

Humik Asit TNF- α İfadesini Düzenleyerek Lipopolisakkarit-uyarımli Akut Böbrek Hasarını Hafifletir

Humic Acid Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury by Regulating TNF- α Expression

İhsan KARABOĞA¹, Hamza Malik OKUYAN², Serdar DOĞAN³, Şeyda Öznur AYÇİÇEK⁴, Mehmet DOĞAN⁵, Hafize Kılınçkaya DOĞAN⁶

ÖZ

Sepsis-uyarımli akut böbrek hasarı (ABH) sağlık alanındaki gelişmelere rağmen yüksek mortalite oranına sahip klinik bir tablodur. Bu çalışmada Humik asit (HA)'nın Lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen sıçan ABH modelinde potansiyel koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada toplam 24 adet erişkin erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele olarak üç gruba ayrıldı: (1) Kontrol grubu, (2) LPS grubu ve (3) LPS+HA grubu. LPS grubuna 5 mg/kg dozunda LPS uygulanırken, LPS+HA grubuna LPS enjeksiyonundan önceki üç gün boyunca 50 mg/kg dozunda HA tedavisi uygulandı. Böbrek dokularındaki histopatolojik değişiklikler Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi ile değerlendirildi. Ayrıca, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ekspresyon düzeyleri immünohistokimyasal analizlerle incelendi. Malondialdehit, total antioksidan kapasite, total oksidan kapasite, süperoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz gibi oksidatif stres belirteçleri analiz edildi. Kan üre azotu, kreatinin, laktat dehidrogenaz, total protein, albumin ve ürik asit gibi parametreler serum numunelerinde analiz edildi. Bulgularımız, sıçan sepsis modelinde uygulanan HA tedavisinin renal tübüler hasarı azalttığını ve TNF- α ekspresyonunu düşürdüğünü göstermektedir ($p < 0.0001$). Sonuç olarak, HA, LPS-uyarımli ABH modelinde inflamasyonu düzenleyerek renal fonksiyonları iyileştirebilir.

Anahtar Kelimeler: Lipopolisakkarit, Akut Böbrek Hasarı, Humik asit

ABSTRACT

Sepsis-induced acute kidney injury (AKI) is a clinical condition with a high mortality rate despite advances in health. This study aimed to investigate the potential protective effect of Humic acid (HA) in the Lipopolysaccharide (LPS)-induced rat AKI model. A total of 24 adult male *Wistar albino* rats were used in the study. The rats were randomly divided into three groups: (1) Control group, (2) LPS group and (3) LPS+HA group. LPS was administered at a dose of 5 mg/kg to the LPS group, while HA was administered at a dose of 50 mg/kg for three days before LPS injection to the LPS+HA group. Histopathological changes in the renal tissues were evaluated by hematoxylin-eosin staining method. In addition, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) expression levels were examined by immunohistochemical analyses. Malondialdehyde, total antioxidant capacity, total oxidant capacity, superoxide dismutase, glutathione peroxidase as oxidative stress markers were analyzed. Parameters such as blood urea nitrogen, creatinine, lactate dehydrogenase, total protein, albumin and uric acid were analyzed in serum samples. Our findings show that HA treatment reduces renal tubular damage and decreases TNF- α expression rat sepsis model ($p < 0.0001$). In conclusion, HA may improve renal functions by regulating inflammation in LPS-induced AKI model.

Keywords: Lipopolysaccharide, Acute Kidney Injury, Humic Acid

Bu çalışmanın tüm deney protokolleri Sakarya Üniversitesi Yerel Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylandı (İzin numarası: 2025/45).

¹ Dr. Öğretim Üyesi, İhsan KARABOĞA, Histoloji ve Embriyoloji, Kırklareli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ihsankaraboga@gmail.com, ORCID:0000-0001-6708-1229

² Doç. Dr. Hamza Malik OKUYAN, Tıbbi Biyoloji, Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü, hmokuyan@subu.edu.tr, ORCID:0000-0001-7616-3330

³ Doç. Dr. Serdar DOĞAN, Tıbbi Biyokimya, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, drserdardogan@hotmail.com, ORCID:0000-0001-6854-2197

⁴ Araştırma Görevlisi, Şeyda Öznur AYÇİÇEK, Fizyoloji, Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü, seydaaycicek@subu.edu.tr, ORCID:0000-0002-3922-8243

⁵ Araştırma Görevlisi, Mehmet DOĞAN, Histoloji ve Embriyoloji, Histoloji ve Embriyoloji, Kırklareli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, doganmehmet@klu.edu.tr, ORCID:0000-0002-8497-1829

⁶ Hafize Kılınçkaya DOĞAN, Tıbbi Mikrobiyoloji, Antalya Şehir Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, hafize_kkaya@hotmail.com, ORCID:0009-0005-6647-1803

İletişim / Corresponding Author:

İhsan KARABOĞA

e-posta/e-mail:

ihsankaraboga@gmail.com; ihsankaraboga@klu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 03.07.2025

