



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**Yoğun Bakım Ünitesinde COVID-19 Tanısı ile Yatan Hastalardan
Gerçek Zamanlı Olarak Toplanmış Serum ve İdrar Numunelerinde
1H-NMR (Hidrojen - Nükleer Manyetik Rezonans) Metodu ile
Metabolomik Profillemeye Çalışması ve Prognostik Analitlerin İncelenmesi**

DR. EMİR MATPAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. MUSTAFA SERTESER

İSTANBUL-2025



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**Yoğun Bakım Ünitesinde COVID-19 Tanısı ile Yatan Hastalardan
Gerçek Zamanlı Olarak Toplanmış Serum ve İdrar Numunelerinde
1H-NMR (Hidrojen - Nükleer Manyetik Rezonans) Metodu ile
Metabolomik Profilleme Çalışması ve Prognostik Analitlerin
İncelenmesi**

DR. EMİR MATPAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. MUSTAFA SERTESER

İSTANBUL-2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tarih

Emir Matpan

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda asistan hekim olarak görev aldığım süre boyunca eğitimime çokça katkısı olan, bilgi ve deneyimlerini özveriyle paylaşan, kendilerinden çok çeşitli alanlarda işlevsel bilgi ve beceriler edindiğim tüm hocalarıma, en başta hem alanımda etkin bir hekim olarak yetişmemde hem sektörde çevre kazanabilmemde hem de tezimin hazırlanmasında her aşamada yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli tez hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Serteser'e,

Bilimsel alanda kendimi geliştirmeme, sektörel alanda birçok yeniliği öğrenmeme ve merak etmeme büyük katkıları olan Sayın hocalarım Prof. Dr. Muhittin Serdar'a ve Prof. Dr. Fehime Aksungar'a,

Her fırsatta gerek deneyimleriyle gerek pratik çözüm önerileriyle bana yol gösteren ve hem bir laboratuvar uzmanı hem de akademik personel olarak kendimi geliştirebilmemde katkıları olan Labmed Merkez Laboratuvar hekimlerimiz Sayın Doç. Dr. Aysun Toker'e ve Sayın Dr. Neslihan Yıldırım Saral'a,

Tez sürecimde hem yol gösterici olan hem de laboratuvar analizlerinin devamlılığı konusunda bana çokça destek sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a,

Beraberinde her fırsatta değerli yönlendirmeleriyle bana akademisyenliğin ve bilimin önemini göstermeye çalışan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Aysel Özpınar'a,

Son olarak, beni özveriyle yetiştiren, bugünlere gelmemi sağlayan aileme ve en önemlisi her zaman desteğini hissettiğim, yanımda olan ve varlığıyla güç veren eşim Dyt. Dilara Çınar Matpan'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi bünyesinde bulunan Acıbadem Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (ABAPKO) tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2023-2148).

Dr. Emir Matpan
İSTANBUL, 2025

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
RESİMLER LİSTESİ.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	12
ABSTRACT	13
1 GİRİŞ VE AMAÇ	14
2 GENEL BİLGİLER	18
2.1 Sars-CoV-2 Virüs Özellikleri ve Morfolojisi	18
2.2 Koronavirüs Hastalığı 2019 (COVID-19) Patofizyolojisi.....	20
2.2.1 Virüsün Hücreye Girişi ve Çoğalması.....	20
2.2.2 SARS-CoV-2 Virüs Kaynaklı Akciğer Hasarı ve İmmünolojik Yanıt....	21
2.2.3 SARS-CoV-2 İlişkili Sitokin Fırtınası.....	24
2.2.4 SARS-CoV Kaynaklı Akciğer Dışı Patolojiler.....	25
2.3 Yoğun Bakım Süreçlerinde COVID-19 Hastalığı.....	26
2.4 Metabolomik ve COVID-19 İlişkili Metabolit Çalışmaları.....	28
2.4.1 Metabolomik Tanımı ve Önemi.....	28
2.4.2 Metabolomik Çalışmalarında Nükleer Manyetik Rezonans (NMR).....	29
2.4.2.1 NMR Tanımı ve Ölçüm Prensipleri.....	29
2.4.2.2 Metabolomik Alanında NMR Yönteminin Rolü ve Önemi.....	30
2.4.3 COVID-19 Hastalığının Araştırılmasında NMR.....	31
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1 Çalışma Tasarımı ve Katılımcılar.....	34
3.2 ¹ H-NMR Spektroskopisi İçin Numune Hazırlık Süreci.....	35
3.3 ¹ H-NMR Spektroskopisi ile Numune Analizleri.....	36
3.4 İstatistiksel Analiz ve Veri Yorumlama.....	37

