητές, όπως οι δείκτες άλφα ποικιλότητας, χρησιμοποιήθηκαν τυποποιημένες μέσες διαφορές (standardized mean differences), ενώ για μεταβλητές όπως η σχετική αφθονία (relative abundance) χρησιμοποιήθηκαν απόλυτες μέσες διαφορές (mean differences), διατηρώντας τη μονάδα μέτρησης. Επιπρόσθετα, η τελική εκτίμηση της επίδρασης συνοδεύτηκε από 95% διαστήματα εμπιστοσύνης, ενώ τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και γραφικά μέσω forest plots, που απεικονίζουν την επίδραση κάθε μελέτης και τη συνολική συνδυασμένη εκτίμηση [22].

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

3.1 Στρατηγική Αναζήτησης

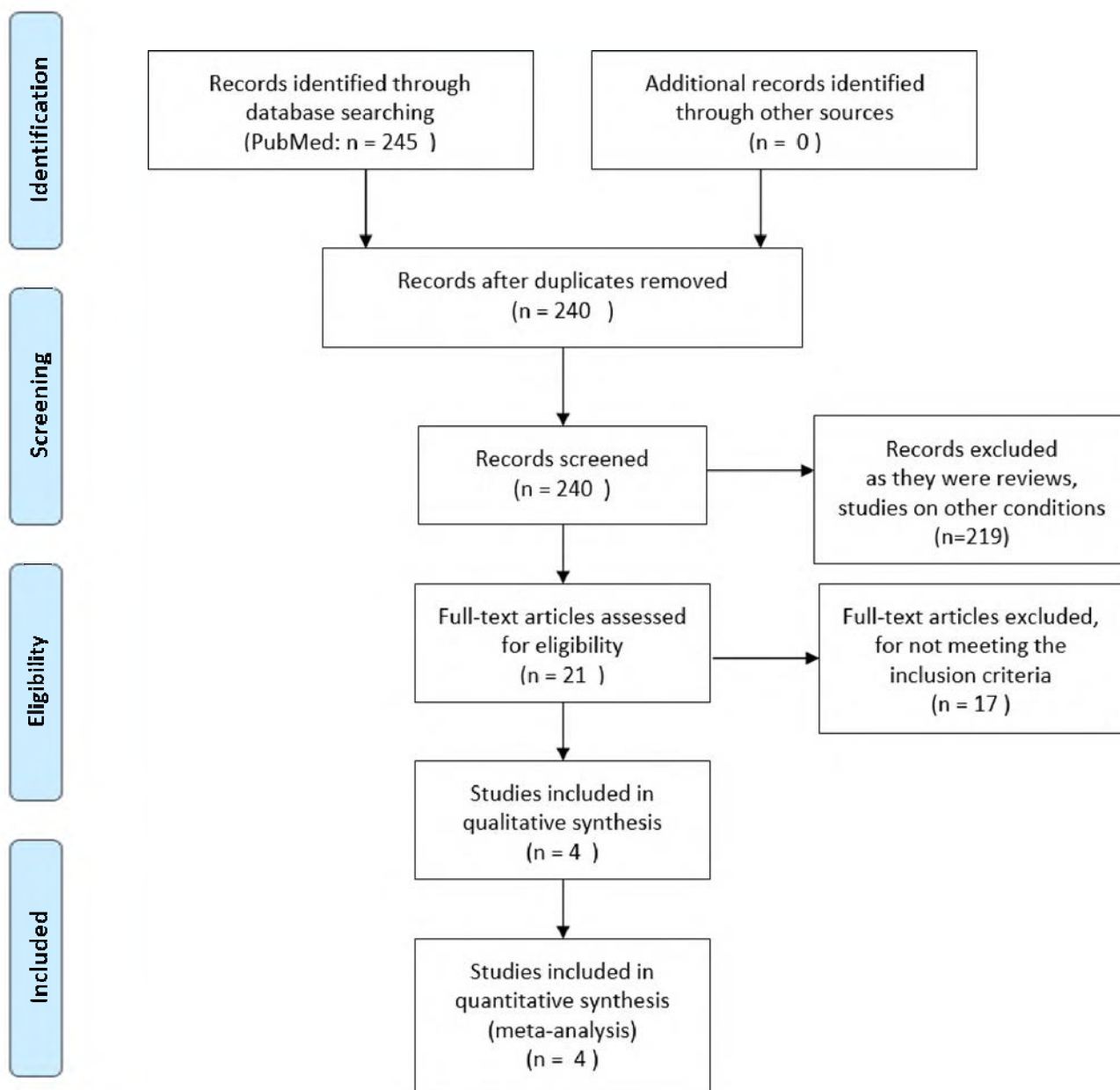
Για τη συλλογή των απαιτούμενων βιβλιογραφικών πηγών και την εκτέλεση της μετα-ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκε προκαθορισμένη στρατηγική αναζήτησης στη διεθνή βάση δεδομένων PubMed. Η αρχική φάση της αναζήτησης εκτελέστηκε στις 4 Ιανουαρίου 2025, αξιοποιώντας τις λέξεις- κλειδιά:

periodontitis AND microbiome AND (AUTISM OR ANXIETY OR stress or DEPRESSION OR NEUROLOGICAL)

Στο δεύτερο στάδιο, στις 31 Μαρτίου 2025, διεξήχθη συμπληρωματική αναζήτηση με τους όρους:

(mental health disorders OR neuropsychiatric) AND (oral OR dental OR saliva) AND (microbiome OR microbiota)

Η δεύτερη αναζήτηση παρείχε 64 επιπλέον αποτελέσματα. Αφού αφαιρέθηκαν 5 διπλότυπες εγγραφές, ο τελικός αριθμός των μοναδικών μελετών που θα εξεταστούν, ανήλθε σε 240. Η συνολική διαδικασία εντοπισμού, επιλογής και ένταξης των μελετών απεικονίζεται στο διάγραμμα ροής PRISMA 2009 (Εικόνα 7).



Εικόνα 6 Prisma- 2009 διάγραμμα ροής για την επιλογή μελετών για μετανάλυση

3.2 Μετα-ανάλυση δεδομένων Άλφα Ποικιλότητας

Η α-ποικιλότητα (alpha diversity) αναφέρεται στην ποικιλότητα ειδών εντός ενός συγκεκριμένου δείγματος ή οικοσυστήματος και μπορεί να εκφραστεί είτε ως το πλήθος των ειδών (species richness), είτε μέσω σύνθετων δεικτών που συνυπολογίζουν τόσο τον αριθμό όσο και την κατανομή των ειδών. Οι δείκτες αυτοί επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση της μικροβιακής ποικιλομορφίας και αποτελούν βασικό εργαλείο για τη μελέτη της δομής των μικροβιακών κοινοτήτων [16].

Ο δείκτης Shannon (H') αποτελεί έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη για την εκτίμηση της βιοποικιλότητας, καθώς συνυπολογίζει τόσο τον αριθμό των ειδών όσο και την ισοκατανομή των ατόμων μεταξύ αυτών. Ο τύπος υπολογισμού του είναι:

$$\text{Shannon Index } (H') = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

όπου p_i είναι η σχετική αφθονία του είδους i και S ο συνολικός αριθμός των ειδών [16].

Συμπληρωματικά, ο δείκτης ομοιομορφίας Shannon (Shannon Evenness, E) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του βαθμού ισοκατανομής των ατόμων μεταξύ των ειδών σε ένα δείγμα [20]. Υπολογίζεται ως το πηλίκο του δείκτη ποικιλότητας Shannon (H') προς το λογάριθμο του συνολικού αριθμού των ειδών (S), δηλαδή:

$$E = \frac{H'}{\ln(S)}$$

Ο δείκτης αυτός κυμαίνεται από 0 (απόλυτη κυριαρχία ενός είδους) έως 1 (τέλεια ισοκατανομή) και προτάθηκε από τον Pielou (1966), ως μέσο συγκριτικής αξιολόγησης της κατανομής της αφθονίας μεταξύ των ειδών.

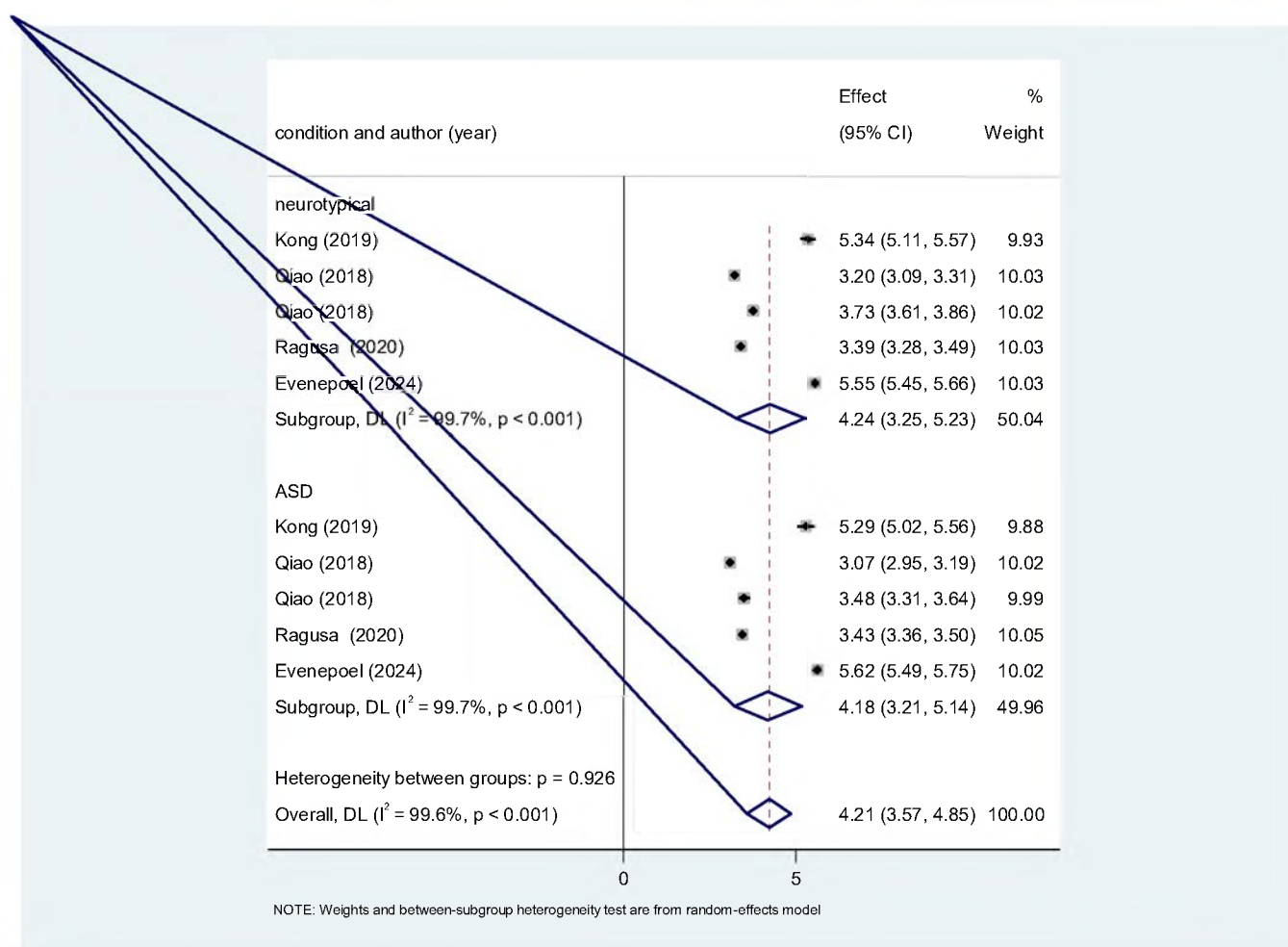
Ο Πίνακας 1 περιλαμβάνει συνοπτικά τα δημογραφικά και στατιστικά στοιχεία που συλλέχθηκαν από τρεις δημοσιευμένες μελέτες, οι οποίες αξιολόγησαν την ποικιλομορφία του περιοδοντικού μικροβιώματος σε άτομα με αυτισμό (ASD) και νευροτυπικά άτομα. Η μελέτη του Qiao (2018) περιλάμβανε δύο ξεχωριστά είδη δειγμάτων (σάλιο και οδοντική πλάκα) και παρουσιάζεται διακριτά για καθένα από αυτά. Παρουσιάζονται τα μέσα επίπεδα και η διασπορά των δεικτών Shannon και Shannon Evenness, ανά τύπο δείγματος και ομάδα συμμετεχόντων, όπως χρησιμοποιήθηκαν στη μετα-ανάλυση