Kabul Tarihi/Accepted: 11.09.2025

GİRİŞ

Çoklu organ yetmezliğine yol açabilen ve yüksek mortalite oranına sahip sepsis, aşırı inflamatuvar yanıtla karakterize klinik bir durumdur.^{1,2} Sepsis hastalarının en az üçte birinde tespit edilen sepsis ilişkili akut böbrek hasarı (ABH), tübüler patofizyolojik değişikliklere yol açarak böbrek fonksiyonlarında hızlı bir azalmaya neden olur.³ ABH, artmış serum kreatinin seviyesi, azalmış idrar çıkışı, elektrolit dengesizliği ve asit-baz bozukluğu gibi klinik semptomların görüldüğü bir sendromu ifade eder.⁴ Sepsis ile ilişkili ABH başka organ ve sistemleri de etkileyebilir.⁵ Yakın zamanda yapılan çalışmalar ABH neticesinde artan oksidatif stres, lökosit aktivasyonu ve infiltrasyonu ile inflamatuvar sitokinlerin uzak organ hasarında rol oynadığını göstermiştir.⁶⁻⁹ ABH, uzak organ hasarının yanı sıra, sekonder enfeksiyonlara da zemin hazırlayarak mortalite oranının artmasına neden olmaktadır.¹⁰ Deney hayvanlarında sepsis, gram-negatif bakteri duvarında bulunan güçlü bir endotoksin olan Lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenebilmektedir.^{11,12} Konak hücre reseptörleriyle etkileşime giren LPS, tümör nekroz faktör - alfa (TNF- α) ve interlökin 1 – beta (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olur.¹³ LPS-uyarımli ABH modellerinde renal reaktif oksijen türevleri (ROS) üretiminin de arttığı bildirilmiştir.¹⁴ Böbrekte ROS’ un aşırı üretimi tübüler hücre hasarı ile ilişkilendirilmektedir.^{15,16} Böbrek vücutta kan filtrasyonu, su-tuz dengesinin sağlanmasının yanı sıra önemli endokrin fonksiyonlara sahip vital bir organdır.¹⁷ Böbrek yüksek kan akışı sebebiyle LPS-uyarımı sonucu artan proinflamatuvar sitokinler ve ROS’ dan diğer organlara kıyasla daha fazla etkilenir ve LPS-uyarımli sepsise

karşı daha hassastır.¹⁸ LPS-uyarımli ABH patofizyolojisinin tam olarak anlaşılabilmesi, ABH ilişkili mortalite oranının yüksek oluşu ve spesifik bir tedavi seçeneği bulunmaması sebebiyle literatürde akut böbrek hasarının geri döndürülmesini amaçlayan alternatif tedavi yaklaşımları deneysel modellerde sıkça çalışılmaktadır.¹²

Humik asit (HA), güçlü bir serbest radikal temizleyici olarak bilinen önemli bir polifenolik antioksidandır. Toprak, içme suyu, turba ve kömür gibi doğal ortamlarda bulunur.¹⁹ Aromatik halkalar ile fenolik hidroksil ve karboksil gruplarından oluşan yapısı, ona biyolojik aktivite kazandırır. Bitkilerde büyümeyi teşvik edici, hayvanlarda ise uzun yıllardır terapötik amaçla kullanılan HA; antiviral, antibakteriyel, antitoksik, antiülserojenik, antiartritlik, antialerjik, immünomodülatör, yara iyileştirici ve antiinflamatuvar etkiler göstermektedir.^{19,20} *Gau ve arkadaşlarının* yaptığı çalışmada HA’nın inflamatuvar mediatörlerin salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir.²⁰ Ayrıca, HA’nın apoptozis, proliferasyon ve otofaji gibi hücresel süreçleri modüle edebileceği rapor edilmiştir.¹⁹

HA’nın yukarıda bahsedilen olası tıbbi etkileri göz önüne alındığında LPS ile indüklenen ABH’nin tedavisi için terapötik bir değere sahip olabileceğini öngörmekteyiz. Bununla birlikte, Sepsis ile indüklenen ABH’de HA’nın olası koruyucu rolünü inceleyen bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Bu çalışma kapsamında, Sepsis’in neden olduğu ABH’de HA’nın TNF- α ve oksidatif stres üzerindeki etkisini incelemeyi amaçladık.

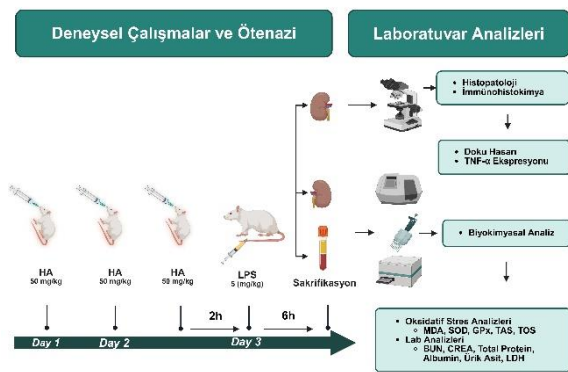
MATERYAL VE METOT

Deney Protokolü

Çalışma, Sakarya Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2025/45). Toplam 24 adet erişkin erkek *Wistar albino* sıçan (200–250 g) rastgele olarak üç gruba ayrıldı:

I-Kontrol grubu, II-LPS grubu, III- LPS+HA grubu (her grup için n=8). Deney süresince tüm hayvanlar, 23 $\pm$ 2 °C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık döngüsünde tutulan odalarda, standart pelet yem ve musluk suyu ile *ad libitum* beslendi. Sepsis modeli, önceki

çalışmalarda tanımlandığı şekilde, 5 mg/kg dozunda intraperitoneal LPS uygulaması ile indüklendi.²¹ Çalışma ile ilgili deneysel tasarım Şekil 1’ de gösterilmiştir. I-Sham/kontrol grubu: Bu gruptaki ratlara ardışık 3 gün boyunca HA ile aynı hacimde oral gavaj ile HA çözücüsü verildi. Bu gruptaki ratlara çalışmanın 3. günü son uygulamadan 2 saat sonra LPS ile aynı hacimde steril salin intraperitoneal olarak enjekte edildi. II-LPS grubu: Bu gruptaki ratlara ardışık 3 gün boyunca HA ile aynı hacimde oral gavaj yöntemi ile HA çözücüsü verildi. Bu gruptaki ratlara çalışmanın 3. günü son uygulamadan 2 saat sonra 5 mg/kg dozunda LPS intraperitoneal olarak enjekte edildi. III-LPS + HA grubu (50 mg/kg): Bu gruptaki sıçanlara ardışık 3 gün boyunca 50mg/kg HA oral gavaj ile verildi. Bu gruptaki ratlara çalışmanın 3. günü son uygulamadan 2 saat sonra 5 mg/kg dozunda LPS intraperitoneal olarak enjekte edildi. LPS uygulamasından 6 saat sonra ketamin/ksilazin anestezisi altında sıçanların kalplerinden kan alınarak deney hayvanları sakrifiye edildi. Laboratuvar analizleri için kan numuneleri alındı. Serum örnekleri biyokimyasal analizlere kadar – 80 °C’de saklandı. Sağ böbrek dokuları histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler için, sol böbrek dokuları ise biyokimyasal analizlere ayrıldı.