4	BULGULAR.....	40
4.1	ST, PS ve Vefat Gruplarında 1H-NMR Analizi ile Metabolik Farklılıklar	40
4.2	Prognoz, Zaman ve Etkileşim Faktörlerine Dayalı Anlamli Paternlerin Tanımlanması.....	49
4.3	Önemli Metabolik Yolak Değişiklikleri.....	54
5	TARTIŞMA.....	58
5.1	Kritik COVID-19’da Serum Analizleri: Anlamli Prognostik Metabolitler	59
5.2	Kritik COVID-19’da İdrar Analizleri: Anlamli Prognostik.....	65
6	SINIRLILIKLAR.....	73
7	SONUÇ	74
8	KAYNAKLAR.....	75
9	EKLER.....	92
9.1	Etik Kurul Onayı.....	92
10	ÖZGEÇMİŞ	93

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

1H-NMR	Hidrojen - Nükleer Manyetik Rezonans
ACE2	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
ANOVA, ASCA	Varyans Analizi, ANOVA – Eş Zamanlı Bileşen Analizi
APACHE II	Akut Fizyoloji ve Kronik Sağlık Değerlendirmesi II
ARDS	Akut Respiratuar Distres Sendromu
CPMG	Carr–Purcell–Meiboom–Gill
CRP	C-reaktif protein
HPLC - QTOF - MS	Yüksek Basıncılı Likid Kromatografi - Quadrupole Uçuş Zamanlı - Kütle Spektrometresi
IFN, IL-6, TNF- α	Interferon, İnterlökin – 6, Tümör Nekrozis Faktör - Alfa
iPCA	Etkileşimli Temel Bileşen Analizleri
KEGG	Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi
LC/GC-MS	Likid/Gaz Kromatografi – Kütle Spektrometresi
Leverage/SPE	Kaldıraç/Kare Tahmin Hatası
MCP-1	Monosit Kemotaktik Protein - 1
MDA5	Melanoma Farklılaşma İlişkili Protein 5
NOESY	Nükleer Overhauser Etkisi Spektroskopisi
OPLS-DA	Ortogonal Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizleri
OSCI	Klinik İyileşme İçin Ordinal Skala
PASC	COVID-19'un Post-Akut Sekelleri
PRRs	Patent Tanıma Reseptörleri
RdRp	RNA Bağlı RNA Polimeraz
RIG-I	Retinoik Asit ile İndüklenebilir Gen I
SARS-CoV	Şiddetli Akut Solunum Sendromu - Koronavirüsü
ssRNA, dsRNA	Tek Sarmal RNA, Çift Sarmal RNA
ST, PS	Sağlıklı Taburcu, Polinöropatik Sendrom
STOCSY	İstatistiksel Toplam Korelasyon Spektroskopisi
TLRs	Toll-Like Reseptörleri
TMAO	Trimetilamin-N-oksit
TMPRSS2	Transmembran Serin Proteaz Tip 2
YBÜ	Yoğun Bakım Ünitesi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. (a) Serum analizleri için iPCA 3D skor grafiğinde, prognostik gruplar renklerle, örnek toplama zamanları ise şekillerle gösterilmiştir (toplam varyans: %42.4, PC1>PC2>PC3). **(b-d)** Yoğun bakım COVID-19 hastalarının serum analizlerinde, örnek toplama zamanına göre prognostik grupların (ST, PS, Vefat) ayrımını gösteren 2D OPLS-DA skor grafikleri.....41

Şekil 2. (a) İdrar analizleri için iPCA 3D skor grafiğinde, prognostik gruplar renklerle, örnek toplama zamanları ise şekillerle gösterilmiştir (toplam varyans: %34.7, PC1>PC2>PC3). **(b-d)** Yoğun bakım COVID-19 hastalarının idrar analizlerinde, örnek toplama zamanına göre prognostik grupların (ST, PS, Vefat) ayrımını gösteren 2D OPLS-DA skor grafikleri42

Şekil 3. (a) İki yönlü ANOVA, serum analizlerine dayalı prognoz, toplama zamanı ve etkileşim faktörlerine göre anlamlı metabolit sayılarını gösteren bir Venn diyagramı ile sunulmuştur. **(b-e)** Tirozin, kreatin, fenilalanin ve formik asidin prognostik gruplara (ST, Vefat, PS) ve örnek toplama zamanlarına (0, 1., 2., 3. zaman noktaları) göre değişen göreceli miktarlarını gösteren kutu-bıyık/ box-whisker grafikleri.....45

Şekil 4. (a) İki yönlü ANOVA, idrar analizlerine dayalı prognoz, toplama zamanı ve etkileşim faktörlerine göre anlamlı metabolit sayılarını gösteren bir Venn diyagramı ile sunulmuştur. **(b-g)** Taurin, 3-hidroksivalerik asit, D-laktoz, formik asit, arjinin ve malik asidin prognostik gruplara (ST, Vefat, PS) ve örnek toplama zamanlarına (0, 1., 2., 3. zaman noktaları) göre değişen göreceli miktarlarını gösteren kutu-bıyık/ box-whisker grafikleri.....47

Şekil 5. (a, b) Serum ve idrar örneklerinde, metabolit değişimlerinin zaman (0, 1., 2., 3. zaman noktaları) ve prognostik gruplar (ST, Vefat, PS) arasındaki temel paternleri ve etkileşimlerini gösteren scree grafikleri. Skorlar, gruplar arasındaki açıklanabilir varyans yüzdesini temsil etmektedir.....50