PMID	Author	Year	Country	Organism	Disease	ICD10	Age	Sample	Index	Condition	Sample (n)	Mean (x)	SD	SE
31489949	Kong	2019	USA	human	ASD	F84.0	ASD: 15 Ctr: 29	saliva	shannon	Neurotypical	19	5.34	0.52	0.119
										ASD	20	5.29	0.62	0.139
29371629	Qiao	2018	China	human	ASD	F84.0	7–14 y	saliva	shannon	Neurotypical	27	3.202	0.287	0.055
										ASD	32	3.073	0.346	0.061
29371629	Qiao	2018	China	human	ASD	F84.0	7–14 y	dental samples	shannon	Neurotypical	26	3.735	0.326	0.064
										ASD	26	3.478	0.435	0.085
32867322	Ragusa	2020	Italy	human	ASD	F84.0	4–8 y	saliva	shannon	Neurotypical	27	3.386	0.28	0.054
										ASD	53	3.429	0.255	0.035
38882715	Evenepoel	2024	Belgium	human	ASD	F84.0	8–12 y	saliva	shannon	Neurotypical	40	5.552	0.339	0.054
										ASD	80	5.62	7.534	0.842
29371629	Qiao	2018	China	human	ASD	F84.0	7–14 y	saliva	Shannon Evenness	Neurotypical	27	0.6	0.041	0.008
										ASD	32	0.577	0.053	0.009
29371629	Qiao	2018	China	human	ASD	F84.0	7–14 y	dental samples	Shannon Evenness	Neurotypical	26	0.706	0.053	0.01
										ASD	26	0.668	0.074	0.015
32867322	Ragusa	2020	Italy	human	ASD	F84.0	4–8 y	saliva	Shannon Evenness	Neurotypical	27	0.617	0.046	0.009
										ASD	53	0.621	0.045	0.01

Πίνακας 2 Πίνακας δεδομένων για τους δείκτες Shannnon και Shannon Evenness από τέσσερις μελέτες σε άτομα με αυτισμό (ASD) και νευροτυπικά.

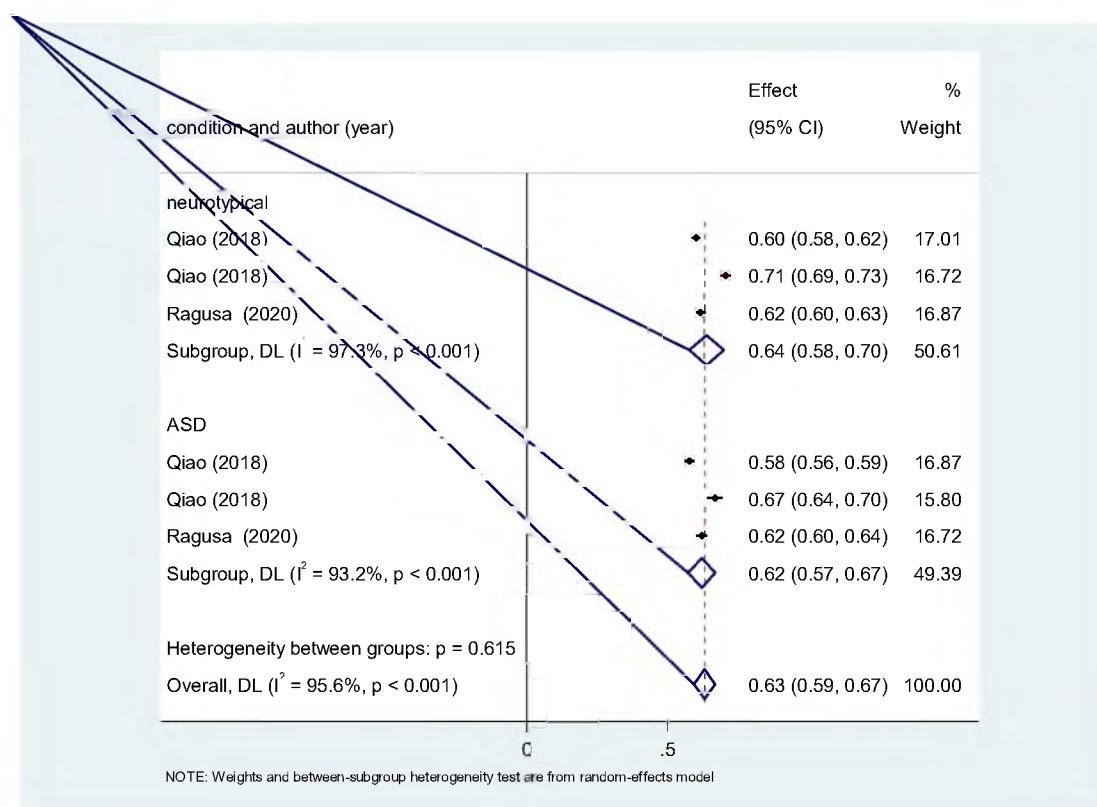
3.2.1 Ανάλυση διαστρωμάτωσης των δεικτών άλφα ποικιλότητας

Στο διάγραμμα μετανάλυσης (Εικόνα 8) παρουσιάζονται οι τιμές του δείκτη ποικιλότητας Shannon (H') από τέσσερις μελέτες που αφορούν νευροτυπικά άτομα (neurotypical) και άτομα με διαταραχή αυτιστικού φάσματος (ASD). Η εκτιμώμενη μέση τιμή για την νευροτυπική ομάδα ήταν (4.24)(95% CI: 3.25-5.23), ενώ για την ομάδα ASD ήταν (4.18)(95% CI: 3.21-5.14). Η συνολική επίδραση που προέκυψε από όλες τις μελέτες ήταν (4.21)(95% CI: 3.57-4.85). Παρότι η ετερογένεια ήταν υψηλή και για τις δύο υποομάδες ($I^2 = 99.7\%$ και για τις δύο ομάδες), η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.926$).



Εικόνα 8 Forest Plot μετανάλυσης των τιμών του δείκτη Shannon (H') σε νευροτυπικά άτομα και σε άτομα με διαταραχή αυτιστικού φάσματος (ASD). Οι ράβδοι απεικονίζουν τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης.

Στο διάγραμμα μετανάλυσης (Εικόνα 9) παρουσιάζονται οι τιμές του δείκτη Shannon Evenness από δύο μελέτες που αφορούν νευροτυπικά άτομα (neurotypical) και άτομα με διαταραχή αυτιστικού φάσματος (ASD). Η μέση τιμή για την νευροτυπική ομάδα ήταν (0.64)(95% CI: 0.58-0.62), ενώ για την ομάδα ASD ήταν (0.62) (95% CI: 0.57-0.67). Η συνολική επίδραση που προέκυψε από όλες τις μελέτες ήταν (0.63)(95% CI: 0.59-0.67). Παρότι η ετερογένεια ήταν υψηλή και για τις δύο υποομάδες ($I^2 = 97.3\%$ για τη νευροτυπική και $I^2 = 93.2\%$ για την ASD), η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.615$).