Şekil 1. Deney Dizaynı (BioRender ile oluşturuldu). Okuyan, H. (2025) <https://BioRender.com/46w3x3e>.

Böbrek Dokularında Histopatolojik Değerlendirme

Böbrek dokularının histopatolojik değerlendirilmesi için rutin doku takip işlemleri uygulandı ve örnekler

Hematoksilen-Eozin (H&E) yöntemiyle boyandı. Oda sıcaklığında 48 saat boyunca nötral formalin içinde fikse edilen dokular, ardından gece boyunca musluk suyu altında yıkandı. Formalinden arındırılan örnekler sırasıyla artan alkol derecelerinden (%70, %80, %90, %96 ve %100) geçirilerek dehidrate edildi ve ksilen ile şeffaflaştırıldı. Daha sonra dokular önce yumuşak, ardından sert parafinle infiltre edilerek parafin blokları haline getirildi. Oluşturulan bloklardan 5 µm kalınlığında seri kesitler hazırlandı. H&E boyama sürecinde, kesitlerden parafin ksilen ile uzaklaştırıldıktan sonra örnekler azalan alkol serisinden (%100, %96, %90, %80, %70) geçirilerek yeniden hidrate edildi ve musluk suyunda yıkandı. Ardından kesitlere sırasıyla H&E uygulandı. Boyama sonrası artan alkol serisiyle dehidrasyon ve ksilenle şeffaflaştırma işlemleri tamamlandıktan sonra örnekler entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar, kamera ataçmanlı ışık mikroskobu (Olympus BX40) ile incelendi. Histopatolojik skorlama aşağıdaki kriterlere göre yapıldı: belirgin lezyon yok (0 puan), interstisyel konjesyon veya glomerüler atrofi (1 puan), tübüler epitel nekrozu (1 puan), tübüler lümen genişlemesi (1 puan) ve interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonu (1 puan), toplam puan 5 olarak değerlendirildi.²²

Böbrek Dokusunda TNF-α İfadesi

Böbrek dokusunda TNF-α ifadesi, indirekt immünohistokimyasal yöntem kullanılarak değerlendirildi. Parafinden arındırılan kesitler, azalan alkol serisinden (%100, %96, %90, %80, %70) geçirilerek hidrate edildi. Ardından, fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanan kesitler antijen geri kazanımı için sitrat tamponu (pH:6,0) içeren kapalı kaplara yerleştirildi ve mikrodalga fırında kaynatıldı (Arçelik MD 5564). Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan kesitler PBS ile tekrar yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini engellemek amacıyla %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi. Spesifik olmayan bağlanmaların önlenmesi için kesitlere oda sıcaklığında 1 saat boyunca blokama serumu uygulandı. Daha sonra TNF-α primer antikoru ile nemli ortam kabında, +4 °C’de gece boyunca inkübasyon

gerçekleştirildi. Bu sürecin ardından kesitler sırasıyla biotinli sekonder antikor ve streptavidin-peroksidaz konjugatı ile birer saat süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Görselleştirme için kromojen olarak 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) kullanıldı. Kontrast oluşturmak amacıyla Mayers hematoksilen ile zemin boyaması yapıldı ve kesitler su bazlı kapatma medyumunu ile kapatıldı. TNF- α boyama skoru, Carter ve ark. (2004) tarafından tanımlanan kriterlere göre değerlendirildi: boyama dağılımı 0,1 < %25; 0,4 %26–50; 0,6 %51–75; 0,9 %76–100 ve boyama yoğunluğu 0; boyanma yok, 0,5; çok az boyama, 1; az boyama, 2; orta düzeyde boyama, 3; çok güçlü boyama). İmmünohistokimyasal TNF- α boyama skoru = dağılım x yoğunluk olarak hesaplandı²³.

Renal Fonksiyonların ve Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Sıçanlardan alınan kan örnekleri oda sıcaklığında 30 dakika süreyle pıhtılaşmaya bırakıldı. Ardından örnekler, +4 °C’de 1500 × g’de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi. Elde edilen serum, dikkatlice yeni mikro santrifüj tüplerine aktarıldı. Böbrek fonksiyonuna yönelik değerlendirme amacıyla, serumda kan üre nitrojeni (BUN), kreatinin (CREA) laktat dehidrogenaz (LDH), total protein (TP), albumin ve ürik asit (UA) düzeyleri standart laboratuvar yöntemleri kullanılarak analiz edildi.

Biyokimyasal Analizler için Dokuların Hazırlanması

Daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi her bir sıçanın sol böbrek dokusu tartıldıktan sonra pH 7,4’e ayarlanmış PBS ile yıkandı. Dokular, önceden soğutulmuş PBS içerisinde homojenize edilerek süspansiyon formunda böbrek homojenatları elde edildi. Sol böbrek dokularındaki toplam protein düzeyleri, Bradford protein tayin kiti kullanılarak kantitatif olarak belirlendi.¹²

