

Aralıklı Oruç ile Birlikte Genç Kan Plazma Uygulamasının Yaşlı Bağırsak Mikrobiyotası Üzerindeki Etkileri



*Makale Bilgisi / Article Info

Alındı/Received: 06.03.2024

Kabul/Accepted: 03.09.2024

Yayımlandı/Published: xx.xx.xxxx

Effects of Intermittent Fasting Combined With Young Blood Plasma Administration on Aged Gut Microbiota

Hüseyin ALLAHVERDİ^{1*} , Burcu BABA² 

¹ Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Muş, Türkiye

² Yüksek İhtisas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü, Ankara, Türkiye



© Afyon Kocatepe Üniversitesi

© 2025 The Authors | Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 (CC BY-NC) International License

Öz

Yaşlanma süreci, bağırsak mikrobiyotasının disbiyozisine ve bu durumun çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmesine neden olmaktadır. Bu bağlamda, aralıklı oruç ve genç kan plazması transfüzyonunun, senesens hücrelerinin yenilenmesi üzerindeki etkileri literatürde önem arz etmektedir. Mevcut çalışma, yaşlanma bağlamında bu iki müdahalenin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki kümülatif etkilerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Araştırma, 24 aylık erkek Sprague-Dawley ratlar üzerinde gerçekleştirilmiş olup, 30 günlük bir aralıklı oruç protokolü esnasında genç kan plazması transfüzyonunun mikrobiyota üzerindeki etkilerini incelemiştir. Dört farklı grup tanımlanmıştır: kontrol (Cnt, n=7), yalnızca aralıklı oruç tutanlar (Fst, n=7), sadece genç plazma transfüzyonu alanlar (Pls, n=7), ve hem aralıklı oruç tutan hem de genç plazma transfüzyonu alanlar (FstPls, n=7). Aralıklı oruç rejiminde, ratlara günde 18 saat boyunca yiyecek erişimi kısıtlanmış, ardından 6 saatlik bir beslenme penceresi tanımlanmıştır. Genç plazma transfüzyonu uygulanan gruplarda, her bir hayvana günlük 0.5 ml plazma kuyruktan damar yolu ile verilmiştir. Metagenomik analiz sonuçları, Shannon ve Simpson alfa çeşitlilik indeksleri ile Firmikutes/Bakterioidetes (F/B) oranında anlamlı gruplar arası farklılıklar ortaya koymuştur. Ancak, tür çeşitliliği açısından anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. Özellikle, genç plazma transfüzyonu sonrası F/B oranındaki düşüş, mikrobiyota yapısında olumlu bir yeniden düzenlenmeye işaret etmektedir. Bu sonuçlar, yaşlanan bağırsak mikrobiyotasının sağlığı üzerindeki müdahalelerin potansiyel etkilerini derinlemesine anlamak için önemli bir katkı sağlamakta olup, bu iki yaklaşımın zamanlamasının optimizasyonunun, sinerjik faydalar sunabileceğini öne sürmektedir.

Anahtar Kelimeler Mikrobiyota, Aralıklı Oruç, Genç Plazması, Metagenom, Sprague-Dawley.

Abstract

The aging process leads to dysbiosis of the gut microbiota, which is associated with various diseases. In this context, the effects of intermittent fasting and young blood plasma transfusion on the renewal of senescent cells hold significant importance in the literature. The current study aims to evaluate the cumulative effects of these two interventions on the gut microbiota within the context of aging. The research was conducted on 24-month-old male Sprague-Dawley rats, examining the effects of a 30-day intermittent fasting protocol coupled with young blood plasma transfusion on the microbiota. Four distinct groups were defined: control (Cnt, n=7), those only undergoing intermittent fasting (Fst, n=7), those receiving only young plasma transfusion (Pls, n=7), and those undergoing both intermittent fasting and young plasma transfusion (FstPls, n=7). In the intermittent fasting regimen, rats were restricted from accessing food for 18 hours a day, followed by a 6-hour feeding window. For groups receiving young plasma transfusion, each animal was administered 0.5 ml of plasma daily via the tail vein. Metagenomic analysis results have shown significant inter-group differences in Shannon and Simpson alpha diversity indexes and the Firmicutes/Bacterioidetes (F/B) ratio. However, no significant increase in species diversity was observed. Notably, the decrease in the F/B ratio following young plasma transfusion indicates a positive restructuring of the microbiota composition. These results contribute significantly to understanding the potential effects of interventions on the health of the aging gut microbiota, suggesting that optimizing the timing of these two approaches could offer synergistic benefits.

Keywords Microbiota, Intermittent Fasting, Young Plasma, Metagenome, Sprague-Dawley.

1. Giriş

Yetişkinlik döneminde bağırsak mikrobiyotasının nispeten sabit bir yapıda olduğu kabul edilse de, yaşlanma süreci, mikrobiyota kompozisyonu ve işlevselliğinde önemli değişikliklere yol açar ve bu değişiklikler çoğunlukla mikrobiyal çeşitlilikteki azalma ile ilişkilendirilir. Bağırsak mikrobiyotası, çevresel sinyallerle sürekli etkileşim halinde olup, bu sinyallere zaman içerisinde dinamik

adaptasyonlar gösterir. Diyet alışkanlıkları, ilaç kullanımı, fiziksel aktivite düzeyleri ve sosyal çevre gibi faktörler, bağırsak mikrobiyotasının bileşimi ve işlevselliği üzerinde süregelen etkilere sahiptir (Aleman ve Valenzano 2019). Yaşa bağlı olarak gelişen disbiyoz, yani mikrobiyal topluluk yapısındaki dengesizlikler, çeşitli yaşa bağlı rahatsızlıkların ortaya çıkışında önemli bir faktördür. Bağırsak mikrobiyotası, değişen koşullara, hem bakteriyel türlerin kompozisyonundaki hem de metabolik işlevlerdeki

adaptasyonlar yoluyla dinamik bir yanıt geliştirir. Bu adaptasyon süreci, zararlı mikroorganizmaları seçici bir şekilde elimine ederken veya nötralize ederken, faydalı bakterilerin gelişimine ve mukozal nişlerde yerleşimine olanak tanır (DeJong vd. 2020).