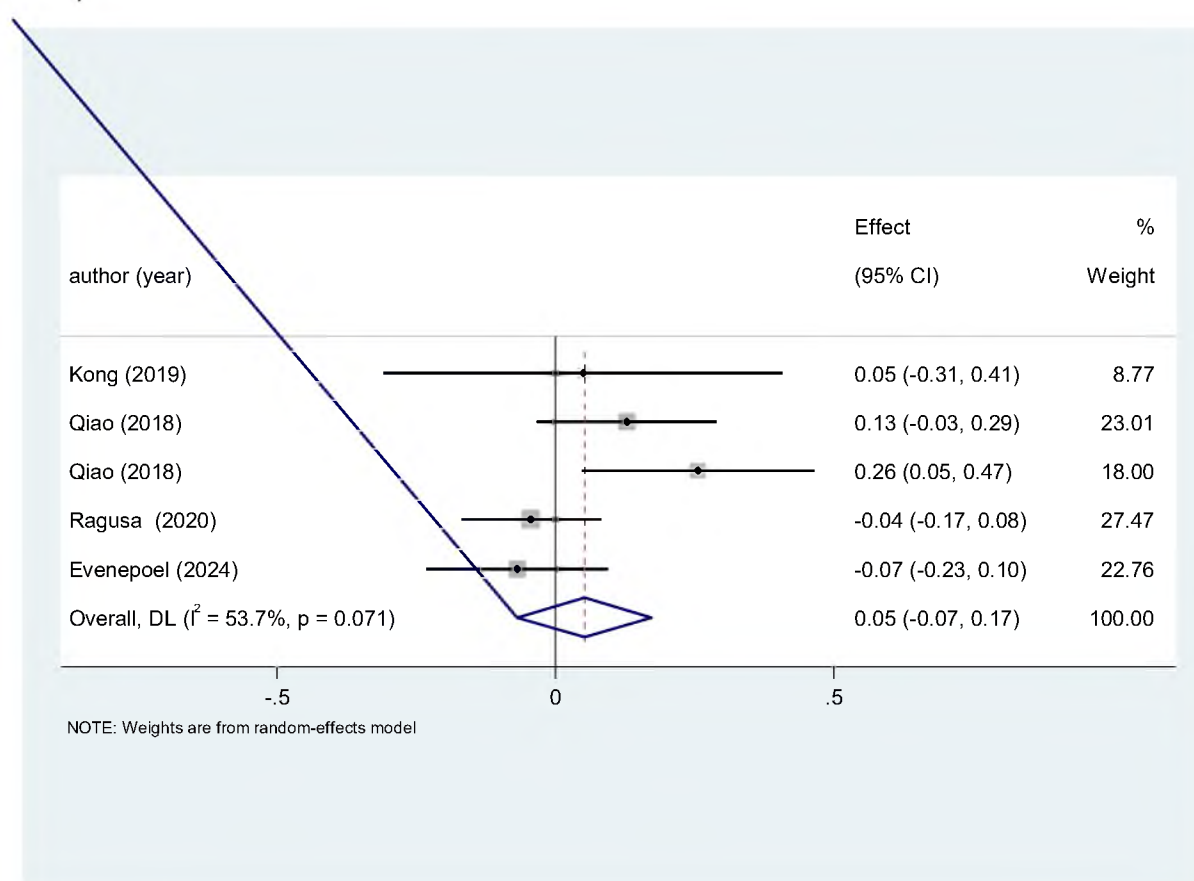


Εικόνα 9 Forest Plot μετανάλυσης των τιμών του δείκτη Shannon evenness (E) σε νευροτυπικά άτομα και σε άτομα με διαταραχή αυτιστικού φάσματος (ASD). Οι ράβδοι απεικονίζουν τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης

3.2.2 Μετα-ανάλυση της μέσης διαφοράς στους δείκτες άλφα ποικιλότητας

Στην forest plot(Εικόνα 10) η συνολική μέση διαφορά στον δείκτη Shannon ήταν 0.05 (95% CI: -0.07 έως 0.17), υποδηλώνοντας ελαφρώς υψηλότερη ποικιλότητα στην ομάδα ελέγχου, χωρίς στατιστική σημαντικότητα.

Η ετερογένεια μεταξύ των μελετών ήταν μέτρια ($I^2 = 53.7\%$), γεγονός που υποδεικνύει σχετική συνέπεια μεταξύ των επιμέρους ευρημάτων.

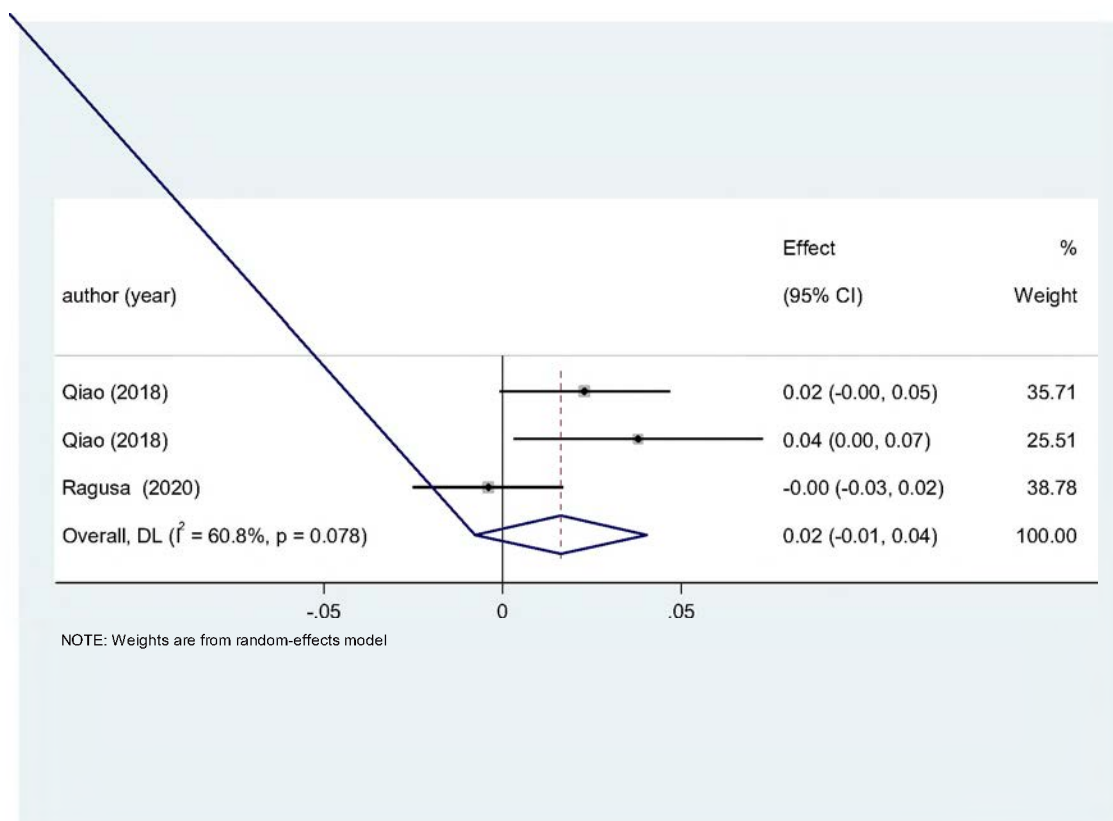


Εικόνα 10 Forest plot της μετα-ανάλυσης μέσης διαφοράς για τον δείκτη Shannon

Study	Effect	95% CI	%Weight	p-value
<i>Kong</i>	0.050	(-0.308 0.408)	8.77	
<i>Qiao</i>	0.129	(-0.033 0.291)	23.01	
<i>Qiao</i>	0.257	(0.048 0.466)	18.00	
<i>Ragusa</i>	-0.043	(-0.169 0.083)	27.47	
<i>Evenepoel</i>	-0.068	(-0.232 0.096)	22.76	
Overall, DL	0.053	(-0.067 0.173)	100.00	p = 0.388

Πίνακας 2 Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης της μέσης διαφοράς στον δείκτη Shannon (άλφα ποικιλότητα) μεταξύ ατόμων με αυτισμό (ASD) και νευροτυπικών (ομάδα ελέγχου)

Η συνολική μέση διαφορά στον δείκτη Shannon Evenness (Εικόνα 11) ανήλθε σε 0.02, με διάστημα εμπιστοσύνης 95% CI: -0.01 έως 0.04 και τιμή $p = 0.078$. Η ετερογένεια μεταξύ των μελετών εκτιμήθηκε σε $I^2 = 60.8\%$, γεγονός που υποδηλώνει ύπαρξη μέτριας μεταβολής ως προς τα επιμέρους αποτελέσματα.



Εικόνα 11 Forest plot της μετα-ανάλυσης μέσης διαφοράς για τον δείκτη Shannon Evenness

Study	Effect	95% CI	%Weight	p-value
<i>Qiao</i>	0.023	(-0.001 0.047)	35.71	
<i>Qiao</i>	0.038	(0.003 0.073)	25.51	
<i>Ragusa</i>	-0.004	(-0.025 0.017)	38.78	
Overall, DL	0.016	(-0.008 0.040)	100.00	p = 0.183

Πίνακας 3 Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης της μέσης διαφοράς στον δείκτη Shannon Evenness (άλφα ποικιλότητα) μεταξύ ατόμων με αυτισμό (ASD) και νευροτυπικών (ομάδα ελέγχου)

3. 3 Μετα-ανάλυση της σύστασης του μικροβιώματος σε επίπεδο φύλου (phylum)

Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει τις μέσες τιμές σχετικής αφθονίας, τις τυπικές αποκλίσεις και τα τυπικά σφάλματα για πέντε βασικά βακτηριακά φύλα (Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes), όπως καταγράφηκαν σε τέσσερις δημοσιευμένες μελέτες που συνέκριναν άτομα με αυτισμό (ASD) και νευροτυπικούς. Τα δεδομένα ταξινομούνται κατά μικροβιακό φύλο και ομάδα συμμετεχόντων, και αποτέλεσαν τη βάση για τη μετα-ανάλυση των σχετικών αφθονιών ανά κατάσταση.