Oksidatif Stres ve Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

MDA (malondialdehit), hücresel ve doku düzeyinde oksidatif stresin önemli bir göstergesi olarak kabul edilir. Analiz öncesinde her bir böbrek doku örneğinin toplam protein içeriği belirlenmiştir. İnkübasyon işleminin ardından absorbands değerleri, Thermo Fisher Multiscan Go marka mikrolaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Serum ve Böbrekte Antioksidan Kapasitenin Değerlendirilmesi için süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim düzeyleri, üretici firma yönergeleri doğrultusunda, BT-LAB firmasına ait ticari ELISA kitleri (E2269Ra ve E1242Ra) kullanılarak ölçüldü. Serumdaki toplam antioksidan kapasite (TAS), Elabscience firmasına ait kolorimetrik analiz kiti (E-BC-K801-M) ile belirlenmiş olup sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L birimiyle ifade edildi. Toplam oksidan düzeyi (TOS) ise yine Elabscience kolorimetrik kiti (E-BC-K802-M) ile analiz edilerek $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L cinsinden raporlandı. Oksidatif stres indeksi (OSI), daha önce Okuyan ve ark. (2021) tarafından açıklandığı şekilde, TOS değerinin TAS değerine oranlanmasıyla hesaplandı. OSI (birim) = $[\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}) / \text{TAS (mmol Trolox Eq/L)}] \times 100$ formülü esas alındı.

İstatistiksel Analizler

Verilerin analizinde GraphPad Prism (sürüm 6.0) yazılımı kullanıldı. Verilerin dağılım özelliklerini belirlemek amacıyla Kolmogorov–Smirnov testi ile normallik değerlendirmesi yapıldı. Gruplar arasındaki farkların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında Kruskal–Wallis H testi ve ikili karşılaştırmalarda Mann–Whitney U testi uygulandı. Bulgular ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu ve p < 0.05 değeri anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

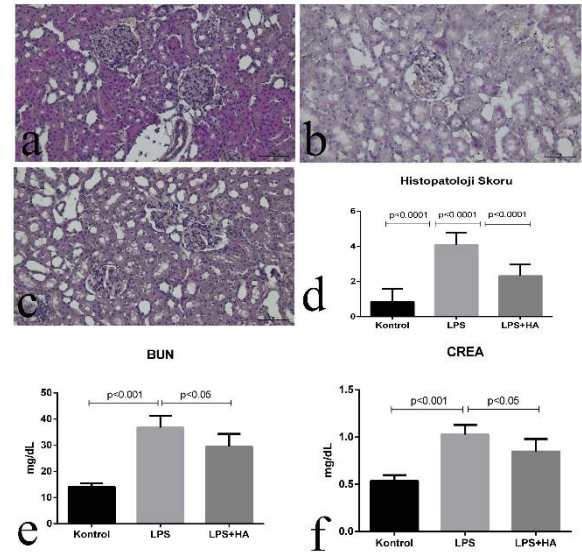
BULGULAR VE TARTIŞMA

Humik asit LPS ile İndüklenen Tübüler Hasarı ve Renal Fonksiyonları İyileştirir

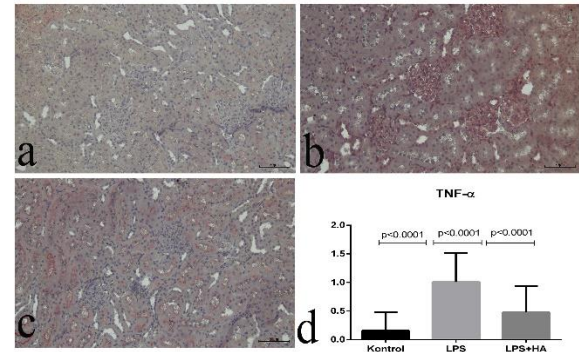
Böbrek dokusu histopatolojik incelemesi H&E boyaması ile gerçekleştirildi. Gruplara ait histopatolojik bulgular ve histopatolojik skorlar Şekil 2’de sunuldu. Kontrol grubunun böbrek dokusu normal yapıda izlendi. LPS grubu böbrek dokusu dikkat çekici biçimde daha soluk bir boyanma sergiledi. Böbrek glomerüllerinde atrofi, Bowman aralığında genişleme, tübüler epitel hücrelerde nekroz ve vakuolizasyon, tübüler lümende dökülmüş epitel hücreleri ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu belirgindi. LPS+HA grubunda LPS grubu böbrek dokusunda izlenen daha hafif olarak izlendi. HA grubu ise normal böbrek dokusu yapısı sergiledi. Histopatolojik skorlar incelendiğinde LPS grubunda histopatolojik skor kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu. LPS+HA grubu histopatolojik skoru LPS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmış bulundu. Sepsis ile indüklenen ABH modelinde elde edilen biyokimyasal veriler değerlendirildiğinde, LPS uygulamasının böbrek fonksiyonu üzerinde belirgin işlev bozukluğuna yol açtığı görülmüştür. LPS grubunda, kontrol grubuna kıyasla serum BUN ve CREA düzeylerinde anlamlı artışlar gözlemlenmiştir ($p<0.001$). HA tedavisi, bu parametrelerdeki yükselmeyi anlamlı düzeyde azaltarak ($p<0.05$) böbrek fonksiyonunu koruyucu etki göstermiştir.

Humik asit Tedavisi Renal TNF- α İfadesini Baskılar

Böbrek dokusunda immünohistokimyasal TNF- α ifadesi indirekt immünohistokimyasal yöntemle belirlendi. Böbrek dokusu TNF- α immünreaktivitesi bulguları Şekil 3’te sunulmuştur. Kontrol grubunda belirgin bir immünreaktivite izlenmedi. LPS grubunda glomerüllerinde ve tübüler epitel hücrelerde belirgin bir TNF- α immünreaktivitesi izlendi ($p<0.0001$). LPS+HA grubunda TNF- α immünreaktivitesi LPS grubuna kıyasla daha hafif izlendi ($p<0.0001$).