Plazma değişim çalışmaları, genç kan plazma faktörlerinin yaşlanma sürecine müdahale edebilecek potansiyel bir strateji olarak ön plana çıkmaktadır. Özellikle, heterokronik parabiosis yöntemiyle genç kana maruziyetin, insan kök hücre aktivitesini kas, karaciğer, omurilik ve beyin gibi çeşitli dokularda iyileştirdiği gözlemlenmiştir (Villeda vd. 2011). Bu bulgular, yaşlanmanın tersine çevrilebilir olduğuna dair önemli kanıtlar sunmaktadır. Ayrıca, yaşlı bireylerde gerçekleştirilen araştırmalar, genç kanın nörojenез ve sinaptik plastisite üzerindeki olumlu etkilerini ortaya koymuştur. Bu etkiler, özellikle beyinin hipokampus bölgesinde bilişsel işlevlerde iyileşmeler ve potansiyel terapötik faydalar ile ilişkilendirilmiştir (Villeda vd. 2014). Fare modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, genç plazma tedavisinin kısa süreli hafızayı güçlendirdiğini, uzamsal öğrenme ve hafıza kapasitesini artırdığını ve nöroinflamasyonu azalttığını göstermiştir (Zhao vd. 2020). Bununla birlikte, yaşlı plazmanın, genç parabiyyonların beyin fonksiyonları üzerindeki merkezi aracılı davranışları ve ilişkili histolojik yapıları olumsuz yönde etkileyebileceği tespit edilmiştir (Villeda vd. 2011). Bu, yaşlı plazma faktörlerinin yaşlanma sürecinde olumsuz rol oynayabileceğini ve genç plazma faktörlerinin olumlu etkilerini nötralize edebileceğini göstermektedir. Son olarak, genç kan plazma transferinin bağırsak mikrobiyotasında alfa çeşitliliğini artırarak olumlu değişikliklere yol açtığı gözlemlenmiştir (Ceylani ve Teker 2022; Teker ve Ceylani 2022). Bu bulgu, genç kan plazma faktörlerinin sadece nörolojik ve somatik dokular üzerinde değil, aynı zamanda mikrobiyota üzerinde de geniş kapsamlı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmaların toplamı, genç kan plazma faktörlerinin yaşlanma sürecine müdahalede potansiyel bir araç olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

Geniş çapta yürütülen araştırmalar, aralıklı açlığın sağlık üzerindeki potansiyel olumlu etkilerini ortaya koymaktadır. Aralıklı oruç, gıda tüketiminin belirli dönemlerde kısmen veya tamamen kısıtlanması esasına dayanan, diyetle ilgili bir uygulamadır. Bu uygulama, 16 ila 24 saat arasında gıda tüketiminin düzenli olarak kısıtlanmasını içerir ve çeşitli terapötik, sosyal veya dini amaçlarla benimsenmiştir (Meehan ve Beiko 2014; de Cabo ve Mattson 2019). Hayvan modeli çalışmaları, aralıklı orucun bağırsak mikrobiyotasının ve mikrobiyal metabolitlerin kompozisyonlarında değişikliklere yol

açarak insülin direncini azaltabileceğini, yağ dokusunun esmerleşmesini teşvik edebileceğini, merkezi sinir sistemi otoimmünitesini engelleyebileceğini ve diyabetle ilişkili retinopatıyı iyileştirebileceğini göstermiştir (Li vd. 2021). Ayrıca, alternatif gün orucu veya aralıklı oruç uygulamalarının hayvan modellerinde nöroinflamasyonu azalttığı, beyin yapısını ve yaşlanma ile Alzheimer hastalığına bağlı bilişsel işlevleri iyileştirdiği bilimsel olarak kanıtlanmıştır (Silva vd. 2020). Son zamanlarda tamamlanan bir çalışma, aralıklı oruç uygulamasının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun dengelenmesinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Teker ve Ceylani 2022). Bu bağlamda, yaşlı ratlarda aralıklı oruç ile birlikte genç plazma uygulamasının bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkilerini inceleyen mevcut çalışma, bu alandaki bilgi birikimine önemli bir katkı sağlamaktadır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Model organizma seçimi

Bu araştırmada, model organizma olarak 24 aylık erkek Sprague-Dawley ratlar kullanıldı. Erkek ratların seçilmesinin nedeni, dişi hayvanlarda görülebilecek hormonal değişikliklerin çalışma sonuçları üzerinde olası etkilerinin önüne geçmektir. Ratlar, farelere göre daha büyük hacme sahip oldukları için, hem plazma transferinin sağlıklı bir şekilde yapılması hem de deneysel uygulamalar sonucunda elde edilecek doku örneklerinin yeterli büyüklükte olması açısından tercih edilmektedir. Genellikle bu tür deneysel çalışmalarda Wistar veya Sprague-Dawley rat türleri kullanılır. Bu iki tür birbirine yakın özellikler gösterir ve araştırma laboratuvarlarında bakımları daha ekonomik olduğu için sıklıkla tercih edilirler. Sprague-Dawley ratlarının seçilmesinin bir diğer nedeni de, çalışmamızda ihtiyaç duyduğumuz yaş ve cinsiyet kriterlerine (23-25 aylık) uygun olmalarıdır.

2.2. Aralıklı oruç ve plazma uygulaması

Araştırmanın hedeflerine uygun olarak dört farklı grup oluşturuldu: bir kontrol grubu (n=7), yalnızca genç plazma transferi yapılan grup (n=7), sadece aralıklı oruç uygulanan grup (n=7) ve hem aralıklı oruç uygulaması hem de genç plazma transferi yapılan grup (n=7). Aralıklı oruç protokolü kapsamında, hayvanların yiyecek erişimi 18 saat süreyle kısıtlanmış ve sadece 09:00 ile 15:00 saatleri arasında altı saatlik bir süre için yiyecek erişimlerine izin verildi. Bu süreçte su tüketiminde herhangi bir kısıtlama uygulanmadı. Deneyde, standart hayvan yemi kullanılmış ve genç kan plazması temini için beş haftalık erkek Sprague-Dawley ratlar tercih edildi. Araştırma süresince tüm hayvanlar, standart koşullar

altında bakımları sağlanarak tutuldu. Deney grubundaki hayvanlara, kuyruktan damar yoluyla günde 0.5 ml kan plazması transfer edildi. Aktarılan kan plazması genç ve yaşlı hayvanların sahip olduğu kan plazma miktarının 1/10'nuna göre belirlendi (Villeda vd. 2014). Kontrol grubuna ise herhangi bir müdahalede bulunulmadı. Deney sonunda, hem deney hem de kontrol gruplarındaki ratlar feda edilerek, bağırsak dokusunun çekum kısmından alınan örnekler kuru buz üzerinde şoklanmış ve etiketlenerek analiz edilmek üzere -80°C'de saklanmıştır (Ceylani ve Teker 2022; Teker ve Ceylani 2022). Bu çalışma, Saki Yenilli Deneysel Hayvanları Üretim ve Uygulama Laboratuvarı Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (onay numarası: 03/05/2022).