Şekil 6. (a, b) Serum ve idrar analizlerinde, zaman, prognoz ve etkileşimlerine ilişkin ASCA alt modellerine ait leverage/SPE (kaldıraç/kare tahmin hatası) dağılım grafikleri. Kırmızı alandaki metabolitler anlamlı paternlerle uyumlu, mavi alandakiler ise aykırı değerleri temsil etmektedir.....51

Şekil 7. (a, b) Serum ve idrar örneklerinde ASCA analizlerine dayalı permütasyon testleri ile model doğrulama grafikleri. ‘ $p<0.05$ ’ eşğine göre iki analizde de yalnızca prognoz faktörü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.....53

Şekil 8. (a, b) Serum ve idrar metabolitleri için prognostik grupları tahmin eden random forest değişken önem grafikleri. Daha yüksek ortalama doğruluk düşüşü, metabolitin tahmindeki önemini gösterirken, kırmızı yüksek, mavi ise düşük önemi ifade etmektedir.....54

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. COVID-19 Moleküler ve Hücresel Patogenez Diagramı; a) SARS-CoV-2 virüsünün içerdiği yapısal proteinler: spike protein (S), nükleokapsid protein (N), membran protein (M) ve kılıf/ envelope proteini (E). **b)** S proteininin S1 bölgesi kullanılarak, konak hücredeki ACE2 reseptörüne bağlanma aşaması (aşama 1). Bu, TMPRSS2'nin S proteinini kesmesine (aşama 2) ve erime için S2 bölgesini etkinleştirmesine (aşama 3) yol açar. Aktive edilmiş S2 yardımıyla virüs ve konak hücre membran tabakaları birleşerek viral RNA'nın konak hücreye girişi sağlanmış olur (aşama 4). **c)** Viral replikasyon ile çift sarmallı/ double stranded RNA (dsRNA) replikasyon ara ürünlerini oluşturur, bu da MDA5 veya RIG-I'nin aktivasyonu yoluyla immün sistemi etkinleştirerek MAVS aracılı sinyal kaskadını başlatır ve sonunda tip I ve tip III interferonların üretimine yol açar. Üretilen bu interferonlar, plazma membran reseptörleri ve JAK-STAT1/2 sinyal kaskadı aracılığıyla otozin ve parakrin şekilde etki eder ve doğrudan ya da dolaylı olarak antiviral işlevlere sahip interferon uyarılı genlerin/ interferon stimulated genes (ISG) üretimine yol açar (1).....19

Resim 2. COVID-19 ile ARDS Hastalarındaki İnflamatuvar Süreçlerin Mekanistik Karşılaştırması; her iki durumda da hücresel, interstisyel ve kan kompartmanlarında bağışıklık hücreleri ve mediyatörler aktif rol oynamaktadır. COVID-19'da, SARS-CoV-2 enfeksiyonu IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin üretimi artmakta, trombosit aktivasyonu ve D-dimer yükselmesi ile belirgin bir hiperkoagülasyon durumu gözlemlenmektedir. ARDS'de ise akut akciğer hasarı direkt veya dolaylı yollarla gelişirken, inflamatuvar süreç daha şiddetli seyretmekte ve IL-6, TNF- α gibi sitokinler daha belirgin bir artış göstermektedir. Ayrıca, COVID-19'da lenfosit sayısında azalma ve nötrofil aktivasyonunda artış izlenirken, ARDS'de bu hücresel değişiklikler daha çeşitlidir (2).....23

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Hastalara ait demografik veriler. Yaş ve yoğun bakım ünitesinde yatış süre verileri ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur.....35

Tablo 2. Serum ve idrar örnekleri için prognostik gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren metabolitlerin etki büyüklüklerini gösteren doğrusal kovaryat/ linear covariate analiz sonuçları. Tek yıldız ile hem iki yönlü ANOVA hem de ASCA'da anlamlı olanlar, çift yıldız ile yalnızca ANOVA'da anlamlı olanlar belirtilmiştir. Pozitif değerler artışı, negatif değerler azalışı göstermektedir.....39

Tablo 3. Tablo, serum ve idrar örneklerinde hem iki yönlü ANOVA hem de ASCA analizlerinde anlamlı farklılık gösteren metabolitleri içermektedir. Metabolitler, prognoz, örnek toplama zamanı ve etkileşim faktörlerine göre sınıflandırılmıştır. ANOVA'da $F > 2.5$ ve $p < 0.05$ olan metabolitler, ASCA'da ise iyi modellenmiş leverage/SPE oranlarına sahip ve $p < 0.05$ değerine ulaşan metabolitler seçilmiştir. Serumda kreatin ve tirozin, idrarda taurin, 3-hidroksivalerik asit ve formik asit prognoz açısından anlamlı bulunmuş ve yıldız ile belirtilmiştir.....44