Şekil 2. LPS ve HA uygulamasının böbrek histopatolojisi üzerine etkisi (a;Kontrol, b;LPS, c;HA, d; gruplara ait böbrek histopatolojisi skorları, e; gruplara ait serum BUN seviyeleri, gruplara ait CREA seviyeleri dağılımı)

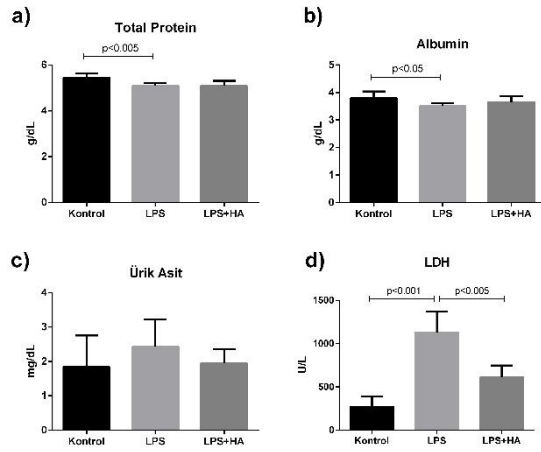


Şekil 3. LPS ve HA uygulamalarının renal TNF- α ifadesi üzerine etkisi (a;Kontrol, b;LPS, c;LPS+HA, d; gruplara ait TNF- α immünreaktivitesi dağılımı)

Humik asit’in Bazı Serum Parametreleri üzerine etkisi

Çalışmamızda LPS ile indüklenen sıçan modelinde serum numunelerinde bazı rutin parametreler incelenmiş ve bulgular Şekil 4’te sunulmuştur. Total protein ve albümin düzeyleri LPS grubunda anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.005$ ve $p<0.05$, sırasıyla).

Ürik asit düzeyleri gruplar arasında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Öte yandan, LPS uygulaması serum LDH düzeylerinde ciddi bir artışa neden olmuştur ($p<0.001$) ve bu artış, HA tedavisiyle anlamlı düzeyde azaltılmıştır ($p<0.005$).

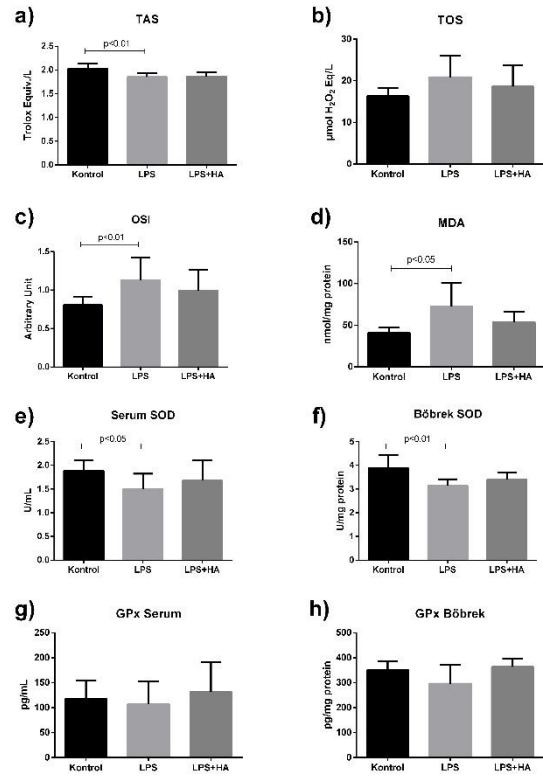


Şekil 4. HA ve LPS uygulamasının Total protein, Albumin, Ürik asit ve LDH seviyelerine etkisi

Humik asit'in LPS-uyarımli ABH modelinde oksidatif statü üzerine etkisi

Sepsis ile indüklenen ABH modelinde oksidatif stres düzeyleri ile antioksidan savunma sistemine ait bazı parametreler değerlendirilmiştir ve bulgular Şekil 5'te sunulmuştur. TAS düzeyleri, LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.01$, Şekil 5a). TOS düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$, Şekil 5b). OSI (oksidatif stres indeksi), LPS grubunda anlamlı şekilde yükselmiştir ($p<0.01$, Şekil 5c). Oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA düzeyleri LPS grubunda anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.05$, Şekil 5d). Bu veriler, LPS'nin oksidatif stres üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya koymaktadır. Serum SOD düzeyleri LPS grubunda anlamlı şekilde düşmüştür. ($p<0.05$, Şekil 5e). Öte yandan, böbrek dokusundaki SOD düzeyi LPS grubunda anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.01$, Şekil 5f). Serum GPx düzeyleri ve böbrek dokusundaki GPx düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$, Şekil 5g ve 5h). Zor bir klinik hastalık tablosu olarak bilinen sepsis yoğun bakım ünitelerine yatışın önde gelen

sebeplerinden biridir.²⁴ Sepsisin erken evrelerinde meydana gelen sistemik inflamatuvar vücutta farklı sistemleri etkiler, metabolizmaya zarar verir ve vital organlarda ciddi hasarlar meydana getirebilir.^{25,26}



Şekil 5. HA ve LPS uygulamasının TAS, TOS, OSI, SOD, GPx ve MDA seviyelerine etkisi

Böbrek hasarının önemli nedenlerinden birisi olan sepsis, inflamatuvar kaskadın aktivasyonunu tetikleyerek proinflamatuvar sitokinler ve inflamatuvar mediyötörlerin salınımını artırır.²⁵ Septik organ hasarında inflamatuvar yanıtın yanı sıra mitokondriyal fonksiyon kaybı, apoptozis, oksidatif stres de rol oynamaktadır.²⁷ Bu nedenle başarısı tatmin edici olmayan antibiyotik tedavisine ek olarak inflamatuvar yanıtı baskılayarak organ hasarını engelleyebilecek alternatif tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.²⁹ Sunulan bu çalışmada, literatürde ilk kez, sepsis indüksiyonundan önce doğal bir ürün olan HA uygulamasının böbrek fonksiyonlarını ve böbrek histomorfolojisini inflamatuvar yanıtı karşı koruduğunu gösterdik.