2.3. Plazmanın toplanıp hazırlanması

Kan örnekleri alınmadan önce, hayvanları bilinçsiz hale getirmek için kısa süreli eter ile muamele yapıldı. Kalpten enjektör yardımı ile toplanıp EDTA'lı tüplere aktarılan tüm kan 1.000 g'de (+4°C'de 15 dakika) santrifüj edildikten sonra plazması elde edildi. Plazma örnekleri, 95°C'de iki ila üç dakika ısıtılarak ve ardından 1.000 g'de kısa bir döndürme ile denatüre edildi. Tüm plazma alikotları kullanılacağı zamana kadar -80°C'de tutuldu. Uygulamadan önce EDTA, PBS içinde 3.5-kDa D-tüp diyalizörler (EM Milli-pore) kullanılarak plazmadan uzaklaştırıldı (Villeda vd. 2014).

2.4. DNA izolasyonu

Genomik DNA'yı çekum içeriğinden izole etmek için "Quick DNA TM Fe-cal/Soil Microbe Miniprep Kit, Cat. No. D6010" kullanıldı. Ekstre edilen DNA'nın miktarını ve saflığını ölçmek için Qubit florometre kullanıldı (Ceylani vd. 2023).

2.5. 16S rRNA V3-V4 bölge amplifikasyonu

Bir SimpliAmp Termal Döngüleyici ve evrensel primer dizileri 341F (CCTAC-GGGNGGCWGCAG) ve 805R (GAC-TACHVGGGTATCTAATCC) kullanarak, türleri tanımlamak için 16S rRNA geninin V3-V4 bölümlerini güçlendirildi (Ceylani vd. 2023).

2.6. 16S V3-V4 bölgeleri için geçerli PCR koşulları

PCR koşulları: 95°C 10 dakika, başlangıç denatürasyonu (Taq DNA Polimeraz enzimi kullanıldı), 35 döngü: 95°C 45 saniye – denatürasyon, 50-55°C 45 saniye – yapışma, 72°C 60 saniye, uzama, 72°C, 3 dakika – son uzama, sıcaklık 4°C'ye düşürüldü ve PCR tamamlandı (Ceylani vd. 2023).

2.7. Kütüphanenin hazırlanması ve sıralama

16S rRNA V3-V4 ampikon ürünlerine yönelik kitaplık, Illumina'dan "Nextera XT DNA Library Prep Kit, Cat. No:

FC-131-1096" kullanılarak hazırlandı ve "TG Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 İndeks, 384 Numune), Katalog No: TG-131-2001." PCR saflaştırma işlemi, Beckman Coulter'dan temin edilen AMPure XP boncukları kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler, Illumina MiSeq teknolojisi kullanılarak eşleştirilmiş uç (PE) 2x150 baz okumaları olarak sıralandı. Geçerli sayılması için, her örnek için en az 30.000 okuma sağlandı (Gurbanov vd. 2022). Metagenom dizileme, Ficus Biotechnology (FicusBio, Ankara, Türkiye) tarafından gerçekleştirildi.

2.8. Ham veri biyoinformatik analizi

FastQC v0.10.1, ham sekans verileri (FastQ) üzerinde kalite kontrolleri yapmak ve gerekirse mikrobiyal çeşitlilik tahmininin doğruluğunu artırmak ve düşük kaliteli okumalar ve kontamine okumalar dâhil olmak üzere sekanslama yapıtlarını kaldırmak için verileri kırpmak için kullanıldı. Sıralama verilerinin OTU gruplarına kümelenmesi, Kraken Metagenomic System kullanılarak yapıldı (Wood ve Salzberg 2014). GraphPad Prism 9.0.1 (GraphPad Yazılımı, ABD) kullanılarak ısı haritaları oluşturuldu. Tüm ham okumalar, NCBI'de BioProject ID PRJNA926998 altında depolandı.

2.9. Alfa çeşitlilik indeksleri

Tür düzeyinde, alfa çeşitlilik indeksleri hesaplandı. Shannon indeksi 1.5 ile 3.5 arasında bir değere sahiptir. Bu değer ne kadar yüksek olursa tür zenginliği de o kadar fazladır. Simpson indeksi, OTU bolluğu ve tekdüzeliği kullanılarak hesaplandı. Simpson çeşitlilik indeksi (1-D), 0 ile 1 arasında bir değerdir ve 1 nihai düzgünlüğü temsil etmektedir (Teker ve Ceylani 2022).

2.10. İstatistik

İstatistiksel analizler ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) olarak verildi. Kontrol (Cnt), aralıklı oruç (Fst), plazma (Pls) ve aralıklı oruç sırasında plazma uygulaması (FstPls) alfa çeşitliliklerini ve F/B oranını karşılaştırmak için One-Way ANOVA testi kullanıldı. Karşılaştırma GraphPad Prism 9 (GraphPad Yazılımı, ABD) yazılımında yapıldı. Önem derecesi * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$ olarak gösterildi. FstPls grubunda bulunan en baskın bakteri cinsleri ve türlerinin diğer gruplardaki metagenomik sayımlarından elde edilen % bulunma oranlarına ait ısı haritası analizi GraphPad Prism 9'da (GraphPad Yazılımı, ABD) yapıldı.