Tablo 4. Serum ve idrar örnekleri için KEGG yolak analizleri, prognoz, örnek toplama zamanı ve etkileşim faktörlerine göre yapılan ANOVA ve ASCA analizlerine dayanarak; ST, PS ve Vefat gruplarında etkilenen metabolik yolları göstermektedir. PS ve Vefat arasında anlamlı değişiklik bulunmamıştır. Serumda kreatin ve tirozin, idrarda taurin ve formik asit düzeylerindeki farklılıklara bağlı etkilenen metabolik yollar tek yıldızla gösterilmiştir.....56

ÖZET

Yoğun Bakım Ünitesinde COVID-19 Tanısı ile Yatan Hastalardan Gerçek Zamanlı Olarak Toplanmış Serum ve İdrar Numunelerinde 1H-NMR (Hidrojen - Nükleer Manyetik Rezonans) Metodu ile Metabolomik Profillemeye Çalışması ve Prognostik Analitlerin İncelenmesi

Giriş: COVID-19'a neden olan SARS-CoV-2 virüsünün küresel etkisi, özellikle varyantların ortaya çıkışıyla artarak devam etmektedir. Virüsün belirgin metabolik etkilerini belirlemeyi hedefleyen kapsamlı metabolomik çalışmalar, yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) kritik COVID-19 hastaları için prognoza dayalı izlem yapılmasının, tedavi sonuçlarını optimize etmede hayati önem taşıdığını göstermektedir. **Yöntem:** Bu çalışmada, Nisan 2020'de YBÜ'de tedavi gören kritik COVID-19 hastalarından toplanan ve üç prognostik gruba ayrılan (sağlıklı taburcu (ST), polinöropatik sendrom (PS) ve Vefat) hastaların metabolomik profillerindeki zamansal değişiklikler hem serum hem de idrar örnek analizleriyle eş zamanlı olarak incelenmiştir. Toplamda, her hastadan düzenli aralıklarla toplanan dört serum ve dört idrar örneklerinden oluşan 32 serum ve 32 idrar örneği, -80°C 'de saklanmış ve proton nükleer manyetik rezonans (1H-NMR) spektroskopisi kullanılarak analiz edilmiştir. **Bulgular:** İki yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ANOVA-eşzamanlı bileşen analizi (ASCA) ile serum analizlerinde, kreatin ve tirozin; idrar analizlerinde ise taurin, 3-hidroksivalerik asit ve formik asit seviyeleri arasında prognostik gruplar arasında anlamlı ($p < 0.05$) farklılıklar tespit edilmiştir. Ayrıca, denetimli rastgele orman (random forest) analizlerinde, prognoza dayalı gruplandırmada serum karşılaştırmaları için %21.9'luk ve idrar için %40.6'luk hata oranıyla başarılı tahminler sağlamıştır. Özellikle, serumda PS grubunda kreatin, Vefat grubunda tirozin; idrarda ise PS grubunda taurin, 3-hidroksivalerik asit ve formik asit seviyeleri en yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, hem idrar hem de serum analizlerinde zamansal olarak hiçbir metabolitin anlamlı bir değişim göstermediği izlenmiştir. Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) veritabanı kullanılarak yapılan metabolik yol analizlerinde, farklı prognostik gruplar arasında en çok etkilenen yolların ($p < 0.05$) serum için "fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi", idrar için 'taurin ve hipotaurin metabolizması' olduğu görülmüştür. **Sonuç:** Güncel çalışma, aşısız ve farklı prognostik gruplardan hastaların zamansal metabolomik analizlerine duyulan ihtiyacı vurgulamakta ve kritik COVID-19'un metabolik etkilerine ilişkin değerli bilgiler sağlamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Kritik COVID-19, 1H-NMR, gerçek zamanlı seri analizler, metabolomik

ABSTRACT

Metabolomic Profiling and Analysis of Prognostic Markers in Real-Time Collected Serum and Urine Samples from COVID-19 Patients in the Intensive Care Unit Using ¹H-NMR (Hydrogen-Nuclear Magnetic Resonance) Method

Background: The global impact of SARS-CoV-2 which causes COVID-19, remains significant, being intensified by the emergence of variants. Comprehensive metabolomic studies aimed to elucidate the distinctive metabolic footprint of the virus. For critically ill patients with COVID-19 in the intensive care unit (ICU), longitudinal monitoring based on their prognosis is crucial to optimize treatment outcomes. **Methods:** This study examined the temporal changes in the metabolomic profiles of critically ill COVID-19 patients treated in the ICU in April 2020, categorized into three prognostic groups: healthy discharged (HD), polyneuropathic syndrome (PS), and Exitus. A total of 32 serum and 32 urine samples, collected at regular intervals (four serum and four urine samples per patient) and stored at -80°C , were analyzed using proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy. **Results:** Two-way analysis of variance (ANOVA) and ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA) revealed significant ($p < 0.05$) prognostic differences in serum levels of creatine and tyrosine, as well as urine levels of taurine, 3-hydroxyvaleric acid, and formic acid. Additionally, supervised random forest analyses demonstrated accurate prognosis-based classification, with an out-of-bag error rate of 21.9% for serum samples and 40.6% for urine samples. Specifically, creatine levels were highest in the PS group, while tyrosine levels were highest in the Exitus group for serum. Similarly, taurine, 3-hydroxyvaleric acid and formic acid levels were highest in the PS group for urine. However, no significant temporal changes were observed for any metabolite in either serum or urine analyses. Additionally, metabolic pathway analysis using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database indicated that the most significantly impacted pathways ($p < 0.05$) were “phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis” for serum and “taurine and hypotaurine metabolism” for urine analyses. **Conclusion:** This study underscores the need for time-series metabolomic analyses in unvaccinated patients with different prognostic outcomes and provides valuable insights into the metabolic impacts of critical COVID-19.

