

Santeri Lempiäinen

SUOLISTOMIKROBISTON YHTEYS AIVOJEN VALKEAN AINEEN RADASTOON,  
FASCICULUS UNCINATUKSEEN

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevätlukukausi 2025

Santeri Lempiäinen

SUOLISTOMIKROBISTON YHTEYS AIVOJEN VALKEAN AINEEN RADASTOON,  
FASCICULUS UNCINATUKSEEN

Lääketieteellinen tiedekunta, psykiatria

Kevätlukukausi 2025

Vastuhenkilö: Anna Aatsinki

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.*

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

SANTERI LEMPIÄINEN: Suolistomikrobiston yhteys aivojen valkean aineen radastoon, fasciculus uncinatukseen

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 20 s.

Psykiatria

Kesäkuu 2025

---

Tutkimukset ovat osoittaneet, että suoliston mikrobiomi on yhteydessä hermoston ja immuunijärjestelmän kehitykseen. Tutkimustulokset viittaavat siihen, että suoliston mikrobiomin koostumuksella on yhteys kognitiiviseen kehitykseen ja aivojen mikrorakenteen muodostumiseen. Tämä tutkimus pyrkii selvittämään, onko suoliston mikrobiomin koostumuksella yhteyttä aivojen rakenteen kehitykseen. Tarkastelun kohteena on valkean aineen radaston, fasciculus uncinatuksen (FU), rakenne. FU on valkean aineen assosioaattorata, joka yhdistää limbisen järjestelmän osia otsalohkon alaosiin. Nykyisen käsityksen mukaan FU on osallisena oppimis- ja muistiprosesseissa. FU:n mikrorakenteen rakennepoikkeavuuksia on todettu liittyvän psykiatrisiin sairauksiin.

Tutkimukseen osallistui 147 henkilöä. Tutkitut olivat mukana FinnBrain kohortti - tutkimuksessa. Ulostenäytteet kerättiin 2,5 kuukauden iässä. Näytteet analysoitiin 16S rRNA-sekvensoinnilla. FU:n mikrorakenne mitattiin fraktionaalisen anisotropian (FA) arvoilla viiden vuoden iässä. FA-arvot mitattiin diffuusion tensorikuvauksen (DTI) avulla. FA-arvot kuvaavat valkean aineen mikrorakenteen kehittyneisyyttä.

Tässä tutkimuksessa ei löydetty tilastollisesti merkitseviä yhteyksiä suolistomikrobiston koostumuksen ja valkean aineen radaston, FU, mikrorakenteen kehityksen välillä. Yksi heikko negatiivinen yhteys löytyi Staphylococcus-suvun pitoisuuden ja FU:n FA-arvojen välillä. Tutkimuksen puutteet huomioiden jatkoanalyysimahdollisuuksia olisi kuitenkin monia. Niiden toteuttaminen voisi tuoda arvokasta, kliinisestikin merkityksellistä, lisätietoa suoli-aivoakselin toiminnasta.

Asiasanat: keskushermoston kehitys, suolistomikrobisto, fasciculus uncinatus

# 1 Sisällys

2	Johdanto .....	1
3	Aineisto ja menetelmät .....	3
3.1	Tutkimukseen osallistuneet henkilöt .....	3
3.2	Ulostedatan tiedonkeruu ja näytteiden analysointi.....	3
3.3	Magneettikuvausdatan tiedonkeruu .....	3
3.4	Kuva-analyysi .....	4
3.5	Tilastoanalyysit .....	4
4	Tulokset.....	5
4.1	Tutkimuspopulaation keskeiset taustatiedot.....	5
4.2	Alfaversiteetin ja FA-arvojen välinen korrelaatio .....	5
4.3	Beetaversiteetti ja FA-arvot .....	9
4.4	Bakteerisukujen yhteydet FA-arvoihin käyttäen DESeq2-työkalua .....	10
5	Pohdinta / päätelmät.....	12
5.1	Yhteenveto ja päätelmät .....	14
6	Lähteet.....	14

## 2 Johdanto

Suoliston mikrobiomi on noussut tärkeäksi tutkimuskohteeksi, kun on haluttu ymmärtää paremmin ihmisen kehitykseen ja terveyteen vaikuttavia biologisia mekanismeja. Tutkimusten mukaan mikrobiomi on yhteydessä immuunijärjestelmän ja aineenvaihdunnan säätelyn lisäksi myös hermoston kehitykseen (Mancini ym., 2023). Lapsuuden suoliston mikrobiomi näyttää olevan yhteydessä hermoston kehitykseen sekä epäsuorasti immuuni- ja hormonivälitteisten mekanismien kautta että suoremmin hermoston säätelyverkostojen kautta (Mancini ym., 2023).

Suolistomikrobiston ja aivojen kehittymisen yhteyksiä ja niiden mekanismeja ei vielä tunneta kattavasti. Suoliston mikrobiomi voi olla yhteydessä aivojen kehitykseen säätelemällä välittäjäaineiden, kuten serotoniinin ja gamma-aminovoihapon (GABA), tuotantoa. Suurin osa ihmisen serotoniinista muodostuu suolistossa. Tutkimuksissa on havaittu, että täysin mikrobittomissa (engl. germ-free) hiirissä veren serotoniinipitoisuus on huomattavasti matalampi kuin normaaleissa hiirissä (Fung ym., 2019). Lisäksi tutkimuksessa on havaittu, että suolistomikrobiston aineenvaihdunnan tuotteena syntyvä asetaatti pääsee siirtymään suolistosta vereen ja siten veri-aivoesteen yli aivoihin, jossa se voi lisätä GABA:n tuotantoa (Frost ym., 2014). Lisäksi mielenkiintoinen tutkinnan kohde on ollut kasvutekijä aivoperäinen neutrofinen tekijä (engl. brain-derived neurotrophic factor, BDNF). BDNF:n on todettu tukevan hermosolujen elossa pysymistä tyrosiinikinaasi B-reseptorin kautta sekä edistävän synapsien muovautuvuutta (Bathina & Das, 2015; Marin & Dadkhah, 2024). Suoliston dysbioosi, eli mikrobiston epätasapainotila, on yhdistetty alentuneisiin BDNF-pitoisuuksiin, mikä voi heikentää sekä synaptista plastisuutta että hermoston kehittymistä (Suda & Matsuda, 2022).

Yhdessä tutkimuksessa puolestaan havaittiin, että täysin mikrobittomilla porsailta esiintyi aivoissa alueita, joissa valkean aineen tilavuus oli pienempi kuin verrokeilla, joilla suolistomikrobisto oli normaali (Ahmed ym., 2021). Pienentynyt valkean aineen tilavuus havaittiin molemmissa tutkinnan kohteena olleissa alueissa, etuaivokuoren valkeassa aineessa (engl. prefrontal cortical white matter) ja aivokurkiaisessa (Ahmed ym., 2021). Lisäksi mikrobittomilla porsailta oligodendrogeneesi oli vähäisempää ja kypsien oligodendrosyyttien määrä oli pienempi (Ahmed ym., 2021). Löydöksissä oli sukupuolten välisiä eroja. Nämä tulokset viittaavat siihen, että suolistomikrobistolla on olennainen merkitys valkean aineen kehityksessä elämän alkuvaiheessa. Toisessa tutkimuksessa suolistomikrobiston koostumuksen on mikrobittomilla hiirillä havaittu olevan yhteydessä mikrogliasolujen kypsymiseen ja toimintaan (Erny ym., 2015). Mikrogliaat ovat tärkeitä turhien synapsien karsinnassa ja hermoverkkojen muovautumisessa.