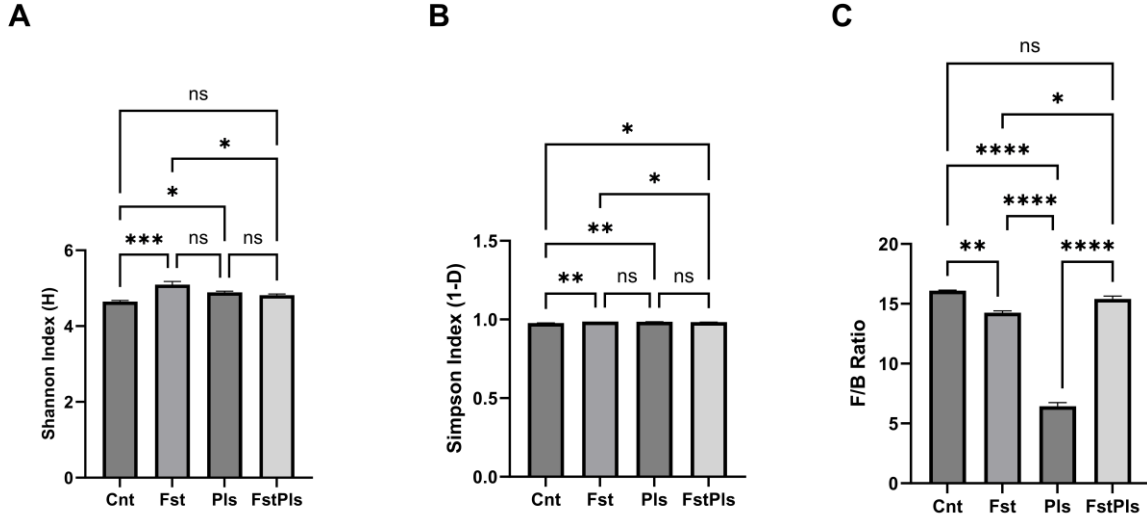
3. Bulgular

3.1. Alfa çeşitlilik indeksleri ve F/B oranı

Metagenom analizi sonuçları, gruplar arasında alfa çeşitlilik ve F/B oranı bakımından önemli farklılıklar ortaya koymuştur. Kontrol (Cnt), Aralıklı Oruç (Fst), Genç

Plazması (Pls) ve Aralıklı Oruç sırasında Genç Plazması uygulanan (FstPls) gruplar arasında Shannon ve Simpson çeşitlilik indeksleri ile F/B oranları incelenmiştir. Tek varyanslı ANOVA sonuçlarına göre Shannon değeri açısından, kontrol grubu ile aralıklı oruç grubu ($p=0.0010$) ve kontrol grubu ile genç plazma grubu ($p=0.0327$) arasında anlamlı farklar gözlenmiştir (**Şekil 1A**). Simpson değeri açısından ise kontrol grubu ile aralıklı oruç grubu

($p=0.0012$) ve kontrol grubu ile genç plazma grubu ($p=0.0026$) arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur (**Şekil 1B**). F/B oranında ise, kontrol grubu ile aralıklı oruç grubu ($p=0.0010$), kontrol grubu ile genç plazma grubu ($p<0.0001$) ve aralıklı oruç grubu ile genç plazma grubu ($p<0.0001$) arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (**Şekil 1C**). Bu bulgular **Çizelge 1**'de detaylı olarak sunulmuştur.



Şekil 1. Aralıklı oruç (Fst), genç plazması (Pls) ve aralıklı oruç sırasında genç plazması uygulamasının (FstPls) yaşlı bağırsak mikrobiyotası A: Shannon (H) ve B: Simpson (1-D) indeksleri ile E: Firmicutes/Bacteroidetes oranı (F/B oranı) üzerindeki etkisi. Tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel analizler ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) olarak verildi. Önem derecesi * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$ olarak gösterildi. Cnt: kontrol, Fst: aralıklı oruç, Pls: genç plazma transferi, FstPls: Aralıklı oruç sırasında genç plazma transferi.

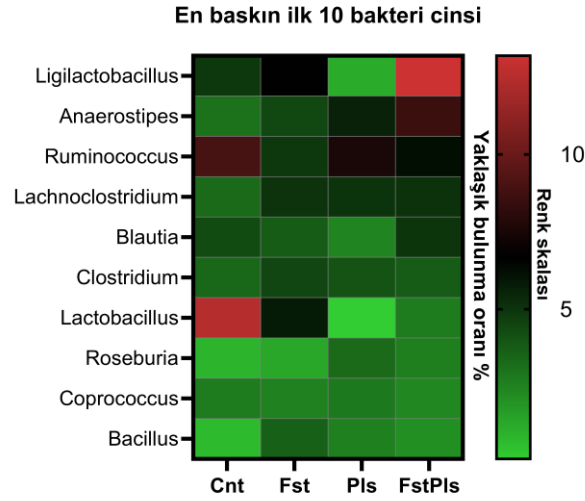
Çizelge 1. Gruplar arasında Alfa Çeşitlilik İndeksleri ve Firmicutes/Bacteroidetes oranı karşılaştırması. Cnt: kontrol, Fst: aralıklı oruç, Pls: genç plazma transferi, FstPls: Aralıklı oruç sırasında genç plazma transferi.

Gruplar	Shannon Değeri (p değeri)	Simpson Değeri (p değeri)	F/B Oranı (p değeri)
Cnt vs. Fst	0.0010	0.0012	0.0010
Cnt vs. Pls	0.0327	0.0026	<0.0001
Cnt vs. FstPls	0.1418	0.0126	0.1659
Fst vs. Pls	0.0807	0.3309	<0.0001
Fst vs. FstPls	0.0189	0.0226	0.0171
Pls vs. FstPls	0.7302	0.1049	<0.0001

3.2. Baskın halde bulunan bakteri cinsleri

Aralıklı oruç, genç plazması ve ikisinin birlikte değerlendirildiği gruplarda bağırsak mikrobiyotasında baskın halde bulunan bakteri cins ve türlerinin büyük ölçüde değiştiği görüldü (**Çizelge 2**). Baskın halde bulunan bakteri cinslerinin bulunma oranları tüm gruplarda tamamen farklılık gösterdi. Bazı cinsler baskılanırken bazı cinsler ise bazı gruplarda baskın hale geldi. En fazla farklılık ise plazma grubunda görüldü. Turicibacter sadece

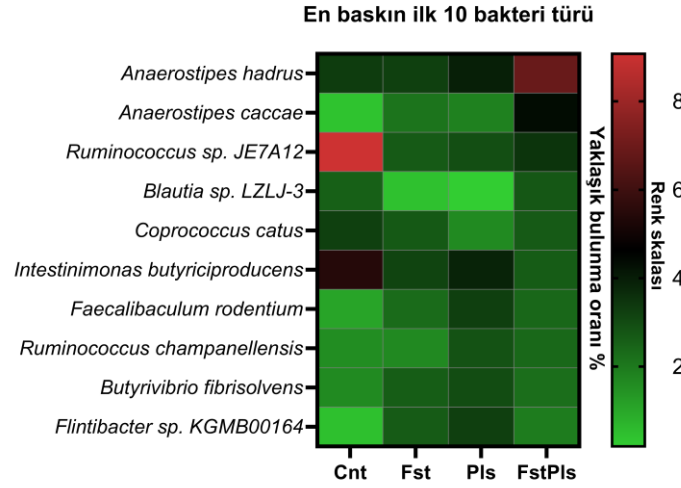
Fst grubundaki en baskın cinsler arasında bulunurken Prevotella, Butyrivibrio, Flavonifractor cinsleri ise sadece Pls grubunda baskın hale geldi. Ruminococcus, Clostridium, Lachnoclostridium, Anaerostipes ve Bacillus farklı bulunma oranlarında tüm gruplarda baskın halde bulundu. Sadece Fst grubunda baskın halde bulunan Blautia ve sadece Pls grubunda baskın halde bulunan Roseburia cinslerinin ayrıca FstPls grubunda da baskın halde bulunması bu cinslerin aralıklı oruç ve genç plazma



Şekil 2. Aralıklı oruç (Fst), genç plazması (Pls) ve aralıklı oruç sırasında genç plazması uygulamasının (FstPls) en baskın ilk on cins üzerindeki etkisi. FstPls grubunda bulunan en baskın ilk on bakteri cinsine ait % bulunma oranının diğer gruplarda bulunan bakteri cinslerinin % bulunma oranları ile karşılaştırılmasına ait ısı haritası.