Keywords: Critical COVID-19, ¹H-NMR, real-time series analyses, metabolomics

1 GİRİŞ VE AMAÇ

COVID-19 hastalığı SARS-CoV-2 virüsü ile enfekte olmuş hastalarda ortaya çıkmış ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından pandemi olarak kabul edilmiş bir salgın hastalıktır. COVID-19 pandemisinin ortaya çıkışından günümüze (Ağustos 2024) kadar tüm dünyada ortalama 776,007,251 kişiyi etkilediği ve 7,059,007 kişinin ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir (3). Gün geçtikçe COVID-19 enfeksiyonuna bağlı izlenen kötü prognoza sahip klinik seneryolar azalsa da yıllar içinde virüsün mutasyonu sonucu ortaya çıkan varyantlar (Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), Lambda (C.37), Mu (B.1.621) ve Omicron (B.1.1.529)) halen çeşitli enfeksiyon durumlarına, klinik tablolara ve hastane başvurularına sebep olmaktadır (4).

SARS-CoV-2 ile enfekte olduğu belirlenen hasta gruplarına daha iyi tedaviler sunabilmek adına hasta bazlı prognostik süreçlerin daha iyi analiz edilmesi gerekmektedir. Hastalık sürecini prognostik farkları (klinik şiddet sınıflandırması, dünya sağlık örgütünün Klinik İyileşme İçin Ordinal Skala/ Ordinal Scale of Clinical Improvement (OSCI) veya Akut Fizyoloji ve Kronik Sağlık Değerlendirmesi II/ Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II)) skorlarını gözeterek yürütmek hem sağlık profesyonellerinin hasta hakimiyetini kolaylaştıracak hem de hastalara kendilerine daha uygun tedavileri bulmalarını sağlayacaktır (5–7). Ayrıca, yine sağlık sistemindeki tıbbi materyal ve tedavi edici ilaç kullanımlarını da daha akılcı hale getirebilmeyi sağlayarak hem ülke ekonomisine hem de sağlık sisteminin verimli kullanılmasına olanak sağlayacaktır (8).

SARS-CoV-2 virüsü kaynaklı COVID-19 hastalığının klinik etki yelpazesinin incelendiği ve buna bağlı prognostik gruplamaların yapıldığı, dünya genelinde birçok farklı çalışma literatürde mevcuttur (9,10). Bu çalışmaların bazıları hastalığın etkilediği bireylerin klinik durumlarından yola çıkarak bazıları ise biyokimyasal mekanizmaları ve metabolik düzeyde patofizyolojik (11) etkileri incelemeyi hedefleyerek hastalar arası prognostik ayrım sağlamaya çalışmıştır (12).

Günümüzde bu alanda yapılan çoğu çalışma değerlendirildiğinde SARS-CoV-2 enfekte COVID-19 hastalarına ait numuneler dahil edilerek yapılmış birçok metabolomiks (12) ve proteomiks (13) çalışmaları mevcuttur; ancak bu çalışmalar gerek metodlarındaki ve seçilen hasta gruplarındaki farklılıklar gerekse de numunelerin toplanış zamanı ve prognostik süreçlerin dahil edilmesindeki farklılıklar durumlarıyla çalışmamızdan ayrılmıştır. Ayrıca, çalışmada toplanan örneklerin pandeminin başladığı süreçte (Nisan 2020) toplanmış olmasıyla, çeşitli ileri tedavi ajanlarından (14,15) veya ilerleyen süreçlerde ortaya konmuş aşı uygulamalarından (14–17) ortaya çıkabilecek analitik interferans etkilerinin de dışlanmasıyla, hastalığın metabolik boyuttaki özgün patofizyolojik etkisinin aydınlatılmasına katkı sağlamıştır.