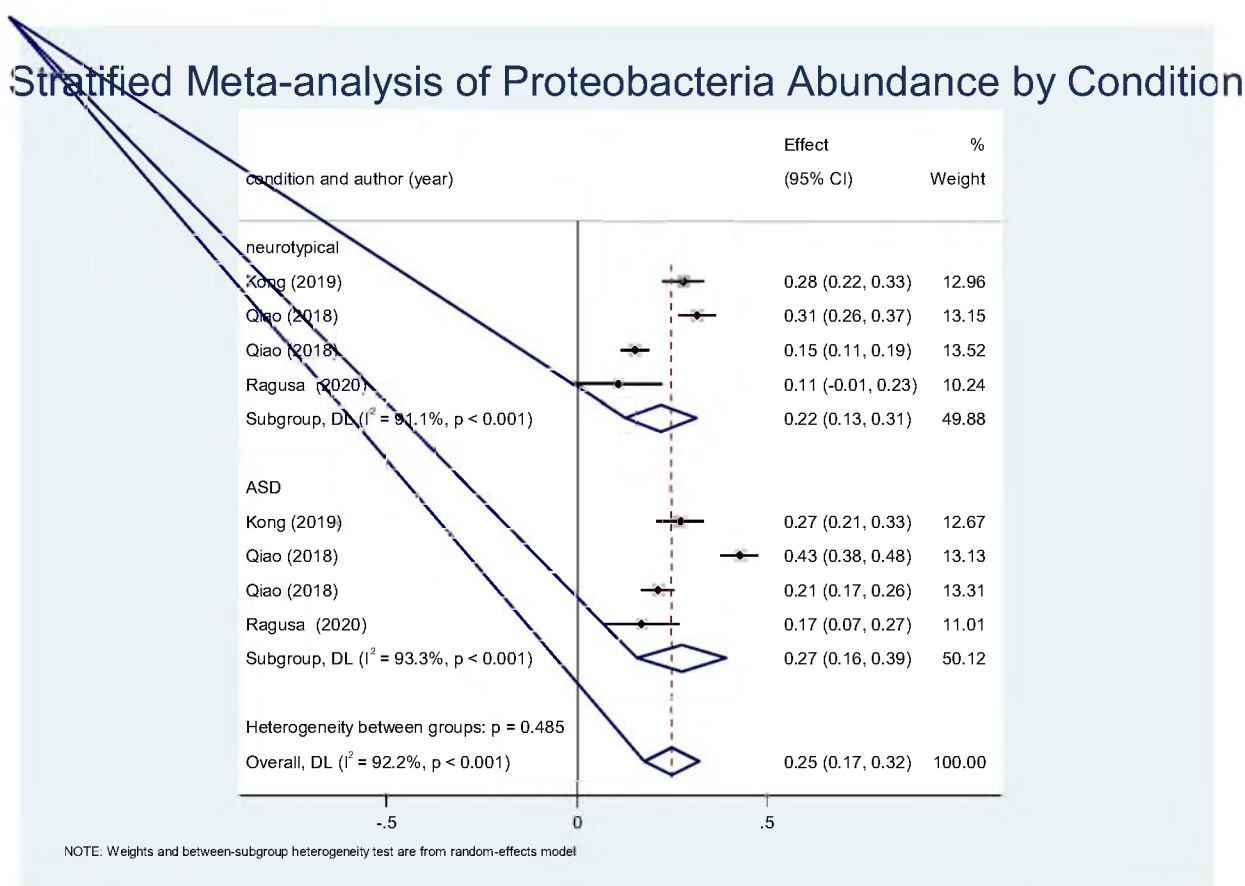
PMID	Author	Year	Phyla	Condition	n	x	SD	SE
31489949	Kong	2019	Proteobacteria	Neurotypical	19	0.2786	0.1239	0.02842
29371629	Qiao	2018	Proteobacteria	Neurotypical	27	0.3149	0.13335	0.02566
29371629	Qiao	2018	Proteobacteria	Neurotypical	26	0.1525	0.09907	0.01942
32867322	Ragusa	2020	Proteobacteria	Neurotypical	27	0.108	0.3104	0.05973
31489949	Kong	2019	Actinobacteria	Neurotypical	19	0.0598	0.03005	0.00689
29371629	Qiao	2018	Actinobacteria	Neurotypical	27	0.0663	0.0339	0.00652
29371629	Qiao	2018	Actinobacteria	Neurotypical	26	0.2569	0.11201	0.02196
32867322	Ragusa	2020	Actinobacteria	Neurotypical	27	0.133	0.3396	0.0654
31489949	Kong	2019	Fusobacteria	Neurotypical	19	0.0402	0.02371	0.00543
29371629	Qiao	2018	Fusobacteria	Neurotypical	27	0.06752	0.0402	0.00773
29371629	Qiao	2018	Fusobacteria	Neurotypical	26	0.1402	0.06329	0.01241
32867322	Ragusa	2020	Fusobacteria	Neurotypical	27	0.093	0.29043	0.30495
31489949	Kong	2019	Firmicutes	Neurotypical	19	0.33546	0.09	0.02064
29371629	Qiao	2018	Firmicutes	Neurotypical	27	0.37293	0.10714	0.02061
29371629	Qiao	2018	Firmicutes	Neurotypical	26	0.21525	0.07593	0.01489
32867322	Ragusa	2020	Firmicutes	Neurotypical	27	0.427	0.49464	0.09519
31489949	Kong	2019	Bacteroidetes	Neurotypical	19	0.25411	0.09926	0.02277
29371629	Qiao	2018	Bacteroidetes	Neurotypical	27	0.1523	0.06863	0.0132
29371629	Qiao	2018	Bacteroidetes	Neurotypical	26	0.17867	0.05617	0.01101
32867322	Ragusa	2020	Bacteroidetes	Neurotypical	27	0.223	0.41625	0.0801

31489949	Kong	2019	Proteobacteria	ASD	20	0.2715	0.14472	0.0323
29371629	Qiao	2018	Proteobacteria	ASD	32	0.42648	0.14747	0.026
29371629	Qiao	2018	Proteobacteria	ASD	26	0.21215	0.11788	0.0231
32867322	Ragusa	2020	Proteobacteria	ASD	53	0.169	0.37475	0.0515
31489949	Kong	2019	Actinobacteria	ASD	20	0.06912	0.04508	0.01007
29371629	Qiao	2018	Actinobacteria	ASD	32	0.04433	0.02628	0.00464
29371629	Qiao	2018	Actinobacteria	ASD	26	0.30388	0.10275	0.02015
32867322	Ragusa	2020	Actinobacteria	ASD	53	0.141	0.34802	0.0478
31489949	Kong	2019	Fusobacteria	ASD	20	0.05222	0.03076	0.00687
29371629	Qiao	2018	Fusobacteria	ASD	32	0.04555	0.03518	0.00622
29371629	Qiao	2018	Fusobacteria	ASD	26	0.10252	0.06795	0.01332
32867322	Ragusa	2020	Fusobacteria	ASD	53	0.076	0.265	0.0364
31489949	Kong	2019	Firmicutes	ASD	20	0.35381	0.06719	0.01502
29371629	Qiao	2018	Firmicutes	ASD	32	0.34602	0.11544	0.0204
29371629	Qiao	2018	Firmicutes	ASD	26	0.20237	0.09527	0.01868
32867322	Ragusa	2020	Firmicutes	ASD	53	0.411	0.49201	0.06758
31489949	Kong	2019	Bacteroidetes	ASD	20	0.2339	0.12534	0.02802
29371629	Qiao	2018	Bacteroidetes	ASD	32	0.12337	0.07567	0.01337
29371629	Qiao	2018	Bacteroidetes	ASD	26	0.14698	0.05614	0.01101
32867322	Ragusa	2020	Bacteroidetes	ASD	53	0.189	0.392	0.05377

Πίνακας 4 Πίνακας αφθονίας για πέντε βακτηριακά φύλα σε άτομα με ASD και νευροτυπικά, οργανωμένος ανά μελέτη, ομάδα και βακτηριακό φύλο

3.3.1 Ανάλυση διαστρωμάτωσης στα *Proteobacteria*

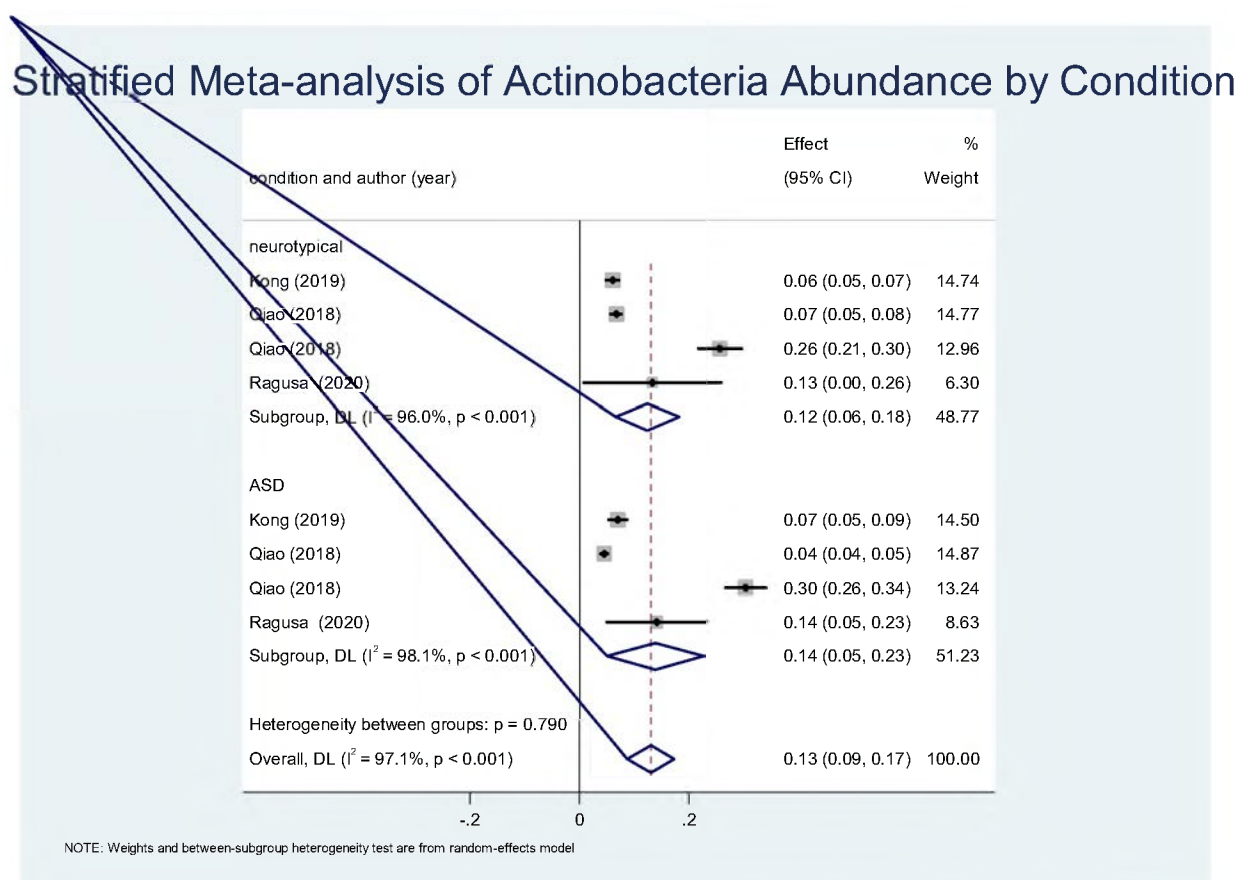
Η μετανάλυση περιλάμβανε τρεις μελέτες για κάθε υποομάδα (νευροτυπικά άτομα και άτομα με διαταραχή αυτιστικού φάσματος- ASD). Στην υποομάδα των νευροτυπικών ατόμων, το συνολικό effect size ήταν (0.22) με 95% διάστημα εμπιστοσύνης (0.13- 0.31), ενώ στην ομάδα των ατόμων με διαταραχή αυτιστικού φάσματος ήταν (0.27)(95% CI: 0.16- 0.39). Η συνολική εκτίμηση effect size για όλες τις μελέτες ήταν (0.25) (95% CI: 0.17- 0.32). Παράλληλα, η ετερογένεια ήταν υψηλή και στις δύο υποομάδες ($I^2 = 91.1\%$ και 93.3% , αντίστοιχα), ενώ η διαφορά μεταξύ των ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0.485$).