Çizelge 2. En baskın ilk 10 bakteri cinsi ve türü. Cnt: kontrol, Fst: aralıklı oruç, Pls: genç plazma transferi, FstPls: Aralıklı oruç sırasında genç plazma transferi.

En baskın ilk 10 bakteri cinsi								
	Cnt	%	Fst	%	Pls	%	FstPls	%
1	Lactobacillus	12,4	Ligilactobacillus	6,71	Ruminococcus	7,51	Ligilactobacillus	13,2
2	Ruminococcus	8,92	Lactobacillus	5,81	Anaerostipes	5,62	Anaerostipes	8,55
3	Ligilactobacillus	4,87	Lachnoclostridium	5,04	Lachnoclostridium	5,03	Ruminococcus	6,20
4	Blautia	4,27	Ruminococcus	4,91	Prevotella	4,07	Lachnoclostridium	5,08
5	Intestinimonas	3,84	Clostridium	4,62	Clostridium	4,04	Blautia	4,99
6	Clostridium	3,39	Anaerostipes	4,42	Butyrivibrio	3,36	Clostridium	3,76
7	Lachnoclostridium	3,28	Blautia	3,75	Roseburia	3,31	Lactobacillus	2,74
8	Anaerostipes	3,04	Bacillus	3,62	Intestinimonas	2,98	Roseburia	2,62
9	Bacillus	3,00	Coprococcus	2,56	Bacillus	2,83	Coprococcus	2,36
10	Coprococcus	2,77	Turicibacter	2,38	Flavonifractor	2,60	Bacillus	2,13
En baskın ilk 10 bakteri türü								
	Cnt	%	Fst	%	Pls	%	FstPls	%
1	<i>Ruminococcus</i> sp. JE7A12	9,07	<i>Anaerostipes hadrus</i>	3,23	<i>Anaerostipes hadrus</i>	3,95	<i>Anaerostipes hadrus</i>	6,87
2	<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	5,41	<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	3,14	<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	3,87	<i>Anaerostipes caccae</i>	4,37
3	<i>Candidatus Saccharimonas aalborgensis</i>	3,35	<i>Coprococcus catus</i>	2,70	<i>Flavonifractor plautii</i>	3,58	<i>Ruminococcus</i> sp. JE7A12	3,50
4	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	3,36	<i>Ruminococcus</i> sp. JE7A12	2,67	<i>Flintibacter</i> sp. KGMB00164	3,26	<i>Blautia</i> sp. LZLJ-3	2,73
5	<i>Anaerostipes hadrus</i>	3,33	<i>Flintibacter</i> sp. KGMB00164	2,65	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	2,98	<i>Coprococcus catus</i>	2,67
6	<i>Coprococcus catus</i>	3,23	<i>Flavonifractor plautii</i>	2,63	<i>Ruminococcus</i> sp. JE7A12	2,94	<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	2,62
7	<i>Blautia</i> sp. LZLJ-3	2,87	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	2,60	<i>Ruminococcus champanellensis</i>	2,85	<i>Faecalibaculum rodentium</i>	2,38
8	<i>Ruminococcus torques</i>	2,53	<i>Bacillus velezensis</i>	2,34	<i>[Clostridium] hylemonae</i>	2,08	<i>Ruminococcus champanellensis</i>	2,37
9	<i>Collinsella aerofaciens</i>	2,35	<i>Faecalibaculum rodentium</i>	2,31	<i>Anaerostipes propionicum</i>	2,00	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	2,23
10	<i>Bacillus velezensis</i>	2,29	<i>Clostridium hylemonae</i>	2,10	<i>Anaerostipes caccae</i>	1,82	<i>Flintibacter</i> sp. KGMB00164	1,93



Şekil 3. Aralıklı oruç (Fst), genç plazması (Pls) ve aralıklı oruç sırasında genç plazması uygulamasının (FstPls) en baskın ilk on bakteri türü üzerindeki etkisi. FstPls grubunda bulunan en baskın ilk on bakteri türüne ait % bulunma oranının diğer gruplarda bulunan ilk on bakteri türlerinin % bulunma oranları ile karşılaştırılmasına ait ısı haritası.

uygulaması ile olan güçlü bağıni göstermektedir. FstPls grubunda bulunan en baskın ilk on cinse ait % bulunma oranının diğer gruplarda bulunan % bulunma oranları ile karşılaştırılmasına ait ısı haritası **Şekil 2**'de gösterildi.

3.3. Baskın halde bulunan bakteri türleri

En fazla farklılığın tür seviyesinde olduğu görüldü (**Çizelge 2**). *Ruminococcus sp. JE7A12*, *Intestinimonas butyriciproducens* ve *Anaerostipes hadrus* türleri tüm gruplarda baskın halde bulunmaya devam ettiler. *Flintibacter sp. KGMB00164* ve *Butyrivibrio fibrisolvens* türleri kontrol dışındaki gruplarda baskın hale gelirken *Flavonifractor plautii* ve *Clostridium hylemonae* sadece Fst ve Pls gruplarında baskın halde bulundu. Sadece Fst grubunda bulunan *Faecalibaculum rodentium* ile sadece Pls grubunda bulunan *Anaerostipes caccae* ile *Ruminococcus champanellensis* türlerinin FstPls grubunda da baskın hale gelmesi aralıklı oruç ve genç plazma uygulamasının bu türler ile olan yakın ilişkisine işaret etmektedir. FstPls grubunda bulunan en baskın ilk on bakteriye ait % bulunma oranının diğer gruplarda bulunan ilk on bakteri % bulunma oranları ile karşılaştırılmasına ait ısı haritası **Şekil 3**'de gösterildi.