Günümüze kadar yapılmış bazı proton nükleer manyetik rezonans/ proton nuclear magnetic resonance (1H-NMR) spektroskopisi çalışmalarında, COVID-19 hastalarına ait serum veya plazma örnekleri kullanılarak metabolik parmak izi çıkarılmaya çalışılarak, belirli aminoasitlerin görev aldığı metabolik yollardaki bozukluklar taranmış ve bunların bazılarının özellikle glutamate-glutamin döngüsü (GABA Döngüsü) (18,19), mitokondriyal enerji yolak bozuklukları (20), dallı zincirli aminoasit (lösin,izolösin,valin) metabolizma yolları (6,21) veya interlökin fırtınasına (22) sebebiyet verecek immunolojik yolak bozukluklarının hepsinin etkilenebileceği belirlenmiştir (23). Buna karşın, bu çalışmalarda bu hastaların serum (11) veya plazmaları (24) üzerinden sonuçlar elde edilmiş ve idrar örneklerinde aynı analitlere ait değişimler araştırılmamıştır. Ayrıca, yine yapılan çalışmalarda bu örnekler belirlenen hastalardan belirli aralıklarla bir trend oluşturularak, yani gerçek zamanlı olarak toplanmamıştır.

Güncel literatür tarandığında COVID-19 benzeri viral enfeksiyonlarda artmış kan şekeri veya hormon salınım bozuklukları gibi karbonhidrat metabolizması ve nöroendokrin yolların etkilendiğine dair bulguların gösterilmesine rağmen (25), yapılan bu çalışmalarda diğer karbonhidrat türevlerinin (Gliserol, D-Galaktoz, vb.) metabolik değişimlerine ait herhangi bir veri ortaya konmamıştır.

Farklı metodolojiler kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda ise Trimetilamin-N-oksit (TMAO) gibi amid türevlerinin seviyelerindeki azalmaları ve pürinik asit gibi ketoasitler ile süksinik asit gibi karboksilik asitlerin artışlarını gösteren bulgulara ulaşılmış, ancak bu çalışmalar hem sınırlı sayıdaki metabolik analitteki değişimleri gösterir (23) şekilde sonuçlanmış hem de idrar ve serum örneklerinin korele bir şekilde incelenerek, karşılaştırılması süreçleri olmamıştır.

COVID-19 hastalığı kompleks etki mekanizması dolayısıyla insan vücuduna ait farklı numune matrislerinde çeşitli metabolik dalgalanmalar yapabileceği literatürde farklı çalışmalarda ileri sürülmüştür (26). Ancak aynı çalışmada, alkol ve türevlerinin, keton cisimcikleri ve türevlerinin, şekerler ve türevlerinin, sülfonların, karboksilik asitler ve amino asitler ile türevlerinin aynı anda serum ve idrar örneklerinde kapsamlı olarak çalışılıp, birbirleriyle olan korelasyonlarının belirlenmesinin hem hasta içi hem de hastalar arası metabolik dalgalanmalar değerlendirilecek şekilde yapıldığı bir çalışma literatürde izlenmemiştir (26).

Yüksek Basınçlı Likid Kromatografi - Quadrupole Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi/ High-Performance Liquid Chromatography - Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (HPLC - QTOF – MS) metodu kullanılarak planlanmış ve COVID-19 hastalarını ayakta, kısa yatış süreli, uzun yatış süreli ve yoğun bakım koşulları gerektiren şeklinde sınıflayarak yapılan metabolik çalışmalar (27) olmasına rağmen, bu çalışmalar sadece çalışmaya dahil edilen hastaların plazma matrislerindeki metabolik değişkenleri saptamış ve veriler bu hastalardan bir trend belirlenerek gerçek zamanlı olarak toplanmamıştır. Ayrıca, direk yoğun bakım hasta örneklerini de prognostik süreçlerine göre değerlendirerek hem idrar hem de serum matrislerinde ayrı ayrı inceleyerek, aralarındaki metabolit değişim ilişkilerini gerçek zamanlı toplanmış numuneler üzerinden bir trend belirleyerek, ¹H-NMR yöntemi ile inceleyen bir çalışma olmamıştır.

Yapılan çalışmada SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş farklı prognoza sahip yoğun bakım hastalarına (sağlıklı taburcu, polinöropatik sendrom ve vefat) ait metabolit dalgalanmaları hem zamansal hem de prognostik farklılıklar gözetilerek araştırıldı ve