Εικόνα 12 Forest plot της διαστρωματωμένης μετα-ανάλυσης της σχετικής αφθονίας των *Proteobacteria* σε άτομα με ASD και νευροτυπικούς.

3.3.2 Ανάλυση διαστρωμάτωσης στα *Actinobacteria*

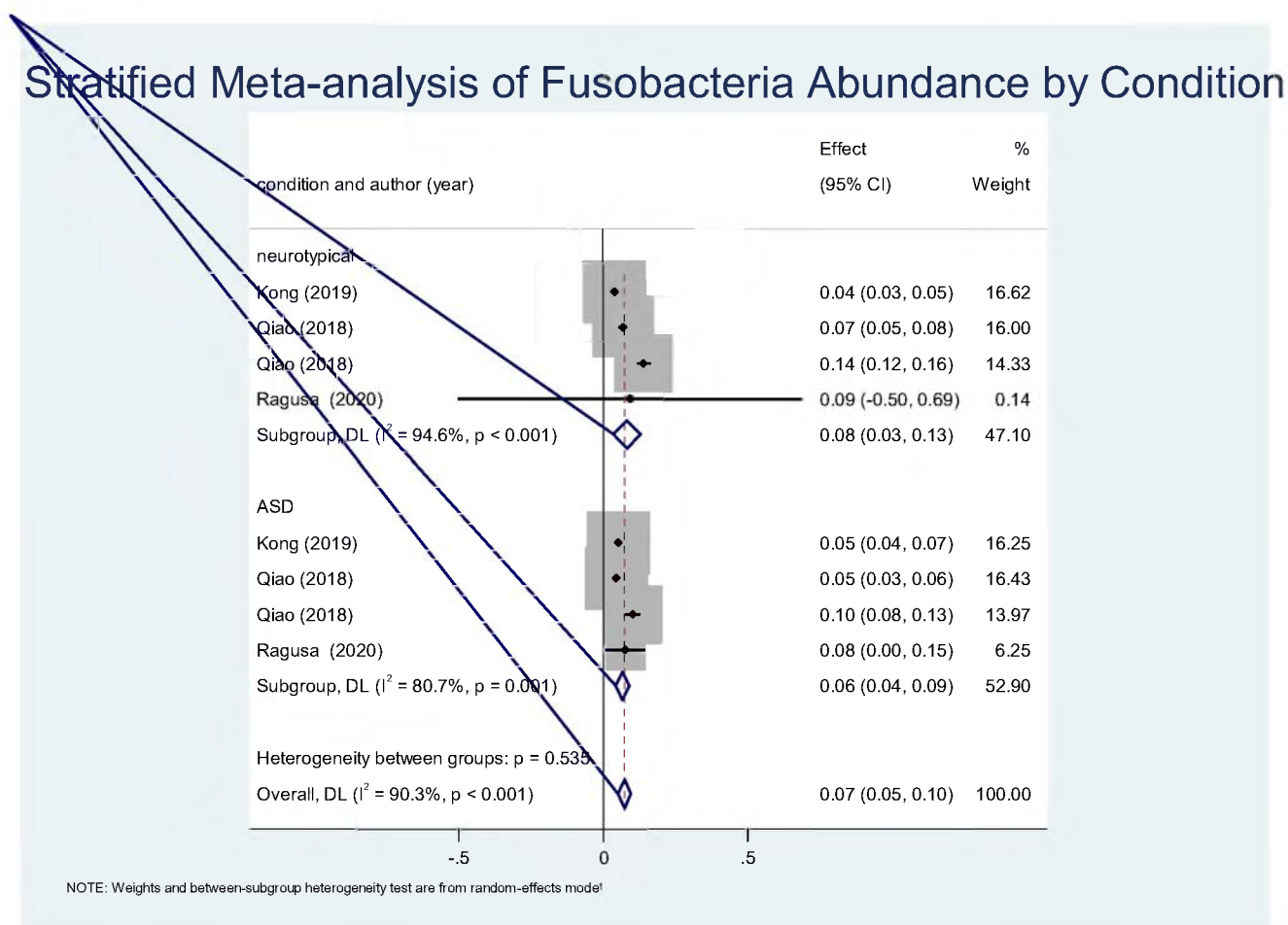
Στα νευροτυπικά άτομα η συνδυασμένη εκτίμηση του effect size(SMD) ήταν (0.12) με διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI: 0.06- 0.18), ενώ στα άτομα με ASD η αντίστοιχη τιμή ήταν (0.14) (95% CI: 0.05- 0.23). Το συνολικό effect size που προέκυψε από όλες τις μελέτες ήταν (0.13)(95% CI: 0.09-0.17). Η ετερογένεια μεταξύ των υποομάδων ήταν μη σημαντική($p = 0.790$).



Εικόνα 13 Forest plot της διαστρωματωμένης μετα-ανάλυσης της σχετικής αφθονίας των *Actinobacteria* σε άτομα με ASD και νευροτυπικούς.

3.3.3 Ανάλυση διαστρωμάτωσης στα *Fusobacteria*

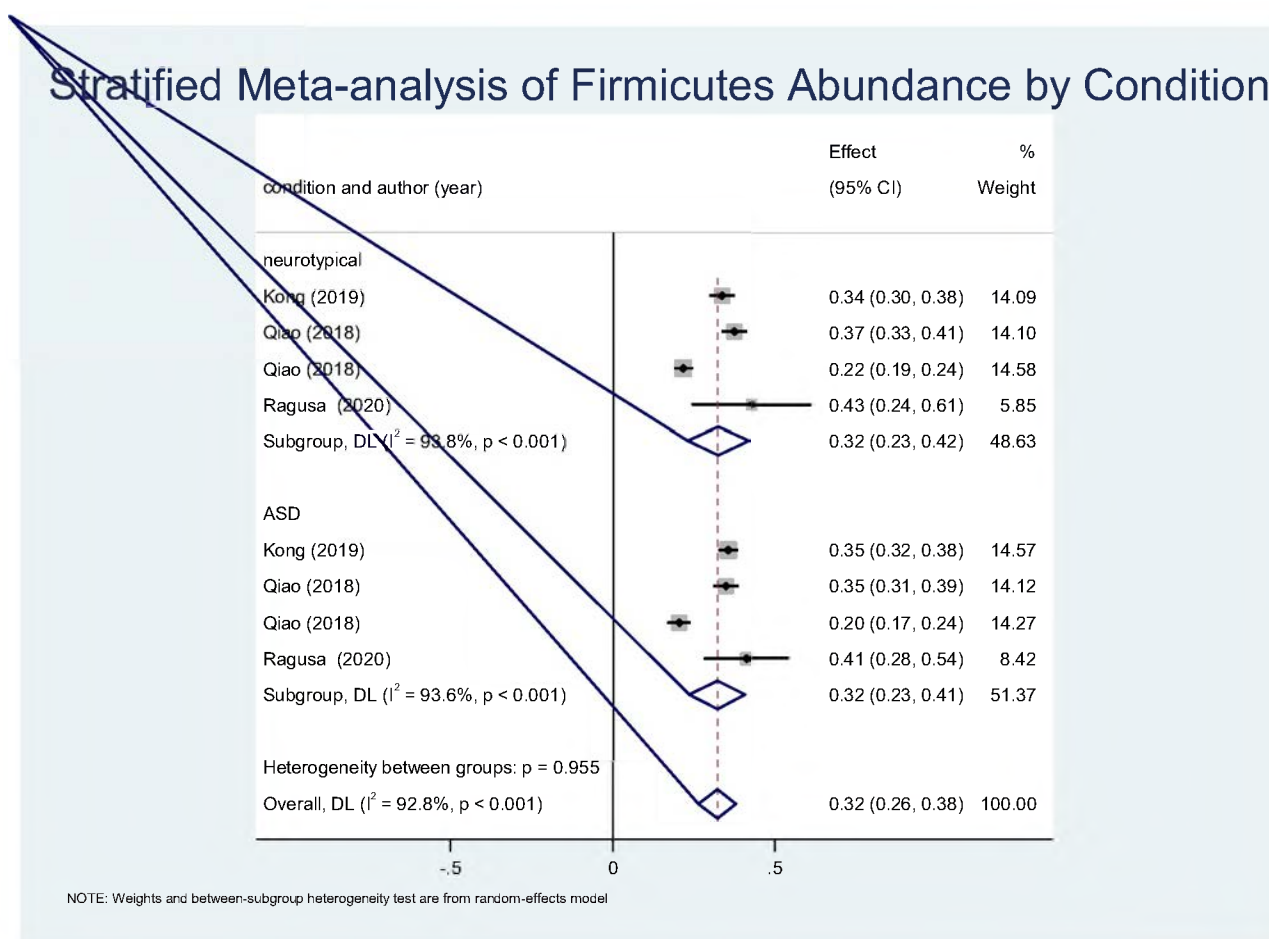
Σύμφωνα με το forest plot (Εικόνα 13) στην ομάδα των νευροτυπικών, η συνολική εκτίμηση effect size, ήταν (0.08) με διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI: 0.03- 0.13). Για άτομα με ASD, το SMD υπολογίστηκε σε (0.06) (95% CI: 0.01- 0.12). Η συνδυασμένη εκτίμηση για το σύνολο των μελετών ήταν (0.07) (95% CI: 0.01- 0.13). Η ετερογένεια μεταξύ των ομάδων δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($p= 0.531$), ενώ το συνολικό I^2 ήταν 90.3%.



Εικόνα 14 Forest plot της διαστρωματωμένης μετα-ανάλυσης της σχετικής αφθονίας των *Fusobacteria* σε άτομα με ASD και νευροτυπικούς.