4. Tartışma ve Sonuç

Bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonu, türler arası ve türler içi geniş çeşitlilik göstermektedir; bu durum, sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotasının ideal yapısına dair kesin bir tanımın olmamasına rağmen, tür çeşitliliğinin zenginliğinin önemli olduğu genel kabul görmektedir. Bu çerçevede, mikrobiyal topluluklar arasındaki farklılıkları ayırt etmede, tür çeşitliliği ve bu türlerin bulunma oranlarına dair bilgiler sunan alfa çeşitlilik indekslerinin analizi, mikrobiyota araştırmalarında tercih edilen temel yöntemlerden biri haline gelmiştir (Matthews 2014).

Mevcut çalışmada, bağırsak mikrobiyotası profilinin detaylı bir şekilde incelenmesi amacıyla çeküm içeriği üzerinde durulmuştur. Uygulamaların etkilerinin ve bağırsak mikrobiyota alfa çeşitliliği üzerindeki uzun vadeli etkilerinin izlenmesi için dışkı örneklerindeki bakteriyel profillerin karşılaştırılması önemli bulgular sunmuştur. Özellikle, Shannon indeksi üzerindeki artışın, aralıklı oruç uygulaması sonucunda belirginleştiği gözlemlenmiştir. Bu bulgu, 12 aylık erkek Wistar ratlara uygulanan 35 günlük aralıklı oruç rejiminin alfa çeşitlilik indekslerini anlamlı bir şekilde artırdığını ortaya koyan önceki çalışmalarla uyumludur (Teker ve Ceylani 2022). Benzer şekilde, genç plazma transferinin alfa çeşitlilik üzerindeki olumlu etkileri, genç plazma transferi uygulanan 12 aylık erkek Wistar ratlarda elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir (Ceylani ve Teker 2022). İki farklı müdahalenin bir arada değerlendirilmesi, türlerin bulunma oranlarında önemli değişikliklere yol açarken, tür çeşitliliğinde kayda değer bir artış gözlemlenmemiştir; bu durum, müdahalelerin etkilerinin zaman içinde farklılık gösterebileceğine işaret etmektedir. Ancak, bu çalışmada ele alınan hayvan modelinin türü, cinsiyeti ve yaşı gibi değişkenlerin, elde edilen sonuçların yorumlanmasında dikkate alınması gereken kritik faktörler olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Bakterilerin bağırsak mikrobiyotasına katkıları arasında, bütirat, propiyonat ve asetat gibi kısa zincirli yağ asitlerinin (KZYA) üretimi özellikle önem taşır. Bu metabolitler, bağırsak epitel hücrelerinin ana enerji kaynağı olarak görev yapar ve kronik enflamasyon ile yaşlanma sürecine katkıda bulunan bağırsak geçirgenliğinin korunmasında doğrudan bir rol oynarlar (Nagpal vd. 2018). Bağırsak mikrobiyotasının %90'ından fazlası Firmicutes ve Bacteroidetes suşlarından oluşurken,

Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria ve Verrucomicrobia suşları daha az sayıda bulunur. Firmicutes ve Bacteroidetes bakterileri tarafından bütirat, propiyonat ve asetatın üretimi, enteroendokrin hücrelerde bulunan G proteinine bağlı reseptörler (GPCR'ler) aracılığıyla konakçının metabolizmasını çeşitli yollarla düzenler. Özellikle asetat ve bütirat, pankreasta glukagon benzeri peptit 1 (GLP-1) kaynaklı insülin biyosentezini ve beyinde peptit YY (PYY) kaynaklı tokluk hissini tetikleyerek önemli metabolik etkilere sahiptir (Fan ve Pedersen 2021).

Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) oranı, mikrobiyota kompozisyonunun ve sağlık durumunun bir göstergesi olarak kullanılır. Yüksek F/B oranları, disbiyotik bir mikrobiyota yapısını işaret eder ve yaşla birlikte artış gösterdiği bilinmektedir (Indiani vd. 2018). Sprague-Dawley ratları üzerinde yapılan bir çalışmada, sindirim sisteminin çekirdek mikrobiyotası %80 Firmicutes ve %20 diğer gruplardan oluşan 21 farklı taksonomik grup olarak tanımlanmıştır (Li vd. 2017). Bu çalışmada, genç plazma transferinin kontrol grubuna kıyasla F/B oranını önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiş, bu da disbiyotik yapıya işaret eden bir faktör olarak değerlendirilmiştir. Hem alfa çeşitlilik indeksleri hem de F/B oranı açısından yapılan değerlendirmeler, aralıklı oruç ve genç plazma uygulamalarının yaşlı bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkilerinin zamanlamasının önemini vurgulamaktadır. Bu bulgular, yaşlanma sürecinde bağırsak mikrobiyotasının yönetimi ve sağlık üzerindeki etkileri konusunda önemli öngörüler sunmaktadır.

Aralıklı oruç ve genç plazma uygulamalarının, bağırsak mikrobiyotasındaki tür çeşitliliği ve türlerin bulunma oranları üzerinde farklı etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Bu uygulamaların, *Ruminococcus sp. JE7A12*, *Intestinimonas butyriciproducens* ve *Anaerostipes hadrus* gibi baskın türlerin mikrobiyotadaki varlığını sürdürmelerine olanak tanıdığı belirlenmiştir. Bu türler, özellikle *Intestinimonas butyriciproducens* ve *Anaerostipes hadrus*'un bütirat üretimiyle bilinen bakteriler olması bağırsak mikrobiyotasının (BM) işlevselliğinde kritik roller üstlendiklerini göstermektedir (Allen-Vercoe vd. 2012; Hanske vd. 2013). *Ruminococcus*, selülozu parçalayabilen ve Clostridia sınıfına ait bir tür olup, bazı üyeleri inflamatuvar bağırsak hastalığı ve Crohn hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Falalyeyeva vd. 2022). Ayrıca, *Flintibacter sp. KGMB00164* ve *Butyrivibrio fibrisolvens* türleri, hem aralıklı oruç hem de genç plazma transferi sonrası en baskın ilk on tür arasında yer almaktadır. *Flintibacter*, bütirat üretebilen çubuk şeklinde bir bağırsak bakterisi (Lagkouvardos vd. 2016), *Butyrivibrio fibrisolvens* ise geviş getiren hayvanların ve insanların