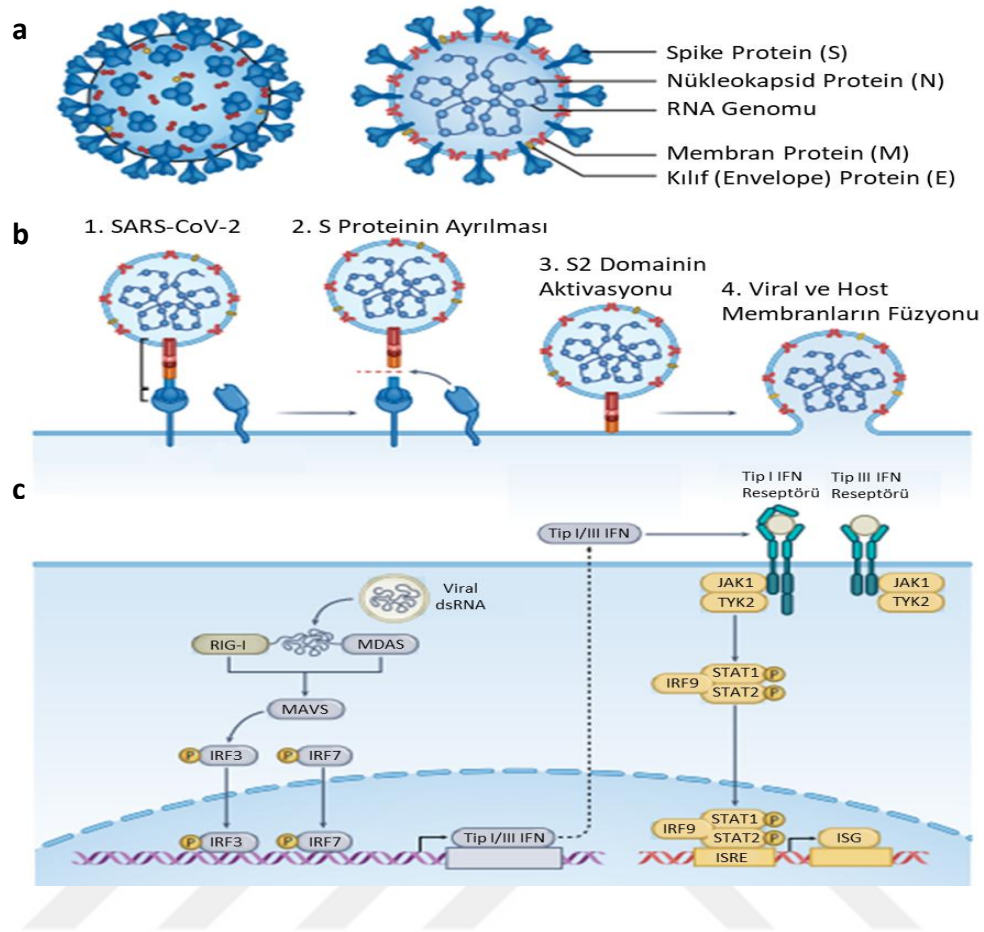
bu farklılıkların hem idrar hem de serum matrikslerindeki durumları da aynı çalışma kapsamında ayrı ayrı ¹H-NMR ile değerlendirildi. İlaveten, çalışmaya dahil edilecek olan hasta örneklerinin toplanış tarihleri (10.04.2020-28.04.2020) göz önüne alındığında, pandeminin ilerleyen süreçlerinde üretilen çeşitli aşılardan (Sinovac, Biontech, vs.) immünolojik interferans etkileri de önlenmiş bir şekilde analiz yapılmış olduğundan, çalışma bu yönleriyle ayrıca literatürde yapılan önceki çoğu metabolomiks/proteomiks çalışmalarından farklılığını ve özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Dahası, aynı hastaya ait farklı numune matriksleri kullanılarak ele alınan metabolit dalgalanmalarının görülmesi, ve bunun hastanın kendisi ile benzer prognoza sahip diğer hastalarla sonuç kıyaslamaları yapılarak korelasyon verilerinin aydınlatılması, kritik durumdaki COVID-19 hastalarını prognostik olarak sınıflandırılabilen metabolik biyobelirteçlerin ortaya çıkarılmasını da sağlayabilecektir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Sars-CoV-2 Virüs Özellikleri ve Morfolojisi

Coronaviridae ailesi mensubu olan koronavirüsler insanlar ve hayvanlar için yaygın patojenlerdir. İnsanlar için endemik olabilecek bazı türleri (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 ve HCoV-HKU1) sadece üst solunum yollarını tutarak soğuk algınlığına sebebiyet verebileceği gibi (28), bazı zoonotik koronavirüs türleri (şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü/ severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), orta doğu solunum sendromu koronavirüsü/ middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) ve en güncel olarak SARS-CoV-2 (29,30)) hayvan rezervuarlarından insanlara aktarıldıktan sonra büyük çaplı enfeksiyonlara sebebiyet vermişlerdir (31,32).

Tek sarmallı RNA genomuna sahip SARS-CoV-2 virüsü, 2019 yılı sonlarında Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkmış ve enfekte ettiği bireylerde yorgunluk, ateş, kuru öksürük, halsizlik, boğaz ağrısı, tat ve/veya koku kaybı ve bazı durumlarda nefes darlığı, ishal ile zatürre benzeri belirtilerle prezente olabilecek bir viral etkindir (29,32). Virüse ait membran proteini, nükleokapsid proteini, kılıf proteini ve spike glikoproteini gibi yapısal proteinlerin yanı sıra, virüsün replikasyon ve transkripsiyon süreçlerini destekleyici yapısal olmayan proteinleri de mevcuttur (**Resim 1a**). Yapısal proteinler asıl olarak virüsün enfekte edeceği hücre ile teması, bağlanması ve viral RNA'nın konak hücre içine geçişinden sorumluyken; yardımcı proteinler ise konak hücrenin ve enfekte edilen hostun bağışıklık sisteminden kaçış aktivitelerini yürütür (33). SARS-CoV-2 virüsünün tropizminin (farklı virus türlerinin farklı hücre/doku kültürlerini enfekte edebilme yeteneği) asıl kaynağı virus yüzeyinde lokalize spike glikoproteinleridir ve bu proteinler iki alt üniteden (S1 ve S2) oluşur; S1 alt ünitesi konak hücre yüzeyindeki anjiyotensin dönüştürücü enzim 2/ angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) bağlanmayı sağlarken, S2 alt ünitesi ise hücre zarı füzyonunu sağlar (34).