Güçlü bir serbest radikal temizleyici olarak bilinen HA, toprakta, içme suyunda, turbada,

kömürde ve diğer kaynaklarda bulunabilen polifenolik bir antioksidandır.²⁹ Ayrıca, bu HA bitkilerde büyümeyi teşvik etmek için ve hayvanlarda yıllardır terapötik amaçla kullanılmaktadır.^{29,30} HA antiviral, antibakteriyel, antitoksik, antiülserojenik, antiartritlik, antialerjik, immünomodülatör, yara iyileştirici ve antiinflamatuvar gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir.^{29,31}

Şehitoğlu ve ark, mide ülser modelinde artan TNF- α ifadesinin HA tedavisi ile azaldığını bildirmiştir.³¹ Diğer bir çalışmada ise, sıçan periodontit modelinde uygulanan HA tedavisinin serum TNF- α seviyesinde azalma sağladığı rapor edilmiştir.³² Öte yandan, Sisplatin (SP)-uyarımli sıçan nefrotoksisite modelinde HA tedavisinin böbrek dokusu TNF- α seviyesinde anlamlı bir azalma sağladığı gösterilmiştir.³³ Yakın geçmişte yaşanan COVID-19 pandemisinin retrospektif tedavi incelenmesinin ele alındığı bir çalışmada, 60 COVID-19 hastasından 22'si Humik/Fulvik asit ve epigallokateşin gallat tedavisi almıştır ve bu 22 hastada COVID-19 nedeni ölüm yaşanmamıştır. Bu tedaviyi almayan 38 hastada 21 ölüm vakası rapor edilmiştir.³⁴ Organ hasarlarının sitokin fırtınası ile ilişkilendirildiği COVID-19 hastalarında ve diğer deneysel çalışmalarda rapor edildiği üzere, HA antiinflamatuvar etkisi yoluyla organ hasarını hafifleterek mortalite oranında azalma sağlayabilir. Bizim çalışmamızda da anılan çalışmaların sonuçlarıyla paralel olarak HA, önemli bir proinflamatuvar faktör olan TNF- α seviyesinde azalma sağlamıştır. Bu bulguların tersine, literatürde içme suyu içinde 0,25 ve 0,5 g/kg HA dozlarının farelerde serum TNF- α ve IL-1 β seviyelerinde doza bağlı bir artışa neden olduğu bildirilmiştir.³⁵ İlgili çalışmada, çalışmamıza kıyasla yüksek dozlarda kullanılan HA'nın, ROS üretimini de anlamlı derecede artırdığı bildirilmiştir. Bu sonuç, HA'nın terapötik dozlarının belirlenmesiyle

ilgili çalışmaların gerekliliğini de göstermektedir.

Renal oksidatif stresin ABH patogeneğinde rol oynadığı ve antioksidanların oksidatif stres kaynaklı renal hasardaki rolleri önceki çalışmalarda bildirilmiştir.^{36,37} Aflatoksin-uyarımli oksidatif stres sıçan modelinde HA tedavisinin antioksidan aktiviteye sahip glutatyon (GSH) seviyesini artırdığı, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesinde ise azalma sağladığı rapor edildi.³⁸ Ayrıca anılan çalışmada HA uygulaması böbrek histopatolojisi üzerine de koruyucu etki göstermiştir. Tekes ve ark, HA tedavisinin (20 ve 40 mg/kg) SP uygulaması nedeniyle artan TOS seviyesinde azalma sağladığını göstermiştir.³³ İskemi/reperfüzyon hasarının incelendiği bir deneysel çalışmada ise HA uygulamasının TAS ve OSI seviyelerinde iyileşme sağladığı vurgulanmıştır.³⁷ Çalışmamızda böbrek dokusu ve serum örneklerinde oksidatif parametreler bakımından HA uygulamasının antioksidan aktivite gösteren SOD ve Glutatyon peroksidaz (GPx) seviyesinde istatistiksel olmayan bir artış sağladığı belirlendi. Ayrıca MDA seviyesi HA uygulanan grupta LPS grubuna kıyasla anlamlı olmayan bir azalma gösterdi.

Deneysel ve klinik çalışmalarda ABH değerlendirmesinde BUN, CREA, laktat LDH, total protein, albumin, ürik asit sıklıkla incelenen anahtar parametrelerdendir.³⁹ Çalışmamızda HA tedavisi LPS grubunda artan BUN, CREA ve LDH seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sağladı. SP-uyarımli sıçan nefrotoksisite modelinde uygulanan HA tedavisi çalışmamızdan farklı olarak BUN ve CREA seviyelerinde anlamlı bir azalma sağlamamıştır. Böbrekte oluşturulan hasarın ve mekanizmalarının farklı olması bu durumu açıklayabilir.³³ Fakat bu çalışmada da bizim çalışmamızla benzer olarak HA tedavisi renal histopatolojik bulgulara iyileşme sağladığı rapor edilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız literatürde ilk kez HA tedavisinin LPS-uyarımli ABH modelinde

renal histopatoloji, renal TNF- α ve renal fonksiyon belirteçleri (BUN, CREA) üzerinde

iyileştirici etkisini ortaya koymaktadır. Elde edilen bulgular sepsis kaynaklı ABH tedavisinde HA kullanımının alternatif bir tedavi yaklaşımı olabileceğini göstermektedir. LPS-uyarımli sepsis modelinde HA tedavisinin etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için farklı cinsiyet, süre ve dozların kullanıldığı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Araştırmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamız bazı sınırlılıklara sahiptir. Literatürde deney hayvanlarında sepsisi indüklemek amacıyla farklı modeller geliştirilmiştir.⁴⁰ Çalışmamızda LPS-uyarımli sepsis modeli tutarlı olarak tekrarlanabilirliği ve inflamatuvar yanıtı tetikleme kapasitesi nedeniyle seçildi. Ayrıca çalışmamızda sadece erkek hayvan kullanılması elde edilen sonuçların dişi cinsiyete özgü farklılıkları ortaya koyamamaktadır.