Suoliston mikrobiomi voi olla yhteydessä aivojen kehitykseen myös säätelemällä hormonien, kuten kortisolin ja muiden stressihormonien tuotantoa. Tämä tapahtuu muun muassa hypotalamus-aivolisäke-lisämunuaisakselin (HPA) kautta (Sudo ym., 2004). HPA on tärkeä stressivasteen säätelyssä. Suoliston mikrobiomi voi olla yhteydessä myös veri-aivoesteen läpäisevyyteen. Esimerkiksi suolistomikrobiston aineenvaihduntatuotteena syntyvät lyhytketjuiset rasvahapot, kuten butyraatti, voivat vahvistaa veri-aivoestettä, mikä suojaa aivoja haitallisilta aineilta (Fock & Parnova, 2023; Leclercq ym., 2017). Suoliston mikrobiomi ja keskushermosto voivat kommunikoida myös suoremmin vagushermon välityksellä. Vagusherma välittää signaaleja suolistosta aivoihin ja aivoista suolistoon. Tämä hermoyhteys mahdollistaa nopean viestinnän suolistomikrobiston ja aivojen välillä ja se onkin keskeinen osa suoli-aivoakselin toimintaa (Bravo ym., 2011).

Aiemmat tutkimukset viittaavat suolistomikrobiston koostumuksen olevan yhteydessä kognitiiviseen kehitykseen (Carlson ym., 2018). Mikrobiston koostumuksella on havaittu olevan yhteys aivoalueiden rakenteelliseen kehittymiseen, vaikkakin rakenteelliset erot ovat olleet vähäisiä (Carlson ym., 2018). Eläinmalleissa suolistomikrobiston koostumuksen on havaittu olevan yhteydessä aivojen valkean aineen mikrorakenteisiin, erityisesti etuaivojen ja hypotalamuksen alueilla (Ong ym., 2018). Ihmisillä tehdyssä tutkimuksessa korkeammalla alfadiversiteetillä on havaittu olevan yhteys muun muassa heikentyneeseen yhteyteen etummaisesta pihitipoimusta ja insulan välillä (Gao ym., 2019).

Varhaislapsuuden suolistomikrobiston koostumus ja monimuotoisuus on yhdistetty myös lapsen temperamenttipiirteisiin, kuten itsesääteilyyn, myönteisten tunteiden ilmaisemiseen ja pelkoreaktion voimakkuuteen (Aatsinki ym., 2019). Häiriöt aivo-suoliakselin signaloinnissa voivat häiritä keskushermoston kehitystä. Useissa tutkimuksissa suolistomikrobiston koostumuksen on havaittu olevan yhteydessä neuropsykiatriisiin tiloihin, kuten autismikirjon häiriöön (Kang ym., 2013; Korteniemi ym., 2023), masennukseen (H. Jiang ym., 2015; Kelly ym., 2016) sekä tarkkaavaisuus- ja ylivilkkaushäiriöön (ADHD) (Aarts ym., 2017; H.-Y. Jiang ym., 2018). Suolistomikrobiston epätasapaino on myös liitetty moniin somaattisiin sairauksiin.

Erityistä kiinnostusta on herättänyt valkean aineen radastojen kehitys, sillä ne ovat keskeisiä hermoston informaation kulussa sekä aivotoimintojen ja -alueiden integroitumisessa. Fasciculus uncinatus (FU) on yksi tärkeä valkean aineen assosiaatorata. Se yhdistää limbisen järjestelmän rakenteita otsalohkon alaosiin. FU:n uskotaan olevan osallisena muistiin, päätöksentekoon ja tunnesääteilyyn osallistuvissa prosesseissa ja sen rakenteellisten poikkeavuuksien on todettu liittyvän neuropsykiatriisiin sairauksiin, kuten masennukseen ja ahdistuneisuuteen (Phan ym., 2009; Tromp ym., 2019; Xu ym., 2023). Vaikka FU:n merkitystä psyykkisessä kehityksessä on tutkittu, on sen kehityksen yhteydestä lapsuuden suoliston mikrobiomin koostumukseen vähän tietoa.

Tämä tutkimus tarkastelee, onko lapsuuden suoliston mikrobiomin koostumuksella yhteyttä FU:n mikrorakenteeseen viiden vuoden iässä. Tavoitteena on selvittää mikrobiston koostumuksen yhteys FU:n mikrorakenteen kehittyneisyyteen, kun sen rakennetta arvioidaan fraktionaalisen anisotropian (FA) avulla. FA kuvaa veden diffuusion suuntautuneisuutta aivokudoksessa ja se saa arvoja 0 ja 1 välillä. Mitä yhdensuuntaisemmin vesi diffuntoituu, sitä lähempänä FA on arvoa 1. FA-arvo kuvaa valkean aineen mikrorakennetta. Mitä korkeampi FA on, sitä suurempi on aksonien määrä, niiden tiheys ja myelinaation aste. Suolistomikrobiston koostumus analysoitiin alfa- ja beetadiversiteetin avulla. Alfadiversiteetti kuvaa lajiston monimuotoisuutta. Se kertoo montako lajia, tai esimerkiksi sukua, tietyssä näytteessä esiintyy ja millainen on lajien suhteellinen runsaus. Alfadiversiteetti mitattiin tässä tutkimuksessa Shannon-indeksillä ja havaittujen lajien runsaudella. Shannonin indeksi ottaa huomioon sekä lajien lukumäärän että niiden suhteellisen osuuden. Beetadiversiteetti kuvaa lajistollista eroa näytteiden välillä eli kuinka paljon näytteiden mikrobistot eroavat toisistaan.

Tutkimuksen tavoitteena on lisätä ymmärrystä suoliston ja aivojen kehityksen välisestä yhteydestä. Tämän tutkimuksen tavoitteena ei ole selvittää mekanismeja, joilla yhteys selittyy. Yhteyttä selvittävien mekanismien tutkiminen voisi olla hyvä jatkotutkimusten kohde. Tutkimuksen tuloksena odotetaan, että vauvaiän suoliston mikrobiomin koostumus ja monimuotoisuus ovat yhteydessä valkean aineen radaston, fasciculus uncinatus (FU), mikrorakenteeseen.

## 3 Aineisto ja menetelmät

### 3.1 Tutkimukseen osallistuneet henkilöt

Tutkimuksen osallistujat olivat osa FinnBrain-kohorttitutkimusta (Karlsson ym., 2018). Tutkimuspopulaatio koostui 147 lapsesta, jotka antoivat ulostenäytteet 2,5 kuukauden iässä ja osallistuivat onnistuneesti magneettikuvaukseen (MRI) 5 vuoden iässä. MRI-käynnit järjestettiin lokakuusta 2017 maaliskuuhun 2020. Tutkimuspopulaation keskeiset taustatiedot esitetään tulososion alussa.

Tutkimuksen poissulkukriteerit tutkimukseen osallistuneille olivat seuraavat: 1) vasta-aiheita MRI-kuvantamiselle, 2) syntymä ennen 35. raskausviikkoa, mikä perustui FinnBrain Cohort-tutkimuksen neonatologin suositukseen; syntymä ennen 32. raskausviikkoa lapsilla, jotka altistuivat äidin raskaudenaikaiselle synteettiselle glukokortikoidihoidolle, 3) merkittävä kehityshäiriö (esim. sydämen vajaatoiminta, sydänkirurgia, raajan puuttuminen, merkittävät perinnölliset sairaudet jne.), 4) muut pitkäaikaisdiagnoosit, jotka vaativat jatkuvaa kontaktia sairaalaan (esim. autismi, tarkkaavaisuushäiriö, epilepsia jne.), 5) aistivamma (esim. sokeus ja kuurous), 6) päivittäisen säännöllisen lääkityksen käyttö (astmainhalaattoreita käytettiin usein infektioiden yhteydessä eikä niitä pidetty poissulkemisperusteena), 7) vanhempien raportoima päävamma, joka vaati sairaalahoitoa. Lisäksi tietyt osallistujien ominaisuudet, kuten korvaputket (toistuvan välikorvatulehduksen hoito) tai suuret hammasraudat, estivät tutkimukseen osallistumisen.