3.3.4 Ανάλυση διαστρωμάτωσης στους *Firmicutes*

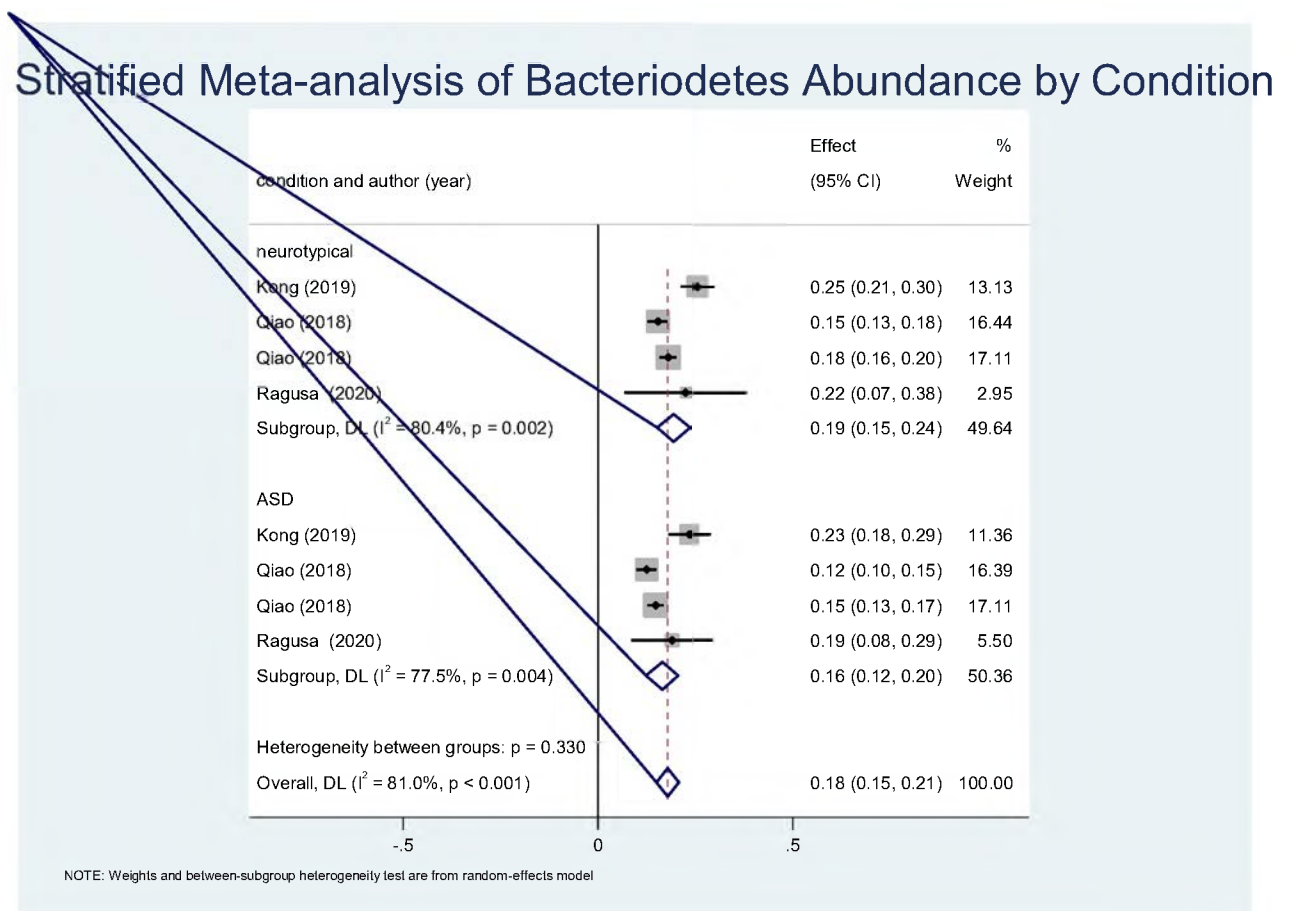
Η μέση τιμή του effect size για τα νευροτυπικά άτομα ανήλθε σε (0.32) με 95% διάστημα εμπιστοσύνης από (0.23) έως (0.42), ενώ για την ομάδα ASD ήταν ελαφρώς χαμηλότερη, στο (0.32) (95% CI : 0.21- 0.39). Το σύνολο των δεδομένων απέδωσε SMD ίσο με (0.32) (95% CI : 0.26- 0.38). Συνεπώς, η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($p = 0.954$), ενώ η ετερογένεια της μετανάλυσης χαρακτηρίστηκε ως υψηλή ($I^2 = 92.8\%$).



Εικόνα 15 Forest plot της διαστρωματωμένης μετα-ανάλυσης της σχετικής αφθονίας των *Firmicutes* σε άτομα με ASD και νευροτυπικούς

3.3.5 Ανάλυση διαστρωμάτωσης στους *Bacteroidetes*

Η εκτίμηση του effect size για τα *Bacteroidetes* ανέδειξε συνολικό effect size (SMD) (0.19) στους νευροτυπικούς (95% CI: 0.15-0.23) και (0.16) στα άτομα με ASD (95% CI: 0.11- 0.20). Η ενοποιημένη εκτίμηση από όλες τις μελέτες ήταν (0.18) (95% CI: 0.15-0.21). Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ($p = 0.330$), ενώ η συνολική ετερογένεια χαρακτηρίστηκε ως μέτρια προς υψηλή ($I^2 = 81.0\%$)



Εικόνα 16 Forest plot της διαστρωματωμένης μετα-ανάλυσης της σχετικής αφθονίας των *Bacteroidetes* σε άτομα με ASD και νευροτυπικούς

3.4 Μετα-ανάλυση μέσης διαφοράς των δεδομένων σχετικής αφθονίας

3.4.1 Actinobacteria

Η μετανάλυση των Actinobacteria παρουσίασε συνολικό effect size (SMD) (0.016), με 95% διάστημα εμπιστοσύνης [-0.483, 0.516], υποδεικνύοντας έλλειψη σαφούς κατεύθυνσης στην συνολική αξιολόγηση. Οι τιμές των επιμέρους μελετών εμφάνισαν ποικιλία, καθώς θετική επίδραση καταγράφηκε σε μία μελέτη του Qiao (SMD = 0.732, 95% CI: [0.203, 1.262]), εντούτοις οι υπόλοιπες βρέθηκαν σε αρνητική ή ουδέτερη ζώνη. Η υψηλότερη σταθμισμένη συμμετοχή καταγράφηκε για την μελέτη του Ragusa (21.17%), με SMD που προσεγγίζει το μηδέν (-0.023, 95% CI: [-0.487, 0.440]).

Study	MD	95% CI	%Weight	p-value
Kong	-0.242	(-0.872, 0.388)	22.67	
Qiao	0.732	(0.203, 1.262)	25.36	
Qiao	-0.437	(-0.987, 0.113)	24.80	
Ragusa	-0.023	(-0.487, 0.440)	27.17	
Overall, DL	0.016	(-0.483, 0.516)	100.00	p = 0.949

Πίνακας 5 Εκτιμήσεις του effect size (SMD) για την αφθονία των Actinobacteria από μετανάλυση τριών μελετών

3.4.2 Firmicutes

Η συνολική επίδραση του effect size (SMD) για τα Firmicutes εκτιμήθηκε στα 0.069, με 95% διάστημα εμπιστοσύνης [-0.196, 0.333], υποδεικνύοντας μικρή και μη στατιστικά σημαντική επίδραση. Οι τιμές SMD κυμάνθηκαν από -0.232 έως 0.241, ενώ η μελέτη του Ragusa είχε τη μεγαλύτερη επιρροή στο συνολικό αποτέλεσμα (32.48%).

Study	MD	95% CI	%Weight	p- value
Kong	-0.232	(-0.862, 0.398)	17.57	
Qiao	0.241	(-0.273, 0.755)	26.40	
Qiao	0.150	(-0.395, 0.694)	23.54	
Ragusa	0.032	(-0.431, 0.496)	32.48	
Overall, DL	0.069	(-0.196, 0.333)	100.00	p= 0.611

Πίνακας 6 Εκτιμήσεις του effect size (SMD) για την αφθονία των Firmicutes από μετανάλυση τριών μελετών

3.4.3 Fusobacteria

Η συνολική τιμή για το effect size (SMD) για τα Fusobacteria υπολογίστηκε σε 0.213, με 95% διάστημα εμπιστοσύνης [-0.227, 0.653]. Οι εκάστοτε τιμές περιλαμβάνουν: -0.436 για την μελέτη του Kong (95% CI: [-1.072, 0.200]), 0.585 για την πρώτη καταγραφή του Qiao (95% CI: 0.062, 1.108), 0.574 για τη δεύτερη καταγραφή του Qiao (95% CI: [0.019, 1.129]) και 0.062 για τον Ragusa (95% CI: [-0.401, 0.526]). Η μεγαλύτερη συμμετοχή στο συνολικό αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στην μελέτη του Ragusa (27.86%), ενώ οι άλλες κυμάνθηκαν από 21.90% έως 25.68%.

Study	MD	95% CI	%Weight	p-value
<i>Kong</i>	-0.436	(-1.072, 0.200)	21.90	
<i>Qiao</i>	0.585	(0.062, 1.108)	25.68	
<i>Qiao</i>	0.574	(0.019, 1.129)	24.56	
<i>Ragusa</i>	0.062	(-0.401, 0.526)	27.86	
Overall, DL	0.213	(-0.227, 0.653)	100.00	p= 0.343

Πίνακας 7 Εκτιμήσεις του effect size (SMD) για την αφθονία των *Fusobacteria* από μετανάλυση τριών μελετών

3.4.4 *Bacteroidetes*

Ο συνολικός δείκτης effect size (SMD) για τα *Bacteroidetes* υπολογίστηκε σε 0.294, με 95% διάστημα εμπιστοσύνης [0.029,0.560], που δείχνει θετική και στατιστικά σημαντική επίδραση. Οι τιμές SMD στις εκάστοτε μελέτες κυμάνθηκαν από 0.085 (*Ragusa*) έως 0.564 (δεύτερη καταγραφή *Qiao*), με μόνη εξαίρεση την τελευταία που είχε διάστημα εμπιστοσύνης που δεν περιελάμβανε το μηδέν. Η σημαντικότερη σταθμισμένη συμβολή στο συνολικό αποτέλεσμα ανήκει στην μελέτη του *Ragusa* (32.85%), ενώ οι υπόλοιπες κυμαίνονται από 17.83% έως 26.38.