Çıkar Çatışmaları

Yazarlar bu makalenin yayınlanmasıyla ilgili herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazarların katkıları

Çalışma I.K. H.M.O. ve S.D. tarafından tasarlanmıştır. Hayvan deneyleri H.M.O., ve Ş.Ö.A. tarafından gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar analizleri H.M.O., I.K., H.D., M.D. ve S.D. tarafından gerçekleştirilmiştir. Analizler I.K., H.M.O., S.D., H.D., Ş.Ö.A. ve M.D. tarafından gerçekleştirilmiş, grafikler/şekiller hazırlanmış ve makale revize edilmiştir. Tüm yazarlar makalenin yayınlanmış versiyonunu okumuş ve kabul etmiştir.

KAYNAKLAR

1. Okan, A., Doğanıyigit, Z., Yilmaz, S., Uçar, S., Arıkan Söylemez, E.S., & Attar, R. (2023). "Evaluation of the protective role of resveratrol against sepsis caused by LPS via TLR4/NF- κ B/TNF- α signaling pathways: Experimental study". *Cell Biochemistry and Function*, 41(4), 423-433. <https://doi.org/10.1002/cbf.3790>
2. Rello, J., Valenzuela-Sánchez, F., Ruiz-Rodriguez, M., & Moyano, S. (2017). "Sepsis: a review of advances in management". *Advances in Therapy*, 34(11), 2393-2411. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0622-8>
3. Santos, R.A.S., Sampaio, W.O., Alzamora, A.C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., et al. (2017). "The ACE2/angiotensin-(1-7)/MAS axis of the renin-angiotensin system: focus on angiotensin-(1-7)". *Physiological Reviews*, 97(2), 505-553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016>
4. Zhao, J., Duan, Q., Dong, C., & Cui, J. (2022). "Cul4a attenuates LPS-induced acute kidney injury via blocking NF- κ B signaling pathway in sepsis". *Journal of Medical Biochemistry*, 41(1), 62-69. <https://doi.org/10.5937/jomb0-33096>
5. Lee, S.A., Cozzi, M., Bush, E.L., & Rabb, H. (2018). "Distant organ dysfunction in acute kidney injury: a review". *American Journal of Kidney Diseases*, 72(6), 846-856. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.03.028>
6. Molema, G., Zijlstra, J.G., van Meurs, M., & Kamps, J.A. (2022). "Renal microvascular endothelial cell responses in sepsis-induced acute kidney injury". *Nature Reviews Nephrology*, 18(2), 95-112. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00489-1>
7. Malek, M. (2018). "Brain consequences of acute kidney injury: Focusing on the hippocampus". *Kidney Research and Clinical Practice*, 37(4), 315-322. <https://doi.org/10.23876/j.krcp.18.0056>
8. Ronco, C., Bellasi, A., & Di Lullo, L. (2019). "Implication of acute kidney injury in heart failure". *Heart Failure Clinics*, 15(4), 463-476. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2019.05.002>
9. Tomsa, A.M., Alexa, A.L., Junie, M.L., Rachisan, A.L., & Ciumarnean, L. (2019). "Oxidative stress as a potential target in acute kidney injury". *PeerJ*, 7, e8046. <https://doi.org/10.7717/peerj.8046>
10. Hoste, E.A., Bagshaw, S.M., Bellomo, R., Cely, C.M., Colman, R., Cruz, D.N., et al. (2015). "Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study". *Intensive Care Medicine*, 41(8), 1411-1423. <https://doi.org/10.1007/s00134-015-3934-7>
11. Cai, L., Rodgers, E., Schoenmann, N., & Raju, R.P. (2023). "Advances in rodent experimental models of sepsis". *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9578. <https://doi.org/10.3390/ijms24119578>
12. Karaboga, I., Okuyan, H.M., Dogan, S., Aycicek, S.O., & Cakiroglu, H. (2025). "Ebselen alleviates sepsis-induced acute kidney injury by regulating endoplasmic reticulum stress, apoptosis, and oxidative stress". *Veterinary Medicine and Science*, 11(2), e70318. <https://doi.org/10.1002/vms3.70318>
13. Shareef, M., & Kathem, H. (2022). "Gentiopicroside ameliorates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling in mice model". *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 13(4), 135-145. <https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.04.018>
14. Lu, Q.B., Du, Q., Wang, H.P., Tang, Z.H., Wang, Y.B., & Sun, H.J. (2020). "Salusin- β mediates tubular cell apoptosis in acute kidney injury: involvement of the PKC/ROS signaling pathway". *Redox Biology*, 30, 101411. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101411>
15. Yang, Y., Xu, J., Tu, J., Sun, Y., Zhang, C., Qiu, Z., et al. (2024). "Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc. extracts improve sepsis-associated acute kidney injury by inhibiting NF- κ B-mediated inflammation and pyroptosis". *Journal of Ethnopharmacology*, 319, 117101. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.117101>
16. Dennis, J.M., & Witting, P.K. (2017). "Protective role for antioxidants in acute kidney disease". *Nutrients*, 9(7), 718. <https://doi.org/10.3390/nu9070718>
17. Delanaye, P., White, C.A., Ebert, N., & Rule, A.D. (2020). "Assessing kidney function". *Chronic Kidney Disease*, 37-54.
18. Mortazavi, A., Hosseini, M., Beheshti, F., Hakimi, Z., Vaezi, G.H., & Pour Kargar, H.M. (2024). "The effect of carvedilol on IL-1 β and nitric oxide levels on lipopolysaccharide-induced acute renal injury in male rats". *Journal of Chemical Health Risks*, 14(1).