### 3.2 Ulostedatan tiedonkeruu ja näytteiden analysointi

Ulostenäytteet kerättiin tutkittavilta 2,5 kuukauden iässä. Vanhemmille annettiin sekä suulliset että kirjalliset ohjeet ulostenäytteiden keräämisestä. Vanhemmat keräsivät kotona ulosteen steriileihin näyteputkiin, jotka he siirsivät välittömästi kotona jääkaappeihinsa. Ulostenäytteen oton jälkeen näyteputkiin kirjattiin näytteenottohetki. Vanhemmat kuljettivat näyteputket steriileissä kylmäpusseissa laboratorioon mahdollisimman nopeasti näytteenoton jälkeen. Ulostenäytteistä analysoitiin vain ne, jotka olivat saapuneet laboratorioon 48 tunnin kuluessa näytteenottohetkestä. Näytteenottoajankohdissa oli vaihtelua, joten analyysit korjattiin lapsen iän mukaan. Valmistajan protokollasta poiketen ulosteen bakteerisolujen hajotus tehtiin laittamalla helmiä näyteputkeen ja ravistelemalla eli tehtiin niin sanottu helmimurskaus (engl. bead-beating). DNA eristettiin puoliautomaattisella GXT Stool Extraction Kit VER 2.0 -menetelmällä (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Saksa). Mikrobiston koostumuksen selvittämiseksi hyödynnettiin 16S rRNA-geenin V4-alueen monistamista ja toisen sukupolven sekvensointia Illumina MiSeq -tekniikalla.

### 3.3 Magneettikuvausdatan tiedonkeruu

Tutkimukseen rekrytointi toteutettiin kahdella puhelinsoitolla. Ennen jokaista kuvauskäyntiä suoritettiin huolellinen valmisteluprotokolla. Osallistujille annettiin kotiin valmistautumisohteet suullisesti ja kirjallisesti, jotta lapsi voisi totuttua liikkumattomuuden tunteeseen ja magneettikuvauslaitteen ääniin sekä ymmärtäisi paikallaan pysymisen tärkeyden kuvantamisen aikana. Tutkimushoitaja teki kotikäynnin ja tapasi lapsen ennen kuvantamista. Kuvaukset

suoritettiin joko hereillä tai luonnollisen unen aikana. Neuroradiologi tarkasti kaikki magneettikuvat mahdollisten jatkotutkimusta vaativien löydösten havaitsemiseksi. Lastenneurologia konsultoitii tarvittaessa.

Magneettikuvaukset tehtiin Turun yliopistollisessa keskussairaalassa käyttäen Siemens Magnetom Skyra fit 3T-skanneria, johon oli kytketty 20-kanavainen pää- / kaulavastaaotinkela Siemens Medical Solutionsilta (Erlangen, Saksa). Kuvantamisen nopeuttamiseksi käytettiin tekniikkaa nimeltä GeneRalized Autocalibrating Partially Parallel Acquisition (GRAPPA), joka varmisti datan keräämisen tehokkuuden ja tarkkuuden.

Skannauksissa saatiin kattavasti MRI-dataa, mukaan lukien T1- ja T2-sekvenssit sekä diffuusiopainotteiset kuvat. Käyttämällä kahdesti kohdistettua Spin Echo-Echo Planar Imaging (SE-EPI) -tekniikkaa saatiin korkealaatuisia diffuusiopainotteisia kuvia. DTI-sekvenssit jaettiin lyhyempiin sarjoihin, mikä mahdollisti osallistujien tarvittaessa pitää taukoja skannausprosessin aikana. Tapauksissa, joissa merkittävä kuvantamisvirhe havaittiin välittömästi, yksittäiset sekvenssit olivat toistettavissa varmistaen siten datan eheyden ja luotettavuuden.

### 3.4 Kuva-analyysi

Data muutettiin NI fTI -muotoon ja esikäsiteltiin FSL 6.0 -ohjelmistolla (FMRIB-ohjelmistokirjasto, Oxfordin yliopisto, Iso-Britannia). Diffuusiokuvien laatua valvottiin käyttäen DTIprep:iä (<https://nitrc.org/projects/ditrep/>, versio 1.0.0) oletusasetuksilla. Hyväksytyt diffuusiogradientit käytiin vielä läpi visuaalisesti ja vääristyneet suunnat poistettiin manuaalisesti niiden lisäksi, jotka DTIprep valmiiksi hylkäsi. Liikkeen ja pyörrevirtojen korjaus sekä suuntavektorien kierto tehtiin FSL-työkalulla samanaikaisesti. Tämän jälkeen käytettiin FSL:n Tract-Based Spatial Statistics (TBSS) -työkalua valkoisen aineen radastojen runkojen arvioimiseen erikseen kullekin osajoukolle ja kuvien väliseen kohdistamiseen. Osajoukon edustavin FA-kuva valittiin kohdekuvaksi. Koehenkilöiden kuvantamisdatan perusteella muodostettiin keskimääräinen FA-runko ja tätä tutkimuskohtaista mallia sovellettiin FA-runkojen luomiseksi käyttämällä tyypillisesti FA-kynnysarvoa 0,2. Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin vain fasciculus uncinatus ja sen FA-arvoja.

### 3.5 Tilastoanalyysit

Tilastoanalyysien suorittamiseen käytettiin ohjelmaa nimeltä Rstudio (versio 4.2.0) ja sen paketteja ”Mia” (versio 1.4.0) ja ”TreeSummarizedExperiment” (versio 2.4.0).

Muuttujien normaalijakaumat analysoitiin visuaalisesti histogrammeista ja Q-Q-kuvaajalla sekä Shapiro-Wilk-testillä. Lineaariset regressioanalyysit tehtiin merkityksellisten muuttujien välillä selvittämään, onko niiden välillä yhteyttä. Alfadiversiteetti mitattiin Shannon-indeksillä ja havaittujen lajien runsaudella. FA-arvojen ja Shannon-indeksin sekä havaittujen lajien runsauden välistä korrelaatiota tarkasteltiin Pearsonin korrelaatiokertoimella (PCC).

Beetadiversiteetti mitattiin Principal Coordinate Analyysillä (PCoA) ASV-tason datalle käyttäen Bray-Curtisin erilaisuusmittaa, Jaccardin indeksiä ja Euklidista etäisyyttä. Euklidinen etäisyys analysoitiin myös pääjaksotason datalla. Beetadiversiteetin osalta tehtiin Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) -analyysi. Adonis-komentoa Vegan-paketista käytettiin

analysoimaan beetadiversiteetin yhteyttä FU:n FA-arvoihin. PERMANOVA suoritettiin käyttäen Bray-Curtis- ja Jaccard-indeksejä.

Yksittäisten bakteerisukujen pitoisuuksien yhteyksiä radastoihin tutkittiin Differential abundance -analyysillä (DAA). DAA on tilastollinen menetelmä, jolla voidaan analysoida yksittäisiä taksoneita ja analysoida eroaako niiden suhteellinen määrä näytteiden välillä. DAA suoritettiin käyttäen DESeq2-työkalua sukutasoisella datalla.