Study	MD	95% CI	%Weight	p-value
<i>Kong</i>	0.178	(-0.451, 0.807)	17.83	
<i>Qiao</i>	0.399	(-0.119, 0.916)	26.38	
<i>Qiao</i>	0.564	(0.010, 1.119)	22.94	
<i>Ragusa</i>	0.085	(-0.379, 0.549)	32.85	
Overall, DL	0.294	(0.029,0.560)	100.00	p = 0.030

Πίνακας 8 Εκτιμήσεις του effect size (SMD) για την αφθονία των Bacteroidetes από μετανάλυση τριών μελετών

3.4.5 *Proteobacteria*

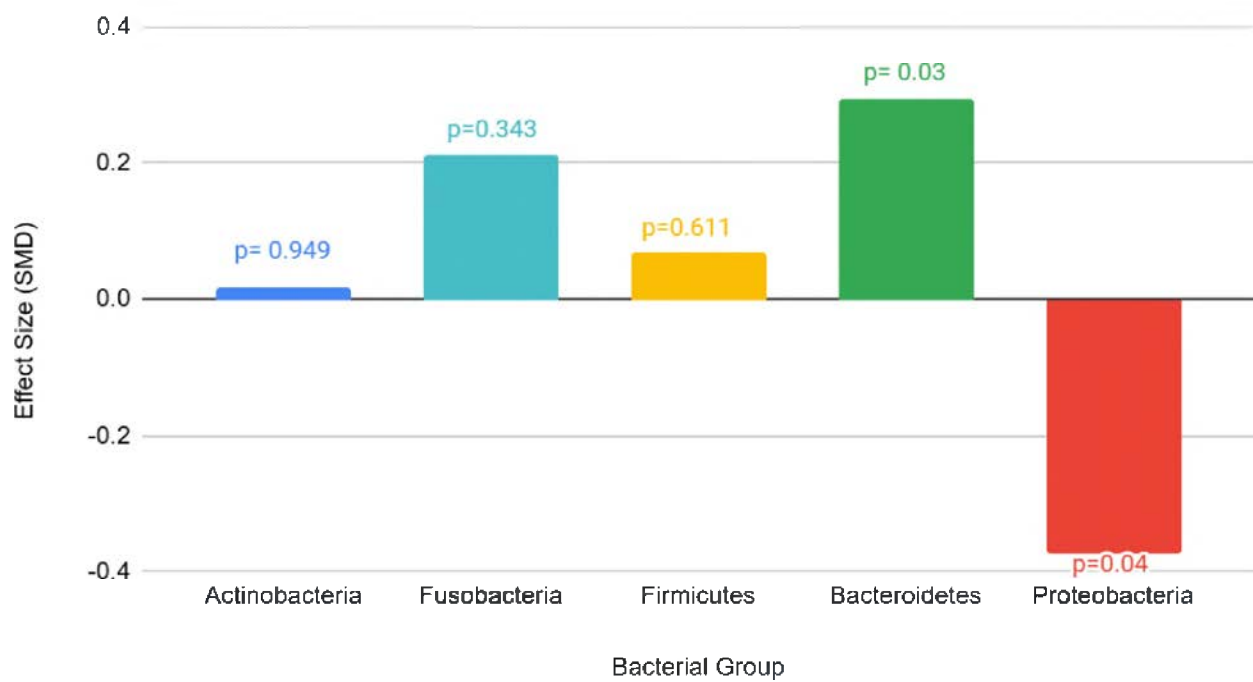
Για τα proteobacteria, το συνολικό effect size (SMD) της μετανάλυσης υπολογίστηκε σε (-0.374), με 95% διάστημα εμπιστοσύνης [-0.730, -0.017], υποδηλώνοντας στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες. Οι μεμονωμένες μελέτες παρουσίασαν τιμές SMD που κυμαίνονταν από 0.053 έως -0.790, με τις περισσότερες να φανερώνουν αρνητική επίδραση. Οι υψηλότερες σταθμίσεις αποδόθηκαν στις μελέτες του Ragusa (29.45%) και του Qiao (25.44%).

Study	MD	95% CI	%Weight	p-value
<i>Kong</i>	0.053	(-0.575, 0.681)	20.82	
<i>Qiao</i>	-0.790	(-1.323, -0.258)	25.44	
<i>Qiao</i>	-0.548	(-1.102, 0.006)	24.29	
<i>Ragusa</i>	-0.172	(-0.636, -0.292)	29.45	
Overall, DL	-0.374	(-0.730, -0.017)	100.00	p = 0.040

Πίνακας 9 Εκτιμήσεις του effect size (SMD) για την αφθονία των Proteobacteria από μετανάλυση τριών μελετών

Στο ραβδόγραμμα (Εικόνα 16) απεικονίζονται οι τιμές effect size (SMD) για πέντε βακτηριακές ομάδες, καθώς και οι αντίστοιχες τιμές p-value, για τη στατιστική σύγκριση μεταξύ ομάδων. Τα proteobacteria παρουσίασαν αρνητικό effect size (SMD= -0.31) με $p= 0.04$, υποδεικνύοντας στατιστικά σημαντική διαφορά. Αντιθέτως, οι Bacteroidetes εμφάνισαν θετική επίδραση (SMD = 0.28) επίσης με σημαντική τιμή στο p- value ($p=0.03$). Τα Actinobacteria, τα Fusobacteria και οι Firmicutes παρουσίασαν μη στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$) με τιμές SMD που κυμάνθηκαν από 0.01 έως 0.19.

Effect Size (SMD) by Bacterial Group



Εικόνα 17 Εκτιμήσεις του effect size (SMD) μέσω μετανάλυσης κατά βακτηριακή ομάδα, για τη σύγκριση ατόμων με αυτισμό και νευροτυπικών.

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση

4.1 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων για την α-ποικιλότητα

Η μετα-ανάλυση των δεικτών Shannon και Shannon Evenness ανέδειξε μειωμένη α-ποικιλότητα στα άτομα με ASD. Συγκεκριμένα, για τον δείκτη Shannon καταγράφηκε συνολική εκτίμηση effect size (SMD) ίση με 0.141 (95% CI: -0.174 έως 0.457), ενώ για τον δείκτη Shannon Evenness η εκτίμηση ήταν μεγαλύτερη (SMD = 0.307, 95% CI: -0.121 έως 0.735). Αν και στις δύο περιπτώσεις τα διαστήματα εμπιστοσύνης περιλαμβάνουν το μηδέν, προκαλώντας τα αποτελέσματα να μην είναι στατιστικά σημαντικά, η κατεύθυνση των αποτελεσμάτων υποδηλώνει μια τάση για μείωση της ποικιλότητας και της ισοκατανομής στα άτομα με ASD.

Το γράφημα σύγκρισης των effect sizes φανερώνει ότι ο δείκτης Shannon Evenness εμφανίζει μεγαλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει μια πιο έντονη ανισοκατανομή βακτηριακών ειδών στον πληθυσμό με ASD, αντί για μείωση της συνολικής ποικιλότητας. Η μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των μελετών ($I^2 > 95\%$) υποδεικνύει ότι τα αποτελέσματα επηρεάζονται από παραμέτρους όπως η μέθοδος αλληλούχισης, τα κριτήρια συμμετοχής καθώς και τα χαρακτηριστικά του δείγματος.

Οι δείκτες α-ποικιλότητας αξιολογούν τη μικροβιακή ποικιλομορφία σε ένα δείγμα, στοιχείο κρίσιμο για τη σταθερότητα και τη λειτουργία του μικροβιώματος. Η χαμηλή μέση τιμή του δείκτη Shannon στην ομάδα ASD δείχνει πιθανή περιορισμένη ποικιλία οικοσυστήματος. Ο δείκτης Shannon Evenness, από την άλλη, υποδεικνύει ανισορροπία στην κατανομή των μικροοργανισμών, πιθανόν εξαιτίας της επικράτησης ορισμένων βακτηριακών φύλων – ένα φαινόμενο που σχετίζεται με φλεγμονώδεις και παθολογικές καταστάσεις.

Η χαμηλή α-ποικιλότητα έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο για μεταβολικές και νευροψυχιατρικές διαταραχές (Liu et al., 2019· Goines & Ashwood, 2013). Επομένως, ακόμα και αν τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά, η κατεύθυνσή τους ταιριάζει με την υπόθεση για την ύπαρξη μικροβιακής απορρύθμισης σε άτομα με αυτισμό.

4.2 Ανάλυση των αποτελεσμάτων για τη σχετική αφθονία βακτηριακών φύλων

Η μετα-ανάλυση της σχετικής αφθονίας ανέδειξε διαφορές σε ορισμένα βακτηριακά φύλα ανάμεσα σε άτομα με ASD και σε νευροτυπικά άτομα. Οι κυριότερες διαφορές εντοπίστηκαν στα Proteobacteria και στους Bacteroidetes.

Τα Proteobacteria παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα ASD (SMD = -0.374, $p = 0.04$), εύρημα που υποστηρίζει την υπόθεση περί εντερικής φλεγμονής και μικροβιακής δυσβίωσης. Πρόκειται για βακτήρια που περιλαμβάνουν διάφορα Gram-αρνητικά είδη, με ενδεχόμενη συμμετοχή στην ενεργοποίηση ανοσολογικών μηχανισμών. Αντίθετα, τα Bacteroidetes εντοπίστηκαν μειωμένα σε άτομα με αυτισμό (SMD = 0.294, $p = 0.03$), γεγονός που ενδέχεται να σχετίζεται με μείωση της ικανότητας παραγωγής λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου, ουσιών που αφορούν τη λειτουργία του εντερικού και του νευρικού συστήματος.

Τα υπόλοιπα βακτήρια (Firmicutes, Fusobacteria και Actinobacteria) δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Οι εκτιμήσεις του effect size για αυτά τα φύλα ήταν χαμηλές και οι τιμές p -value παρέμειναν πάνω από το 0.05. Παρόλο που δεν εντοπίστηκαν ξεκάθαρα μοτίβα διαφοροποίησης, η μεγάλη ετερογένεια ανάμεσα στις μελέτες υποδεικνύει ότι είναι αναγκαία περαιτέρω διερεύνηση σε πιο ομοιογενείς πληθυσμούς.

4.3 Συνολική αξιολόγηση

Παρά τους περιορισμούς, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ενισχύουν την άποψη ότι μικρές αλλά συνεπείς μικροβιακές διαφοροποιήσεις ενδέχεται να αντανakλούν βαθύτερες βιολογικές διεργασίες στον αυτισμό.