bağırsak mikrobiyotasının bir parçası olarak, selülozun bozulmasında önemli bir rol oynayan bir türdür (Hernández vd. 2018). Sadece aralıklı oruç ve genç plazma uygulaması ile baskın hale gelen, sağlıklı insan bağırsak mikrobiyotasının bir üyesi olan *Flavonifractor plauti* Karpas vd. (2021) ve fonksiyonel safra asidi metabolizması yeteneğine sahip *Clostridium hylemonae* Wolf vd. (2021) gibi önemli türlerin varlığı, bu müdahalelerin mikrobiyota üzerindeki etkisini daha da vurgulamaktadır. Ancak, her iki uygulamanın birlikte değerlendirildiği gruplarda bu önemli türlerin baskın olmaması, müdahalelerin farklı zamanlarda uygulanmasının mikrobiyota üzerinde daha olumlu etkiler yaratabileceği yönündeki görüşü desteklemektedir. Bu bulgular, aralıklı oruç ve genç plazma uygulamalarının bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkilerinin karmaşık doğasını ve bu müdahalelerin potansiyel sinerjik veya antagonistik etkileşimlerini ortaya koymaktadır.

Uygulanan müdahalelerin bağırsak mikrobiyotasındaki tür çeşitliliği ve baskınlık oranları üzerindeki etkileri, belirli türlerin varlığı ile yakından ilişkilidir. Aralıklı oruç uygulaması yapılan gruplarda, bağırsak tümör büyümesini engelleyebilen *Faecalibaculum rodentium*'un Zagato vd. (2020), baskın olduğu gözlemlenirken, genç plazma transferi yapılan gruplarda, katı tümörlere karşı etkili anti-kanser bağışıklık tepkisi sağlayabilen *Anaerostipes caccae* ve selülozu parçalayan *Ruminococcus champanellensis*'in baskın olduğu tespit edilmiştir (Chassard vd. 2011; Montalban-Arques vd. 2021). Bu bulgular, her iki yaklaşımın da bağırsak mikrobiyotası üzerinde olumlu etkilere sahip olduğunu ve birlikte değerlendirildiklerinde sinerjik bir etki yaratabileceğini düşündürmektedir. Literatürde, aralıklı oruç ve genç plazma uygulamalarının yaşlanmanın etkilerini tersine çevirebilecek güçlü yöntemler olduğuna dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Aralıklı oruç, özellikle otofaji mekanizmalarını tetikleyerek hücre yenilenmeyi başlatır ve bu yenilenme süreci, doku ve organ seviyesine kadar genişleyebilir (Bagherniya vd. 2018). Diğer yandan, genç plazma, IGF-1, Follistatin, LIF, Leptin, Cerberus, GDF5, TIMP1, TIMP4 gibi "gençlik proteinleri" açısından zengindir ve bu proteinlerin yaşlanma ile negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, genç plazma, GHRH, oksitosin, GDF11, TIMP2 ve osteokalsin gibi yaşlanma karşıtı faktörler içerebilir ve bu faktörlerin yaşlanma biyobelirteçlerini azalttığı bildirilmiştir (Tripathi vd. 2021). Bu çalışmanın sonuçları, aralıklı oruç ve genç plazma uygulamalarının bağırsak mikrobiyotasındaki tür çeşitliliği ve baskınlık oranları üzerinde farklı etkiler yarattığını ve bu müdahalelerin farklı zamanlarda uygulanmasının daha uygun olabileceğine işaret etmektedir. Ancak, bu sonuçların

daha derinlemesine anlaşılabilmesi için proteomik ve metabolomik gibi ileri düzey analitik yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Bu yaklaşımlar, müdahalelerin mikrobiyota üzerindeki etkilerini daha detaylı bir şekilde ortaya koyarak, yaşlanma sürecine müdahalede yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak tanıyabilir.

Sonuç olarak bu araştırmada, yaşlı bağırsak mikrobiyotası üzerinde aralıklı oruç ve genç plazma uygulamalarının etkileri incelenmiştir. Aralıklı oruç, genç plazma aktarımı ve bu iki müdahalenin kombinasyonu, bağırsak mikrobiyotasındaki bakteri tür çeşitliliği ve baskınlık oranları üzerinde farklı ve önemli pozitif etkiler yaratmıştır. Bulgular, tür çeşitliliğinin özellikle aralıklı oruç ile maksimize olduğunu göstermektedir. Her iki müdahalenin ayrı ayrı uygulandığı durumlar, türlerin bulunma oranları üzerinde benzer olumlu etkilere sahipken, genç plazma aktarımının F/B oranının normalleşmesinde daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, bu iki müdahalenin yaşlı bağırsak mikrobiyotasının sağlığı üzerindeki potansiyel faydalarını ortaya koymakta ve farklı zamanlarda değerlendirilmelerinin avantajlı olabileceğine işaret etmektedir. Ancak, hangi müdahale kombinasyonunun veya tekil uygulamanın daha üstün olduğunu belirlemek için, bağırsak mikrobiyotasındaki bakteri grupları arasındaki etkileşimlerin daha detaylı analiz edilmesi gerekmektedir. Örneğin, inflamatuvar yanıtın ölçülmesi, bağırsak geçirgenliğinin değerlendirilmesi ve bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakterilerin ürettiği metabolik ürünlerin profillenmesi gibi analizler yapılabilir. Bu tür detaylı analizler, mikrobiyota sağlığını iyileştirmeye yönelik stratejilerin geliştirilmesinde kritik öneme sahiptir.

Etik Standartlar Bildirgesi

Bu çalışmanın hazırlanma sürecinde bilimsel ve etik ilkelere uyulduğu ve yararlanılan tüm çalışmaların kaynakçada belirtildiği beyan olunur. Bu çalışma, Saki Yenilli Deneysel Hayvanları Üretim ve Uygulama Laboratuvarı Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (onay numarası: 03/05/2022).

Yazarlık Katkı Beyanı

Yazar 1: Kaynaklar, Araştırma, Deney, Yazma – orijinal taslak
Görselleştirme, Yazma – orijinal taslak
Yazar 2: Kaynaklar, Araştırma, Deney, Yazma – orijinal taslak
Görselleştirme, Yazma – orijinal taslak

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarların bu makalenin içeriğiyle ilgili olarak beyan edecekleri hiçbir çıkar çatışması yoktur.

Verilerin Kullanılabilirliği

Yazarlar, bu çalışmanın bulgularını destekleyen ana verilerin makale içerisinde mevcut olduğunu beyan ederler.

Teşekkür

Çalışmaya sağladıkları katkılarından dolayı Taha CEYLANI ve Hikmet Taner TEKER'e teşekkürlerimizi sunarız.