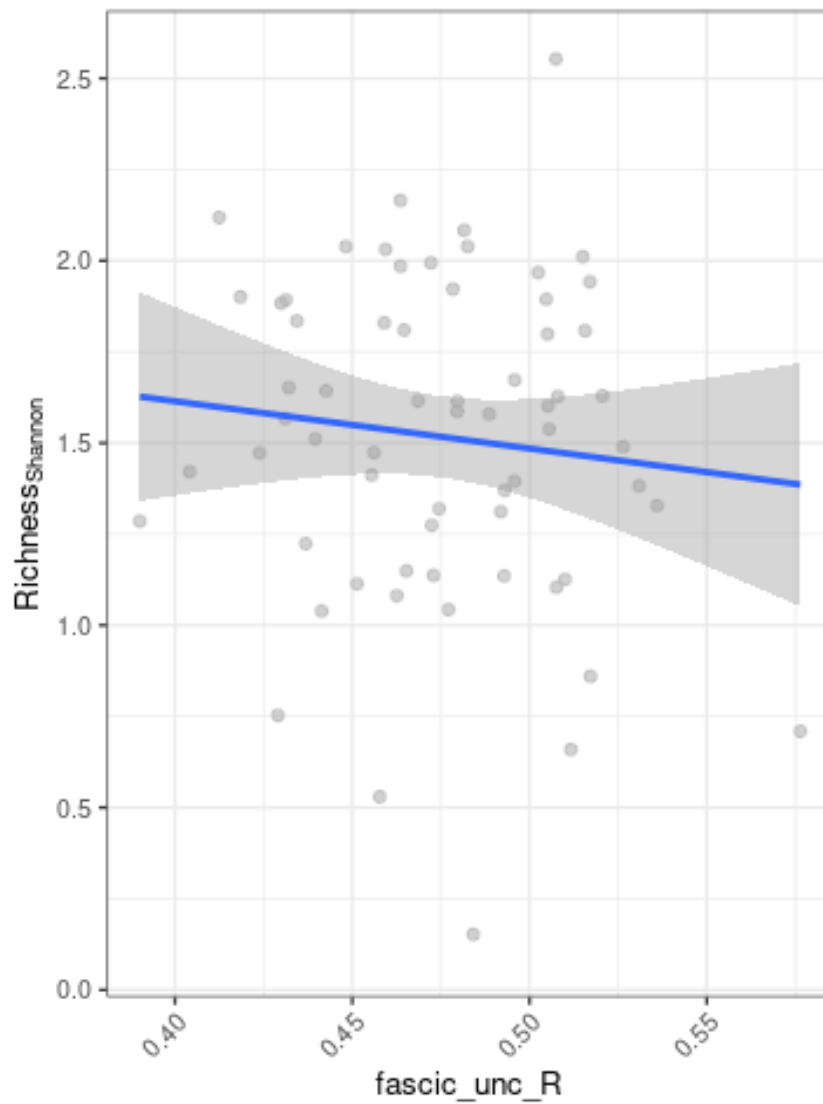
## 4 Tulokset

### 4.1 Tutkimuspopulaation keskeiset taustatiedot

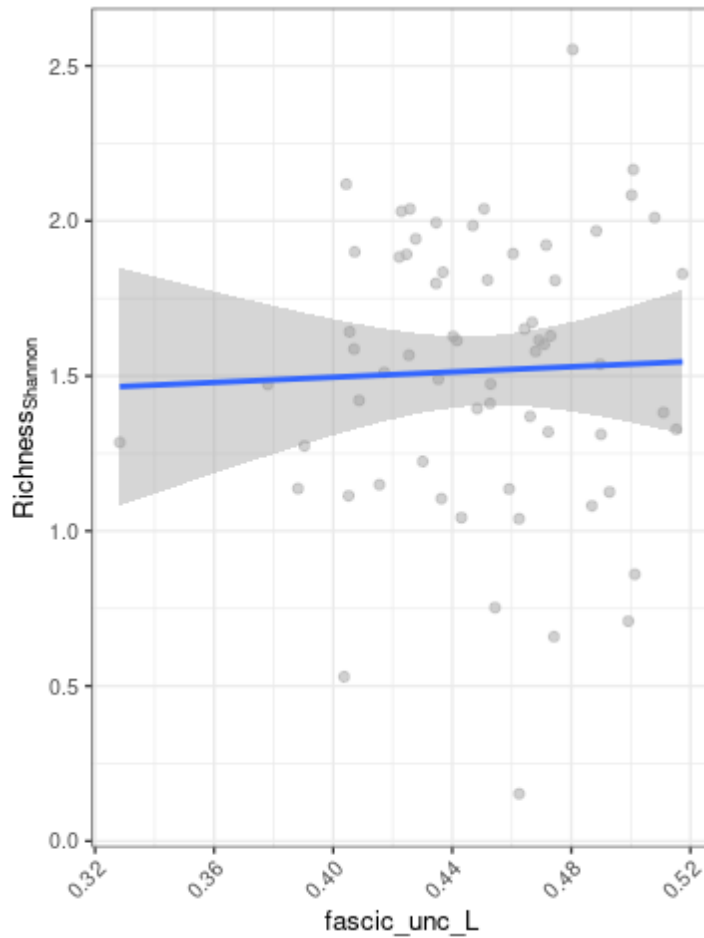
Tutkimuspopulaation sukupuolijakauma oli 78 (53,1%) poikaa ja 69 (46,9%) tyttöä. Tutkimukseen osallistuneiden keskimääräinen ikä raskausviikkoina syntymähetkellä oli 39,7 (keskihajonta (SD) 1,7). Tutkimuspopulaatiosta 118 (80,8%) syntyi alateitse ja 28 (19,2%) sektiolla. Syntymäpaino oli keskiarvoltaan 3 537g (SD 493g). Tutkimukseen osallistuneiden lasten äitien ikien keskiarvo syntymähetkellä oli 30,3 vuotta (SD 4,8 vuotta). Äitien koulutustaso oli saatavilla 141 lapsen osalta. Koulutustaso jaoteltiin kolmeen luokkaan seuraavasti: matala koulutustaso (n = 35) (24,8%), ammatillinen tai lukiotasoinen koulutus (n = 38) (27,0%) ja korkeakoulutus (n = 68) (48,2%). Raskauden aikana äideistä 139 (94,6%) ei tupakoinut ollenkaan, 6 (4,1%) tupakoi vain raskauden alussa ja 2 (1,4%) tupakoi sekä raskauden alussa että lopussa.

### 4.2 Alfadiversiteetin ja FA-arvojen välinen korrelaatio

Pearsonin korrelaatio oikean fasciculus uncinatuksen (FU) FA-arvojen ja Shannon-indeksin välillä oli -0,11 (p-arvo = 0,41) (kuva 1). Korrelaatio vasemman FU:n FA-arvon ja Shannon-indeksin välillä oli 0,035 (p-arvo = 0,78) (kuva 2).

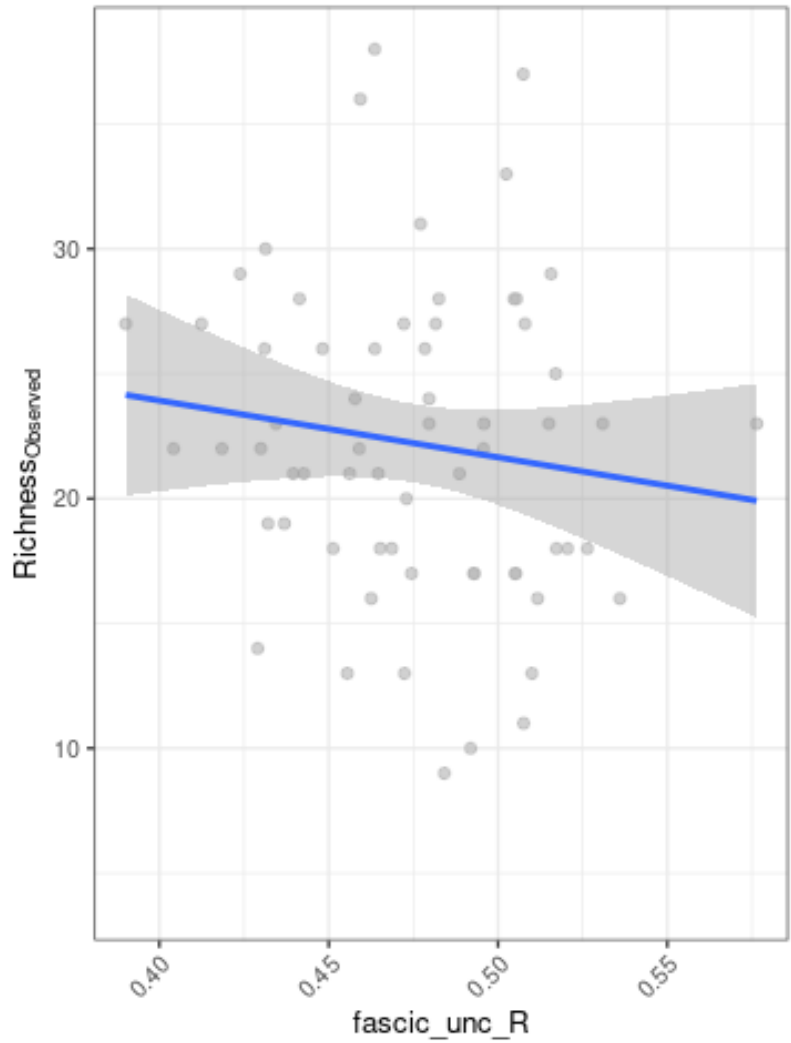


Kuva 1: Pearsonin korrelaatio oikean fasciculus uncinatuksen (FU) FA-arvojen ja Shannon-indeksin ( $Richness_{Shannon}$ ) välillä. `fascic_unc_R` tarkoittaa oikean FU:n FA-arvoja.