Αξιοσημείωτο είναι ότι παρόμοια πρότυπα έχουν καταγραφεί και στο εντερικό μικροβίωμα ατόμων με αυτισμό. Σύμφωνα με πρόσφατες μετα-αναλύσεις και μελέτες (Iglesias-Vázquez et al., 2020· Rose et al., 2018· Finegold et al., 2010), η εντερική μικροβιακή κοινότητα σε άτομα με ASD παρουσιάζει τάση για χαμηλότερη α-ποικιλότητα και αυξημένη αφθονία των Proteobacteria, μια ομάδα που περιλαμβάνει αρκετά Gram-αρνητικά βακτήρια με φλεγμονώδεις ιδιότητες. Αντίθετα, για τα Bacteroidetes, τα ευρήματα είναι λιγότερο συνεπή: ορισμένες μελέτες καταγράφουν μειωμένη παρουσία αυτής της ομάδας (π.χ. Finegold et al., 2010· Rose et al., 2018), ενώ άλλες αναφέρουν αντικρουόμενα ή μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (Iglesias-Vázquez et al., 2020). Η ενδεχόμενη μείωση παραγωγών λιπαρών οξέων βραχέος αλύσου (SCFAs), όπως το βουτυρικό και το οξικό, ενδέχεται να επηρεάζει την εντερική ακεραιότητα, τη ρύθμιση της φλεγμονής και την επικοινωνία μεταξύ εντέρου και εγκεφάλου [23].

Ανάλογες βακτηριακές διαφοροποιήσεις με αυτές του εντέρου παρατηρούνται και στο περιοδοντικό περιβάλλον, στηρίζοντας την υπόθεση ύπαρξης ενός μοναδικού μικροβιακού προφίλ δυσβίωσης σε άτομα με ASD. Μελέτες όπως εκείνες των Zhang et al. (2022) και Cai et al. (2023) αναδεικνύουν τη σημασία του άξονα στόμα-έντερο-εγκέφαλος, καθώς η μικροβιακή ανισορροπία στο στόμα μπορεί να επηρεάσει έμμεσα την εντερική οικολογία και να έχει επιπτώσεις στη νευροανάπτυξη μέσω νευρωνικών, ανοσολογικών και ορμονικών διαδρομών.

Επομένως, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν τη θεωρία της μικροβιακής συμβολής στην παθογένεια του αυτισμού, προτείνοντας ότι η περιοδοντική δυσβίωση μπορεί να αποτελεί μέρος μιας ευρύτερης συστημικής μικροβιακής ανισορροπίας,

5. Βιβλιογραφία

1. Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-VanderWeele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, 392(10146), 508–520.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)
2. American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). American Psychiatric Publishing.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2023). *Autism spectrum disorder (ASD)*. <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/index.html>
4. World Health Organization (WHO). (2022). *Autism*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>
5. Vuong, H. E., & Hsiao, E. Y. (2017). Emerging roles for the gut microbiome in autism spectrum disorder. *Biological Psychiatry*, 81(5), 411–423.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.024>
6. Zhou, Y., Zhang, Y., Gong, Y., Li, Y., Wang, B., & Jin, L. (2024). Microbiome composition and metabolic pathways in shallow and deep periodontal pockets. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/390801483>
7. Sansores-España, L. D., Melgar-Rodríguez, S., Olivares-Sagredo, K., Cafferata, E. A., Martínez-Aguilar, V. M., Vernal, R., Paula-Lima, A. C., & Díaz-Zúñiga, J. (2021). Oral-gut-brain axis in experimental models of periodontitis: Associating gut dysbiosis with neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging*, 2, 781582.
<https://doi.org/10.3389/fragi.2021.781582>
8. Higgins, J. P. T., Thompson, S. G., Deeks, J. J., & Altman, D. G. (2003). Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*, 327(7414), 557–560.
<https://doi.org/10.1136/bmj.327.7414.557>
9. National Human Genome Research Institute. (2022). *DNA sequencing fact sheet*. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Fact-Sheet>
10. Illumina. (n.d.). *16S and ITS rRNA sequencing*. <https://www.illumina.com/areas-of-interest/microbiology/microbial-sequencing-methods/16s-rna-sequencing.html>
11. World Health Organization. (2016). *International statistical classification of diseases and related health problems (10th revision – ICD-10)*. <https://icd.who.int>

12. ScienceDirect. (n.d.). *Bacteroidetes*.
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/bacteroidetes>
13. Rajasekaran, J. J., Krishnamurthy, H. K., Bosco, J., Jayaraman, V., Krishna, K., Wang, T., & Bei, K. (2024). Oral microbiome: A review of its impact on oral and systemic health. *Microorganisms*, 12(9), 1797.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12091797>
14. Shin, N. R., Whon, T. W., & Bae, J. W. (2015). Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Experimental & Molecular Medicine*, 47, e183. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.95>
15. Finegold, S. M., Downes, J., Summanen, P. H. (2010). *Microbiology of regressive autism*. *Anaerobe*, 16(4), 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.008>
16. Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., ... Knight, R. (2017). A communal catalogue reveals Earth’s multiscale microbial diversity. *Nature*, 551(7681), 457–463. <https://doi.org/10.1038/nature24621>
17. National Center for Biotechnology Information (NCBI). (n.d.). *PubMed overview*. U.S. National Library of Medicine. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
18. Bird, S., Klein, E., & Loper, E. (2009). *Natural language processing with Python: Analyzing text with the natural language toolkit*. O’Reilly Media.
19. Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Lawrence Erlbaum Associates.
20. Encyclopædia Britannica. (n.d.). Confidence interval. Encyclopædia Britannica. Retrieved May 22, 2025, from <https://www.britannica.com/science/confidence-interval>
21. Altman, D. G., & Bland, J. M. (2005). Standard deviations and standard errors. *BMJ*, 331(7521), 903. <https://doi.org/10.1136/bmj.331.7521.903>
22. StataCorp. (2013). *Stata statistical software: Release 13*. StataCorp LP.
23. Candela, M., Rampelli, S., Turrone, S., Severgnini, M., Consolandi, C., De Bellis, G., & Brigidi, P. (2018). Unbalance of intestinal microbiota in atopic children. *New Microbiologica*, 41(2), 96–105.
24. Magurran, A. E. (n.d.). *Measuring biological diversity*. Retrieved from file:///C:/Users/lefte/Downloads/MeasuringBiologicalDiversity-AnneEMagurran.pdf

25. Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13(1), 131–144.
26. Liu, F., Li, J., Wu, F., Zheng, H., Peng, Q., & Zhou, H. (2019). Altered composition and function of intestinal microbiota in autism spectrum disorders: A systematic review. *Translational Psychiatry*, 9(1), 43.
<https://doi.org/10.1038/s41398-019-0425-1>
27. Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-VanderWeele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, 392(10146), 508–520.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)
28. Cai, Y., Wang, R., Pei, Y., Zhang, M., Guo, M., Wu, Y., ... & Zhao, W. (2023). *Alterations of oral and gut microbiota in children with autism spectrum disorders*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1165345.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1165345>
29. Goines, P., & Ashwood, P. (2013). *Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): Possible role of the environment*. *Neurotoxicity Research*, 23(1), 19–39. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9336-0>
30. Iglesias-Vázquez, L., Van Ginkel Riba, G., Arijá, V., & Canals, J. (2020). *Composition of gut microbiota in children with autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis*. *Nutrients*, 12(3), 792.
<https://doi.org/10.3390/nu12030792>
31. Rose, D. R., Yang, H., Serena, G., Sturgeon, C., Mai, V., Stephenson, K., ... & Fasano, A. (2018). *Differential immune activation and altered microbiota composition in children with autism spectrum disorder and co-morbid gastrointestinal symptoms*. *Brain, Behavior, and Immunity*, 70, 261–271.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.03.025>
32. Zhang, Y., Shen, D., Fang, Z., Jie, Z., Qiu, X., Zhang, C., ... & Li, L. (2022). *Characterization of the oral and gut microbiota in patients with autism spectrum disorders in China*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 826317.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.826317>

6. Παράρτημα Α

Κώδικας python για την επισήμανση λέξεων- στόχων.

Ο παρακάτω κώδικας χρησιμοποιήθηκε για την αυτόματη επισήμανση όρων-στόχων σε περιλήψεις επιστημονικών άρθρων σε μορφή .docx, διευκολύνοντας την αναγνώριση σχετικών μελετών.

```
from docx import Document
from docx.shared import Pt, RGBColor
from nltk.tokenize import word_tokenize
import nltk

nltk.download('punkt')

def highlight_keywords_in_file(input_file, output_file,
keywords_colors, font_size=12):
    if input_file.endswith('.docx'):
        doc = Document(input_file)

        # Μετατροπή των λέξεων-κλειδιών σε πεζά
        keywords_colors = {kw.lower(): color for kw, color in
keywords_colors.items()}

        for paragraph in doc.paragraphs:
            paragraph_text = paragraph.text
            paragraph.clear()
            words = word_tokenize(paragraph_text)

            i = 0
            while i < len(words):
                word = words[i]
                word_lower = word.lower()
```

```

        if word_lower == "16" and i + 1 < len(words) and
words[i + 1].lower() == "s":

            run = paragraph.add_run(f"{word}
{words[i+1]} ")

            run.font.bold = True
            run.font.underline = True
            run.font.color.rgb =
keywords_colors["16s"]

            run.font.size = Pt(font_size)
            i += 2
        elif word_lower in keywords_colors:
            run = paragraph.add_run(word + " ")
            run.font.bold = True
            run.font.underline = True
            run.font.color.rgb =
keywords_colors[word_lower]

            run.font.size = Pt(font_size)
            i += 1
        else:
            paragraph.add_run(word + " ")
            i += 1

    doc.save(output_file)
    print(f"Το αρχείο αποθηκεύτηκε ως {output_file}")
else:
    print("Μη υποστηριζόμενη μορφή αρχείου")

# Λέξεις-κλειδιά και χρώμα επισήμανσης
keywords_colors = {
    'shotgun': RGBColor(255, 0, 0),
    'sequencing': RGBColor(0, 128, 0),
    'ngs': RGBColor(0, 0, 255),
    '16s': RGBColor(128, 0, 128),
    'review': RGBColor(255, 165, 0)
}

```

```
# Παράδειγμα χρήσης
input_file = r'C:\Users\Dell\Desktop\PTIXIAKI
ERGASIA\abstract-MICROBIOME-set_15-11-2024.docx'
output_file = r'C:\Users\Dell\Desktop\PTIXIAKI
ERGASIA\αποτέλεσμα.docx'

highlight_keywords_in_file(input_file, output_file,
keywords_colors)
```

- *Παράδειγμα αρχείου εισόδου: abstract-MICROBIOME-set_15-11-2024.docx*
- *Παραγόμενο αρχείο εξόδου: αποτέλεσμα.docx*