5. Kaynaklar

- Aleman, F.D.D. and Valenzano, D.R., 2019. Microbiome evolution during host aging. *PLoS Pathogens*, **15**, e1007727.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007727>
- Allen-Vercoe, E., Daigneault, M., White, A., et al., 2012. *Anaerostipes hadrus* comb. nov., a dominant species within the human colonic microbiota; reclassification of *Eubacterium hadrum* Moore et al. 1976. *Anaerobe*, **18**, 523-529.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.09.002>
- Bagherniya, M., Butler, A.E., Barreto, G.E., Sahebkar, A., 2018. The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. *Ageing Research Reviews*, **47**, 183-197.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.08.004>
- Ceylani, T., Allahverdi, H., Teker, H.T., 2023. Role of age-related plasma in the diversity of gut bacteria. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, **111**, 105003.
<https://doi.org/10.1016/j.archger.2023.105003>
- Ceylani, T., Teker, H.T., 2022. The effect of young blood plasma administration on gut microbiota in middle-aged rats. *Archives of Microbiology*, **204**, 541.
<https://doi.org/10.1007/s00203-022-03154-8>
- Chassard, C., Delmas, E., Robert, C., et al., 2011. *Ruminococcus champanellensis* sp. nov., a cellulose-degrading bacterium from human gut microbiota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **62**, 138-143.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.027375-0>
- de Cabo, R., Mattson, M.P., 2019. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. *New England Journal of Medicine*, **381**, 2541-2551.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1905136>
- DeJong, E.N., Surette, M.G., Bowdish, D.M.E., 2020. The Gut Microbiota and Unhealthy Aging: Disentangling Cause from Consequence. *Cell Host & Microbe*, **28**, 180-189.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.013>
- Falalyeyeva, T., Chornenka, N., Cherkasova, L., et al., 2022. Gut Microbiota Interactions With Obesity. In: Glibetic, M. (ed) *Comprehensive Gut Microbiota*. Elsevier, Oxford, pp. 201-219.
- Fan, Y., Pedersen, O., 2021. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, **19**, 55-71.
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- Gurbanov, R., Kabaoğlu, U., Yağcı, T., 2022. Metagenomic analysis of intestinal microbiota in wild rats living in

- urban and rural habitats. *Folia Microbiologica (Praha)*, **67**, 469-477.
<https://doi.org/10.1007/s12223-022-00951-y>
- Hanske, L., Bui, N., Blaut, M., et al., 2013. *Intestinimonas butyriciproducens* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the mouse intestine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 4606-4612.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.051441-0>
- Hernández, J.R., Cucchi, M.E.C., Cravero, S., et al., 2018. The first complete genomic structure of *butyrivibrio fibrisolvens* and its chromid. *Microbial Genomics*, **4**, e000216.
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000216>
- Indiani, C.M.D.S.P., Rizzardi, K.F., Castelo, P.M., et al., 2018. Childhood Obesity and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota: A Systematic Review. *Childhood Obesity*, **14**, 501-509.
<https://doi.org/10.1089/chi.2018.0040>
- Karpat, I., Karolyi, M., Pawelka, E., et al., 2021. Flavonifactor *plautii* bloodstream infection in an asplenic patient with infectious colitis. *Wiener Klinische Wochenschrift*, **133**, 724-726.
<https://doi.org/10.1007/s00508-021-01877-0>
- Lagakouvardos, I., Pukall, R., Abt, B., et al., 2016. The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. *Nature Microbiology*, **1**, 16131.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.131>
- Li, D., Chen, H., Mao, B., et al., 2017. Microbial Biogeography and Core Microbiota of the Rat Digestive Tract. *Scientific Reports*, **8**, 1-16.
<https://doi.org/10.1038/srep45840>
- Li, Q., Hu, W., Liu, W.-X., et al., 2021. *Streptococcus thermophilus* Inhibits Colorectal Tumorigenesis Through Secreting β -Galactosidase. *Gastroenterology*, **160**, 1179-1193.e14.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.003>
- Matthews, J.A., 2014. Diversity Indices. *Encyclopedia of Environmental Change*, 1-7.
<https://doi.org/10.4135/9781446247501.n1100>
- Meehan, C.J., Beiko, R.G., 2014. A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome Biology and Evolution*, **6**, 703-713.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evu050>
- Montalban-Arques, A., Katkeviciute, E., Busenhardt, P., et al., 2021. Commensal Clostridiales strains mediate effective anti-cancer immune response against solid tumors. *Cell Host & Microbe*, **29**, 1573-1588.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.08.001>
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., et al., 2018. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutrition and Healthy Aging*, **4**, 267-285.
<https://doi.org/10.3233/NHA-170030>
- Silva, Y.P., Bernardi, A., Frozza, R.L., 2020. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, **11**, 25.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
- Teker, H.T., Ceylani, T., 2022. Intermittent fasting supports the balance of the gut microbiota composition. *International Microbiology*, **26**, 51-57.
<https://doi.org/10.1007/s10123-022-00272-7>
- Tripathi, S.S., Kumar, R., Arya, J.K., Rizvi, S.I., 2021. Plasma from Young Rats Injected into Old Rats Induce Antiaging Effects. *Rejuvenation Research*, **24**, 206-212.
<https://doi.org/10.1089/rej.2020.2354>
- Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., et al., 2011. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, **477**, 90-94.
<https://doi.org/10.1038/nature10357>
- Villeda, S.A., Plambeck, K.E., Middeldorp, J., et al., 2014. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nature Medicine*, **20**, 659-663.
<https://doi.org/10.1038/nm.3569>
- Wolf, P.G., Devendran, S., Doden, H.L., et al., 2021. Berberine alters gut microbial function through modulation of bile acids. *BMC Microbiology*, **21**, 1-15.
<https://doi.org/10.1186/s12866-020-02020-1>
- Wood, D.E., Salzberg, S.L., 2014. Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, **15**, 2-12.
<https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
- Zagato, E., Pozzi, C., Bertocchi, A., et al., 2020. Endogenous murine microbiota member *Faecalibaculum rodentium* and its human homologue protect from intestinal tumour growth. *Nature Microbiology*, **5**, 511-524.
<https://doi.org/10.1038/s41564-019-0649-5>
- Zhao, Y., Qian, R., Zhang, J., et al., 2020. Young blood plasma reduces Alzheimer's disease-like brain pathologies and ameliorates cognitive impairment in 3xTg-AD mice. *Alzheimer's Research & Therapy*, **12**, 70.
<https://doi.org/10.1186/s13195-020-00639-w>