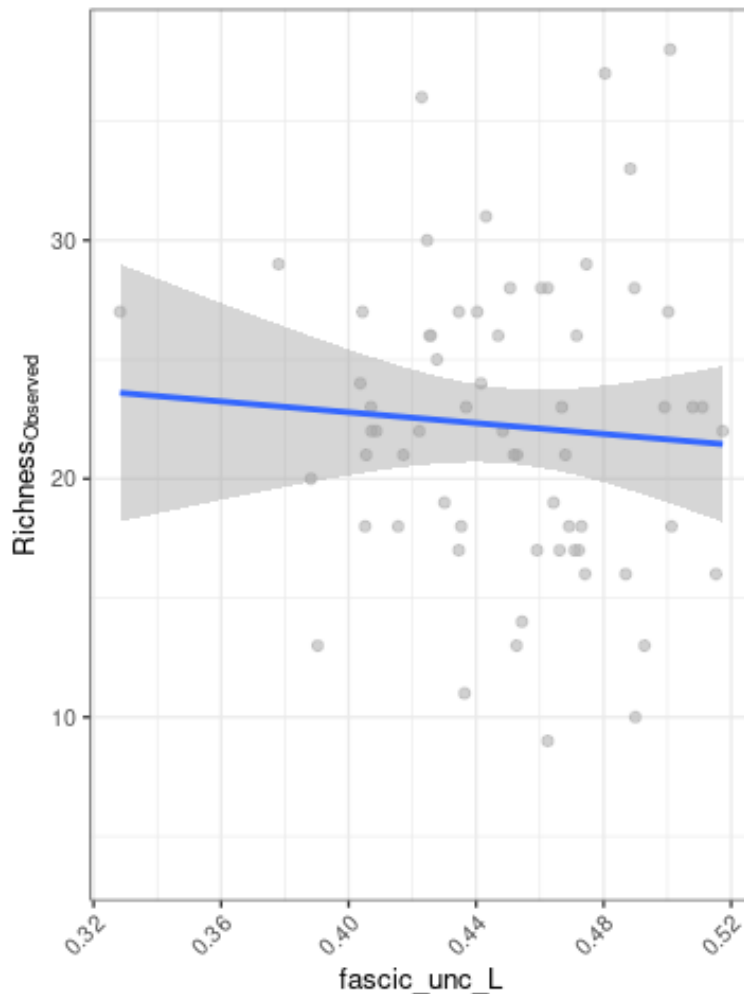


Kuva 2: Pearsonin korrelaatio vasemman fasciculus uncinatus (FU) FA-arvojen ja Shannon-indeksin ( $Richness_{Shannon}$ ) välillä. `fascic_unc_L` tarkoittaa vasemman FU:n FA-arvoja.

Pearsonin korrelaatio oikean FU:n FA-arvon ja havaittujen lajien runsauden välillä oli 0,13 (p-arvo = 0,30) (kuva 3). Korrelaatio vasemman FU:n FA-arvon ja havaittujen lajien runsauden välillä oli -0,068 (p-arvo = 0,59) (kuva 4)



Kuva 3: Pearsonin korrelaatio oikean FU:n FA-arvon ja havaittujen lajien runsauden ( $Richness_{Observed}$ ) välillä. `fascic_unc_R` tarkoittaa oikean FU:n FA-arvoja



Kuva 4: Pearsonin korrelaatio vasemman FU:n FA-arvon ja havaittujen lajien runsauden ( $Richness_{Observed}$ ) välillä.  $fascic\_unc\_L$  tarkoittaa vasemman FU:n FA-arvoja.

### 4.3 Beetadiversiteetti ja FA-arvot

$R^2$  on regressiomallin selitysosuus ja se ilmaisee kuinka suuren osan selittävän muuttujan vaihtelusta regressioanalyysin selittävät muuttujat voivat selittää. Sen arvot vaihtelevat välillä 0 – 1,0. Kun  $R^2$  on suuri, selittävät muuttujat selittävät suuren osan vaihtelusta. Jos se taas on pieni, selittävät muuttujat selittävät vain vähän selittävän muuttujan vaihtelusta.

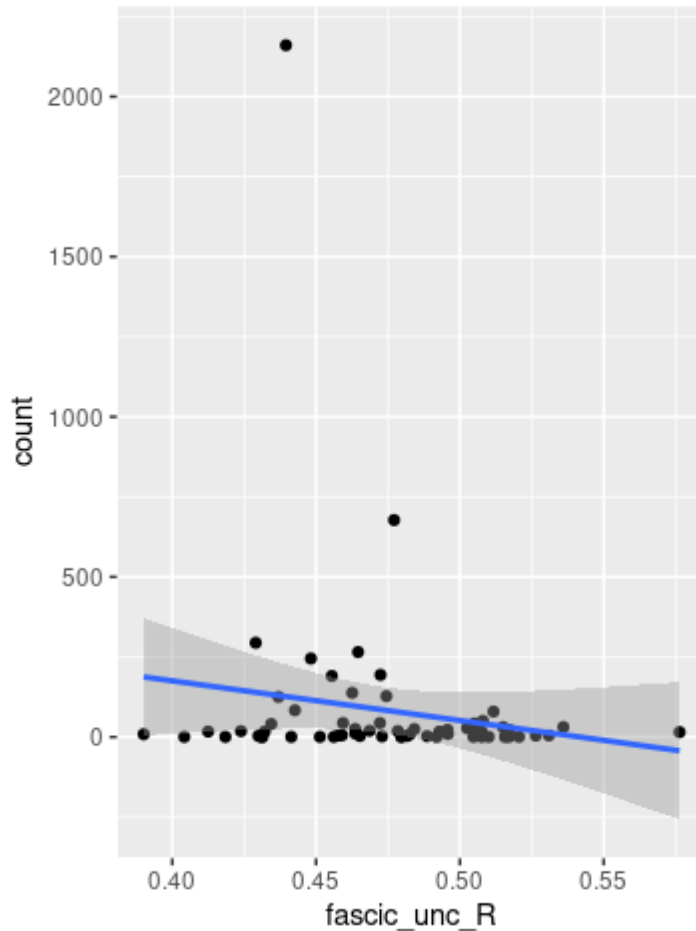
Oikean puolen FU:n PERMANOVA:n tulos Bray-Curtisin indeksillä oli  $R^2$  0,0096 (p-arvo = 0,90). Vasemman puolen osalta PERMANOVA:n tulos Bray-Curtisin indeksillä oli  $R^2$  0,017 (p-arvo = 0,37).

#### 4.4 Bakterisukujen yhteydet FA-arvoihin käyttäen DESeq2-työkalua

Staphylococcus-bakteerisuvun runsauden ja oikean FU:n FA-arvojen välillä oli heikko negatiivinen yhteys (p-arvo = 0,0035, Log<sub>2</sub> fold change -30,0, mutta korjattu p-arvo = 0,13, kuvat 5 ja 6). Log<sub>2</sub> fold change, lyhyesti kertamuunnos, kertoo kuinka paljon jonkin bakteerisuvun määrä kasvaa tai vähenee näytteiden välillä.

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
Staphylococcus	82.51652	-30.000000	10.27059	-2.9209626	0.0034895	0.1326017
Clostridium	26983.36942	-30.000000	14.51248	-2.0671867	0.0387166	0.4904098
Prevotella	90.80282	-30.000000	13.97270	-2.1470434	0.0317898	0.4904098
Unidentified_Genus.1	849.20037	-30.000000	16.75372	-1.7906475	0.0733499	0.6968239
Escherichia	37925.65551	11.889710	15.96771	0.7446095	0.4565078	0.8603412
Bifidobacterium	25604.13567	-3.801667	9.45435	-0.4021077	0.6876048	0.8603412

Kuva 5: baseMean tarkoittaa keskimääräistä havaittua määrää kaikista näytteistä kyseiselle bakteerisuvulle. LfcSE tarkoittaa logfolds standard erroria. stat tarkoittaa testisuuretta, joka lasketaan  $\log_2\text{FoldChange} / \text{lfcSE}$ . Mitä suurempi stat:in itseisarvo on, sitä luotettavampi  $\log_2\text{FoldChange}$  on. Pvalue tarkoittaa p-arvoa ja padj tarkoittaa korjattua p-arvoa.