19. Ozkan, A., Sen, H.M., Sehitoglu, I., Alacam, H., Guven, M., Aras, A.B., et al. (2015). "Neuroprotective effect of humic acid on focal cerebral ischemia injury: an experimental study in rats". *Inflammation*, 38(1), 32-39. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0003-x>
20. Gau, R.J., Yang, H.L., Chow, S.N., Suen, J.L., & Lu, F.J. (2000). "Humic acid suppresses the LPS-induced expression of cell-surface adhesion proteins through the inhibition of NF- κ B activation". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 166(1), 59-67. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.8957>
21. Fouad, A.A., Qutub, H.O., & Al-Melhim, W.N. (2016). "Nephroprotection of punicalagin in rat model of endotoxemic acute kidney injury". *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26(7), 538-543. <https://doi.org/10.3109/15376516.2016.1185065>
22. Niu, X., Wang, C., Li, H., & Chen, W. (2024). "Role of OPG/RANKL/RANK/TLR4 signaling pathway in sepsis-associated acute kidney injury". *BMC Nephrology*, 25(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s12882-024-03725-7>
23. Carter, J.H., Douglass, L.E., Deddens, J.A., Colligan, B.M., Bhatt, T.R., Pemberton, J.O., et al. (2004). "Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis". *Clinical Cancer Research*, 10(10), 3448-3456. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0373>
24. Shou, D.W., Li, Y.R., Xu, X.J., Dai, M.H., Zhang, W., Yang, X., et al. (2023). "Parthenolide attenuates sepsis-induced acute kidney injury in rats by reducing inflammation". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2023, 8759766. <https://doi.org/10.1155/2023/8759766>
25. Tsantariotou, M., Lavrentiadou, S., Psalla, D., Margaritis, I., Kritsepi, M., Zervos, I., et al. (2019). "Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) activity by crocin ameliorates lipopolysaccharide-induced thrombosis in rats". *Food and Chemical Toxicology*, 125, 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.005>
26. Lee, S.J., Borsting, E., Declèves, A.E., Singh, P., & Cunard, R. (2012). "Podocytes express IL-6 and lipocalin 2/neutrophil gelatinase-associated lipocalin in lipopolysaccharide-induced acute glomerular injury". *Nephron Experimental Nephrology*, 121(3-4), e86-e96. <https://doi.org/10.1159/000345546>
27. Moreira, R.S., Irigoyen, M., Sanches, T.R., Volpini, R.A., Camara, N.O., Malheiros, D.M., et al. (2014). "Apolipoprotein AI mimetic peptide 4F attenuates kidney injury, heart injury, and endothelial dysfunction in sepsis". *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(5), R514-R524. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00512.2013>
28. Silveira, M., Capcha, J., Sanches, T., Moreira, R., Garnica, M., Shimizu, M., et al. (2021). "Green propolis extract attenuates acute kidney injury and lung injury in a rat model of sepsis". *Scientific Reports*, 11, 5925. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85438-w>
29. Ozkan, A., Sen, H.M., Sehitoglu, I., Alacam, H., Guven, M., Aras, A.B., et al. (2015). "Neuroprotective effect of humic acid on focal cerebral ischemia injury: an experimental study in rats". *Inflammation*, 38(1), 32-39. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0003-x>
30. Khaled, H., & Fawy, H.A. (2011). "Effect of different levels of humic acids on the nutrient content, plant growth, and soil properties under conditions of salinity". *Soil and Water Research*, 6(1), 21-29.
31. Şehitoğlu, M.H., Öztöpuş, Ö., Karaboğa, İ., Ovalı, M.A., & Uzun, M. (2022). "Humic acid has protective effect on gastric ulcer by alleviating inflammation in rats". *Cytology and Genetics*, 56(1), 84-97. <https://doi.org/10.3103/S0095452722010083>
32. Orlando, P.R., Tavares, H.G., de Souza Pereira, R.R., Silva, G., Carvalho, JdCL., Machado, A.R.T., et al. (2025). "Humic acid derived from agricultural biomass mitigates alveolar bone loss and modulates systemic inflammatory cytokines in rats with periodontitis". *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 25(5), 645-656. <https://doi.org/10.2174/1568026625666230511121122>
33. Tekes, E., Ickin Gulen, M., Silan, C., & Guven Bagla, A. (2025). "Humic acid attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats". *Drug and Chemical Toxicology*, 1-9. <https://doi.org/10.1080/01480545.2025.2415084>
34. Williams, R. (2025). "COVID-19 humic/fulvic acid plus epigallocatechin gallate treatment: a retrospective chart review". *Cureus*, 17(1). <https://doi.org/10.7759/cureus.54087>
35. Hseu, Y.C., Kumar, K.S., Chen, C.S., Cho, H.J., Lin, S.W., Shen, P.C., et al. (2014). "Humic acid in drinking well water induces inflammation through reactive oxygen species generation and activation of NF- κ B/AP-1 signaling pathways: a possible role in atherosclerosis". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(2), 249-262. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.11.017>
36. Piko, N., Bevc, S., Hojs, R., & Ekart, R. (2023). "The role of oxidative stress in kidney injury". *Antioxidants*, 12(9), 1772. <https://doi.org/10.3390/antiox12091772>
37. Akbas, A., Silan, C., Gulpinar, M.T., Sancak, E.B., Ozkanli, S.S., & Cakir, D.U. (2015). "Renoprotective effect of humic acid on renal ischemia-reperfusion injury: an experimental study in rats". *Inflammation*, 38(5), 2042-2048. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0182-2>
38. Hammoud, G.M., Nail, N.S., Abd El-Shafea, Y.M., & Salem, A.A. (2019). "Histopathological study on the protective effect of humic acid against aflatoxins induced-oxidative stress in rats". *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 6(3), 111-127.
39. Krstic, D., Tomic, N., Radosavljevic, B., Avramovic, N., Dragutinovic, V., Skodric, S.R., et al. (2016). "Biochemical markers of renal function". *Current Medicinal Chemistry*, 23(19), 2018-2040. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160411120912>
40. Zanotti-Cavazzoni, S.L., & Goldfarb, R.D. (2009). "Animal models of sepsis". *Critical Care Clinics*, 25(4), 703-719. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2009.07.003>