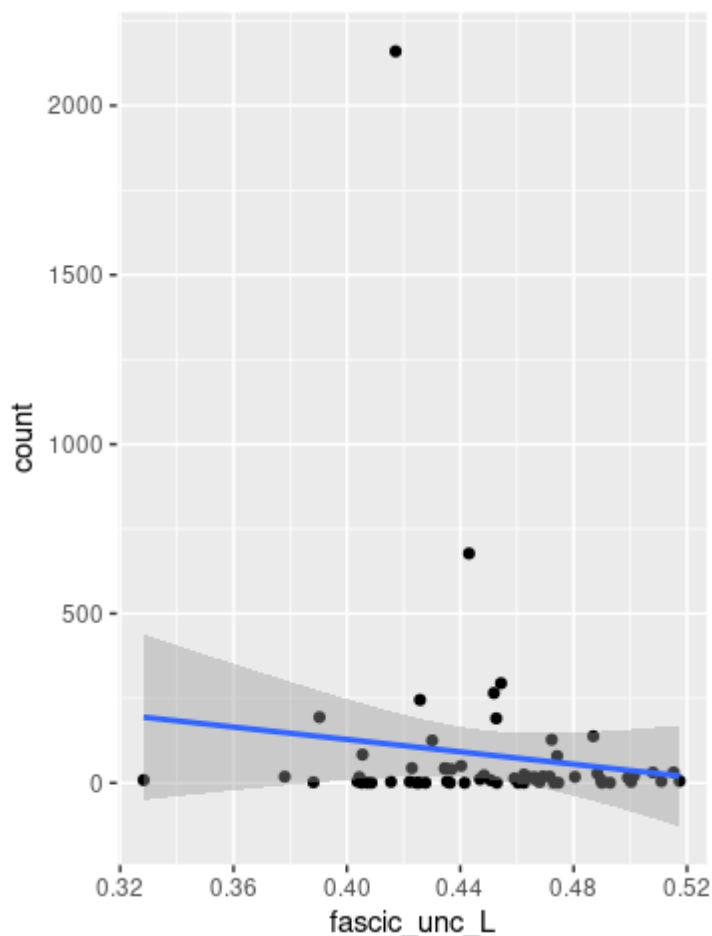


Kuva 6: Staphylococcus-bakteerisuvun runsauden (count) ja oikean FU:n FA-arvojen välinen yhteys. fascic\_unc\_R tarkoittaa oikean FU:n FA-arvoja.

Staphylococcus-bakteerisuvun runsauden ja vasemman FU:n FA-arvojen välillä oli heikko negatiivinen yhteys (p-arvo = 0,0032). Log2FoldChange oli -29,91, mutta korjattu p-arvo oli 0,12 (kuvat 7 ja 8)

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
Staphylococcus	82.51652	-29.91263	10.15064	-2.946872	0.0032101	0.1219822
Unidentified_Genus	4570.78091	-30.00000	14.34830	-2.090840	0.0365424	0.2958465
Prevotella	90.80282	-28.69724	13.89726	-2.064956	0.0389272	0.2958465
Bacteroides	106208.23808	30.00000	13.63903	2.199570	0.0278374	0.2958465
Clostridium	26983.36942	30.00000	13.82997	2.169201	0.0300674	0.2958465
Escherichia	37925.65551	26.85858	15.14721	1.773170	0.0762005	0.4350084

Kuva 7: baseMean tarkoittaa keskimääräistä havaittua määrää kaikista näytteistä kyseiselle bakteerisuvulle. LfcSE tarkoittaa logfolds standard erroria. stat tarkoittaa testisuuretta, joka lasketaan  $\log_2\text{FoldChange} / \text{lfcSE}$ . Mitä suurempi stat:in itseisarvo on, sitä luotettavampi log2FoldChange on. Pvalue tarkoittaa p-arvoa ja padj tarkoittaa korjattua p-arvoa.



Kuva 8: Staphylococcus-bakteerisuvun runsauden (count) ja vasemman FU:n FA-arvojen välinen yhteys. fascic\_unc\_L tarkoittaa vasemman FU:n FA-arvoja.

## 5 Pohdinta / päätelmät

Suolistomikrobiston ja keskushermoston kehityksen välisen yhteyden tutkiminen on tällä hetkellä vielä suuri tieteellinen haaste. Eläintutkimukset ovat ehdottaneet, että suolistomikrobisto on yhteydessä myelinaatioon ja aivojen valkean aineen kehitykseen (Ahmed ym., 2021; Ong ym., 2018). Aiemmissä tutkimuksissa ihmisillä lapsuuden suoliston mikrobiomin monimuotoisuuden on havaittu liittyvän aivojen valkean aineen tilavuuteen ja kehitykseen lapsuudessa (Gao ym., 2019).

Tässä tutkimuksessa pyrittiin selvittämään, löytyykö suolistomikrobiston koostumuksen ja valkean aineen radaston, fasciculus uncinatuksen (FU), välillä yhteyttä lapsilla. Tutkimuksen tuloksena saatiin, että suolistomikrobiston diversiteetti ei ole yhteydessä FU:n FA-arvoihin, mutta Staphylococcus-bakteerisuvun runsauden ja FU:n FA-arvojen välillä löytyi heikko negatiivinen yhteys.

Alfadiiversiteetin ja FU:n FA-arvojen välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota. Aiemmassa tutkimuksessa ihmisillä havaittiin positiivinen yhteys alfadiiversiteetin ja valkean aineen toiminnallisten yhteyksien välillä (Gao ym., 2019). Toisessa aiemmassa tutkimuksessa havaittiin alfadiiversiteetin ja kognitiivisen prosessointinopeuden välillä olevan positiivinen yhteys kasvuhormonipuutteisilla lapsilla (Wang ym., 2024). Aiemmissä tutkimuksissa ei ole analysoitu

alfadiversiteetin yhteyttä valkean aineen mikrorakenteen kehittyneisyyttä kuvaaviin FA-arvoihin. Beetadiversiteetin ja FA-arvojen välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota tässä tutkimuksessa. Beetadiversiteetin ja FA-arvojen välisestä yhteydestä ei löydy aiempaa dataa.

Staphylococcus-bakteerisuvun runsauden ja FU:n FA-arvojen välillä löytyi heikko negatiivinen yhteys. Muiden bakteerisukujen ja FA-arvojen välillä ei todettua heikohkoakaan yhteyttä tässä tutkimuksessa. Aiempaa tutkimusta, jossa tutkittaisiin suolistomikrobiston sukutasoisen datan yhteyttä aivojen kehittymiseen terveillä lapsilla ei ole tehty.

Suolistomikrobiston normaaliflooraan kuuluvat Staphylococcus-suvun bakteerit pystyvät syntetisoimaan aromaattista aminohappodekarboksylaasi-entsyymiä (SadA), joka tuottaa dopamiinia ja serotoniinia niiden esiasteista (Luqman ym., 2018). Tämä viittaa mahdolliseen Staphylococcus-bakteerisuvun yhteyteen isännän hermovälittäjäainejärjestelmiin (Luqman ym., 2018). Dopamiinin on todettu säätelevän immuunisolujen toimintaa ja olevan yhteydessä mikrogliasolujen liikkeeseen, mikä saattaa olla yhteydessä neuroinflammatorisiin prosesseihin ja tätä kautta liittyä aivojen rakenteeseen ja kehitykseen (Färber ym., 2005; Sarkar ym., 2010).

Suolistomikrobiston Staphylococcus-suvun bakteerien yhteyttä neuropsykiatrisiin sairauksiin tai tiloihin ei ole tutkittu ihmisillä. Viimeaikainen TGR5-puutteisilla hiirimalleilla tehty tutkimus on antanut viitteitä, että Staphylococcus-suvun bakteerien lisääntynyt määrä suolistossa on yhteydessä alentuneisiin serotoniinitasoihin sekä masennus- ja ahdistustyyppiseen käyttäytymiseen (Tao ym., 2024). Tämä viittaa mahdolliseen yhteyteen aivojen välittäjäainejärjestelmien säätelyssä. Myös metaboliset tai immunologiset mekanismit voivat olla mahdollisia. Viimeaikaisessa hyvin ennenaikaisesti syntyneillä lapsilla tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että aivojen valkean aineen vauriosta kärsivillä lapsilla suolistossa esiintyi runsaammin Staphylococcus-suvun bakteereja (Liu ym., 2023). Löydös viittaa yhteyteen suolistomikrobiston epätasapainon ja aivojen valkean aineen kehityshäiriöiden välillä.

Tutkimuksen vahvuutena oli se, että tutkimus perustuu laajaan ja hyvin karakterisoituun väestöpohjaiseen FinnBrain syntymäkohorttiin, mikä lisää tulosten luotettavuutta ja mahdollistaa kontrollin useille sekoittaville tekijöille. Näytteet on kerätty varhaisessa iässä (2,5 kuukautta), jolloin mikrobiomi heijastaa kehityksellisesti herkkiä vaiheita. Aivokuvantaminen on tehty yhdenmukaisesti viiden vuoden iässä, mahdollistaen ajallisen yhteyden arvioinnin. Tutkimus hyödyntää kvantitatiivista DTI-pohjaista FA-mittausta tarkkaan rajatusta valkean aineen radastosta (FU), joka on biologisesti perusteltu alue kognitiivisen kehityksen kannalta.

Tutkimuksen heikkoutena on muun muassa se, että FA on epäsuora mittari valkean aineen rakenteesta, eikä se yksinään pysty erottamaan eri mikrorakenteellisia muutoksia (esim. myelinaatio vs. aksonitiehys), mikä rajoittaa löydösten tulkintaa. Otokoko on kohtalainen, mutta kun otetaan huomioon mikrobiomin suuri biologinen vaihtelu, suurempi kohortti olisi lisännyt analyyysien tilastollista voimaa. Tutkimuksen havainnollinen asetelma ei mahdollista täysin varmaa kausaalisuhteiden arviointia mikrobiomin ja aivojen kehityksen välillä. Tutkimusasetelman luonteen vuoksi ei voida varmaksi sanoa, että mikrobiomi aiheuttaisi muutoksia aivojen kehityksessä. On mahdollista, että havaittu yhteys johtuu jostain kolmannesta tekijästä, joka voi olla esimerkiksi ympäristö, perimä tai muu biologinen tekijä, eikä mikrobiomi välttämättä ole syy, vaan vain samanaikainen biologista tekijöistä tai ympäristötekijöistä johtuva ilmiö.

Tutkimuksen tuloksena saatiin yksi heikko yhteys *Staphylococcus*-suvun bakteerien ja FA-arvojen välillä. Se jäi lopulta tilastollisesti merkityksettömäksi korjatun p-arvon myötä. Kyseessä voisi olla väärä positiivinen. Heikkoutena myös se, että analyysissä käytössä oli vain yksi työkalu.

Mahdollisia jatkoanalyysimahdollisuuksia on useita ja niiden toteuttaminen voisi tuoda esiin erilaisia, tilastollisesti merkitseviäkin tuloksia. Tutkimusaineisto voitaisiin analysoida erikseen sukupuolittain. Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet huomattavia eroja 5-v lasten valkeassa aineessa sukupuolten välillä (Kumpulainen ym., 2023). Sukupuolittainen tarkastelu voisi paljastaa yhteyksiä, jotka jäävät piiloon koko aineiston tasolla. Sukupuolittain tehdyt jatkoanalyysit voisivat olla hyvä jatkotutkimusten kohde. Tutkimuksessa löytyi yksi heikko korrelaatio *Staphylococcus*-suvun ja FU:n FA-arvojen välillä, joten tämä suku voisi toimia kiinnostavana mikrobistomarkkerina ja sitä voitaisiin käyttää regressioanalyysissä. Muita jatkoanalyysimahdollisuuksia voisivat olla erilaiset beetadiversiteettiä kuvaavat muuttujat. Näitä voisivat olla pääkomponenttianalyysin (PCoA) kaksi ensimmäistä dimensiota, jotka selittävät merkittävän osuuden mikrobiston vaihtelusta. Ne voisivat toimia hyvinä selittävinä muuttujina regressiomalleissa.

Aineistokoon rajallisuus voi osittain selittää löydösten niukkuuden. Yksinkertaisen korrelaatioanalyysin sijaan voitaisiin käyttää regressioanalyysiä, jossa suoraan DTI-datasta voitaisiin arvioida korrelaatioita suoliston mikrobiomin ja koko aivojen alueelta. Tämä voisi auttaa löytämään mahdollisia assosiaatioita laajemmin ja tarkemmin. Jos tästä löytyisi yksittäinen assosioituva radasto, tätä voitaisiin käyttää jatkossa suhteessa esimerkiksi suolistomikrobiston tuottamiin aineenvaihduntatuotteisiin. Näistä aineenvaihduntatuotteista voitaisiin löytää mahdollisesti mekanismiin perustuva hypoteesi ja valita jokin kandidaattimetaboliitti jatkoanalyysiin.

## 5.1 Yhteenveto ja päätelmät

Suolistomikrobiston koostumuksella ja keskushermoston kehityksellä on aiempien tutkimusten valossa yhteys. Keskushermoston ja suolistomikrobiston yhteys toisiinsa tapahtuu useamman eri monimutkaisen reitin kautta. Lisäksi useat ympäristötekijät ovat yhteydessä sekä suolistomikrobistoon, että keskushermoston kehittymiseen.

Tässä tutkimuksessa ei saatu tilastollisesti merkitsevää tulosta suolistomikrobiston ja keskushermoston kehityksen välisestä yhteydestä, vaikkakin *Staphylococcus*-suvun pitoisuuden ja FA-arvojen välillä oli yhteys. Ei ole varmuutta oliko todettu yhteys väärä positiivinen löydös. Jatkoanalyysimahdollisuuksia on kuitenkin monia ja niiden toteuttaminen voisi tuoda arvokasta, kliinisestikin merkityksellistä, lisätietoa suoli-aivoakselin toiminnasta.

## 6 Lähteet

Aarts, E., Ederveen, T. H. A., Naaijen, J., Zwiers, M. P., Boekhorst, J., Timmerman, H. M.,

Smeekens, S. P., Netea, M. G., Buitelaar, J. K., Franke, B., van Hijum, S. A. F. T., & Arias

Vasquez, A. (2017). Gut microbiome in ADHD and its relation to neural reward anticipation.

*PLoS One*, 12(9), e0183509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183509>

- Aatsinki, A.-K., Lahti, L., Uusitupa, H.-M., Munukka, E., Keskitalo, A., Nolvi, S., O'Mahony, S., Pietilä, S., Elo, L. L., Eerola, E., Karlsson, H., & Karlsson, L. (2019). Gut microbiota composition is associated with temperament traits in infants. *Brain, Behavior, and Immunity*, *80*, 849–858. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.035>
- Ahmed, S., Travis, S. D., Díaz-Bahamonde, F. V., Porter, D. D. L., Henry, S. N., Mykins, J., Ravipati, A., Booker, A., Ju, J., Ding, H., Ramesh, A. K., Pickrell, A. M., Wang, M., LaConte, S., Howell, B. R., Yuan, L., & Morton, P. D. (2021). Early Influences of Microbiota on White Matter Development in Germ-Free Piglets. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*, 807170. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.807170>
- Bathina, S., & Das, U. (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of Medical Science : AMS*, *11*(6). <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56342>
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(38), 16050–16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>
- Carlson, A. L., Xia, K., Azcarate-Peril, M. A., Goldman, B. D., Ahn, M., Styner, M. A., Thompson, A. L., Geng, X., Gilmore, J. H., & Knickmeyer, R. C. (2018). Infant Gut Microbiome Associated with Cognitive Development. *Biological psychiatry*, *83*(2), 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.06.021>
- Erny, D., Angelis, A. L. H. de, Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Mhlahkoi, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Utermöhlen, O., Chun, E., Garrett, W. S., McCoy, K. D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I., & Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*, *18*(7), 965. <https://doi.org/10.1038/nn.4030>

- Fock, E., & Parnova, R. (2023). Mechanisms of Blood-Brain Barrier Protection by Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids. *Cells*, *12*(4), 657. <https://doi.org/10.3390/cells12040657>
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J. R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Thomas, E. L., & Bell, J. D. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications*, *5*, 3611. <https://doi.org/10.1038/ncomms4611>
- Fung, T. C., Vuong, H. E., Luna, C. D. G., Pronovost, G. N., Aleksandrova, A. A., Riley, N. G., Vavilina, A., McGinn, J., Rendon, T., Forrest, L. R., & Hsiao, E. Y. (2019). Intestinal serotonin and fluoxetine exposure modulate bacterial colonization in the gut. *Nature microbiology*, *4*(12), 2064–2073. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0540-4>
- Färber, K., Pannasch, U., & Kettenmann, H. (2005). Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *29*(1), 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.01.003>
- Gao, W., Salzwedel, A. P., Carlson, A. L., Xia, K., Azcarate-Peril, M. A., Styner, M. A., Thompson, A. L., Geng, X., Goldman, B. D., Gilmore, J. H., & Knickmeyer, R. C. (2019). Gut microbiome and brain functional connectivity in infants-a preliminary study focusing on the amygdala. *Psychopharmacology*, *236*(5), 1641–1651. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5161-8>
- Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., Wang, W., Tang, W., Tan, Z., Shi, J., Li, L., & Ruan, B. (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, *48*, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.03.016>

- Jiang, H.-Y., Zhou, Y.-Y., Zhou, G.-L., Li, Y.-C., Yuan, J., Li, X.-H., & Ruan, B. (2018). Gut microbiota profiles in treatment-naïve children with attention deficit hyperactivity disorder. *Behavioural Brain Research*, *347*, 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.03.036>
- Kang, D.-W., Park, J. G., Ilhan, Z. E., Wallstrom, G., LaBaer, J., Adams, J. B., & Krajmalnik-Brown, R. (2013). Reduced Incidence of Prevotella and Other Fermenters in Intestinal Microflora of Autistic Children. *PLoS ONE*, *8*(7), e68322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068322>
- Karlsson, L., Tolvanen, M., Scheinin, N. M., Uusitupa, H.-M., Korja, R., Ekholm, E., Tuulari, J. J., Pajulo, M., Huotilainen, M., Paunio, T., Karlsson, H., & FinnBrain Birth Cohort Study Group. (2018). Cohort Profile: The FinnBrain Birth Cohort Study (FinnBrain). *International Journal of Epidemiology*, *47*(1), 15–16j. <https://doi.org/10.1093/ije/dyx173>
- Kelly, J. R., Borre, Y., O’ Brien, C., Patterson, E., El Aidy, S., Deane, J., Kennedy, P. J., Beers, S., Scott, K., Moloney, G., Hoban, A. E., Scott, L., Fitzgerald, P., Ross, P., Stanton, C., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2016). Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *Journal of Psychiatric Research*, *82*, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.07.019>
- Korteniemi, J., Karlsson, L., & Aatsinki, A. (2023). Systematic review: Autism spectrum disorder and the gut microbiota. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *148*(3), 242–254. <https://doi.org/10.1111/acps.13587>
- Kumpulainen, V., Merisaari, H., Silver, E., Copeland, A., Pulli, E. P., Lewis, J. D., Saukko, E., Shulist, S. J., Saunavaara, J., Parkkola, R., Lähdesmäki, T., Karlsson, L., Karlsson, H., & Tuulari, J. J. (2023). Sex differences, asymmetry, and age-related white matter development in infants and 5-year-olds as assessed with tract-based spatial statistics. *Human Brain Mapping*, *44*(7), 2712–2725. <https://doi.org/10.1002/hbm.26238>

- Leclercq, S., Mian, F. M., Staniszl, A. M., Bindels, L. B., Cambier, E., Ben-Amram, H., Koren, O., Forsythe, P., & Bienenstock, J. (2017). Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nature Communications*, 8, 15062. <https://doi.org/10.1038/ncomms15062>
- Liu, L., Xiang, M., Cai, X., Wu, B., Chen, C., Cai, N., & Ao, D. (2023). Multi-omics analyses of gut microbiota via 16S rRNA gene sequencing, LC-MS/MS and diffusion tensor imaging reveal aberrant microbiota-gut-brain axis in very low or extremely low birth weight infants with white matter injury. *BMC Microbiology*, 23(1), 387. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03103-5>
- Luqman, A., Nega, M., Nguyen, M.-T., Ebner, P., & Götz, F. (2018). SadA-Expressing Staphylococci in the Human Gut Show Increased Cell Adherence and Internalization. *Cell Reports*, 22(2), 535–545. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.058>
- Mancini, V. O., Brook, J., Hernandez, C., Strickland, D., Christophersen, C. T., D’Vaz, N., Silva, D., Prescott, S., Callaghan, B., Downs, J., & Finlay-Jones, A. (2023). Associations between the human immune system and gut microbiome with neurodevelopment in the first 5 years of life: A systematic scoping review. *Developmental Psychobiology*, 65(2), e22360. <https://doi.org/10.1002/dev.22360>
- Matin, S., & Dadkhah, M. (2024). BDNF/CREB signaling pathway contribution in depression pathogenesis: A survey on the non-pharmacological therapeutic opportunities for gut microbiota dysbiosis. *Brain Research Bulletin*, 207, 110882. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2024.110882>
- Ong, I. M., Gonzalez, J. G., McIlwain, S. J., Sawin, E. A., Schoen, A. J., Adluru, N., Alexander, A. L., & Yu, J.-P. J. (2018). Gut microbiome populations are associated with structure-specific changes in white matter architecture. *Translational Psychiatry*, 8(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41398-017-0022-5>

- Phan, K. L., Orlichenko, A., Boyd, E., Angstadt, M., Coccaro, E. F., Liberzon, I., & Arfanakis, K. (2009). Preliminary evidence of white matter abnormality in the uncinate fasciculus in generalized social anxiety disorder. *Biological Psychiatry*, *66*(7), 691–694.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.02.028>
- Sarkar, C., Basu, B., Chakroborty, D., Dasgupta, P. S., & Basu, S. (2010). The immunoregulatory role of dopamine: An update. *Brain, Behavior, and Immunity*, *24*(4), 525–528.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.10.015>
- Suda, K., & Matsuda, K. (2022). How Microbes Affect Depression: Underlying Mechanisms via the Gut-Brain Axis and the Modulating Role of Probiotics. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1172. <https://doi.org/10.3390/ijms23031172>
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., Kubo, C., & Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *The Journal of Physiology*, *558*(Pt 1), 263.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>
- Tao, Y., Zhou, H., Li, Z., Wu, H., Wu, F., Miao, Z., Shi, H., Huang, F., & Wu, X. (2024). *TGR5* deficiency-induced anxiety and depression-like behaviors: The role of gut microbiota dysbiosis. *Journal of Affective Disorders*, *344*, 219–232.  
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2023.10.072>
- Tromp, D. P. M., Williams, L. E., Fox, A. S., Oler, J. A., Roseboom, P. H., Rogers, G. M., Benson, B. E., Alexander, A. L., Pine, D. S., & Kalin, N. H. (2019). Altered Uncinate Fasciculus Microstructure in Childhood Anxiety Disorders in Boys But Not Girls. *The American Journal of Psychiatry*, *176*(3), 208–216. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2018.18040425>
- Wang, K., Fu, Y., Li, L., Zhang, L., Huang, M., Yan, W., Shan, X., Yan, Z., & Lu, Y. (2024). Gut Microbiota Moderates Multimodal Brain Structure-Function Integration and Behavioral

Cognition in Growth Hormone Deficient Children. *Neuroendocrinology*, 114(7), 698–708.

<https://doi.org/10.1159/000539097>

Xu, E. P., Nguyen, L., Leibenluft, E., Stange, J. P., & Linke, J. O. (2023). A meta-analysis on the uncinat fasciculus in depression. *Psychological Medicine*, 53(7), 2721–2731.

<https://doi.org/10.1017/S0033291723000107>