Resim 1. COVID-19 Moleküler ve Hücresel Patogenez Diagramı; a) SARS-CoV-2 virüsünün içerdiği yapısal proteinler: spike protein (S), nükleokapsid protein (N), membran protein (M) ve kılıf/ envelope proteini (E). **b)** S proteininin S1 bölgesi kullanılarak, konak hücredeki ACE2 reseptörüne bağlanma aşaması (aşama 1). Bu, TMPRSS2'nin S proteinini kesmesine (aşama 2) ve erime için S2 bölgesini etkinleştirmesine (aşama 3) yol açar. Aktive edilmiş S2 yardımıyla virüs ve konak hücre membran tabakaları birleşerek viral RNA'nın konak hücreye girişi sağlanmış olur (aşama 4). **c)** Viral replikasyon ile çift sarmallı/ double stranded RNA (dsRNA) replikasyon ara ürünlerini oluşturur, bu da MDA5 veya RIG-I'nin aktivasyonu yoluyla immün sistemi etkinleştirerek MAVS aracılı sinyal kaskadını başlatır ve sonunda tip I ve tip III interferonların üretimine yol açar. Üretilen bu interferonlar, plazma membran reseptörleri ve JAK-STAT1/2 sinyal kaskadı aracılığıyla otozin ve parakrin şekilde etki eder ve doğrudan ya da dolaylı olarak antiviral işlevlere sahip interferon uyarılı genlerin/ interferon-stimulated genes (ISG) üretimine yol açar (1).

2.2 Koronavirüs Hastalığı 2019 (COVID-19) Patofizyolojisi

2.2.1 Virüsün Hücreye Girişi ve Çoğalması

SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu ve damlacık yoluyla bulaşı olan COVID-19 hastalığı virüsün üst solunum yollarındaki mukozal hücrelere bağlanmasıyla ortaya çıkar. SARS-CoV-2 virüsünün mukozal hücrelere bağlanması, patofizyolojisi ve etki mekanizmasını da açıklamakta kullanılan, ACE2 adlı reseptörler üzerinden gerçekleşmektedir (34). ACE2 reseptörleri, solunum yolunda görevli mukozal hücrelere ilaveten akciğerler, kalp, bağırsaklar ve böbreklere ait çeşitli dokular üzerinde de konumlanmaktadır. SARS-CoV-2 virüsünün asıl hedefi olan ACE2 reseptörü virüsün spike proteinine bağlanarak virüsün hücreye tutunması ve girişinin ilk adımlarını oluşturur (33) **(Resim 1b)**. İlaveten, ACE2 reseptörünün genetik varyantlarındaki farklılıklar, spike proteinine karşı farklı derecelerde bağlanma afinitesine sahiptir. Özellikle, bazı ACE2 varyantları ile spike protein arasındaki yüksek afiniteye sahip mutant kompleksler, bireyin enfeksiyona olan duyarlılığını etkileyebilir (35).

Spike protein, SARS-CoV-2 virüsünün bağlandığı hücreye giriş sürecinde kilit bir role sahiptir ve virüsün enfeksiyon sürecinin ortaya çıkmasına sebep olacak farklı bir dizi olayı da tetikler (29). Virüsün entegrasyonu ve enfeksiyon sürecinin ortaya çıkmasını sağlayan spike protein ile ACE2 reseptör bağlantısının yanı sıra; neuropilin 1 gibi koreseptörler, ayrıca TMPRSS2 (Transmembran Serin Proteaz Tip 2), cathepsin L, TMPRSS11D ve TMPRSS13 gibi proteazlar da spike protein regülasyonu (viral S1-S2 protein kompleksinin S2 kısmından kesimin sağlanması ile virus ve konak lipid çift tabakalarının füzyonu) ve aktivasyonunda önemli role sahip protein yapılı enzimlerdir (36). Virüs proteini ve konak hücre reseptörü arasındaki bağlantı sonrası hücre içine veziküler endositoz ile viral içerik (RNA) aktarılarak hücresel enfeksiyon ve viral çoğalma zemini sağlanmış olur.

SARS-CoV-2 virüsü hücre içine çoğalmasını sağlayacak RNA'sını aktardıktan sonra, RNA bağlı RNA polimeraz/ RNA dependent RNA polimerase (RdRp) enzimi ile virüs RNA'sı çoğaltılır ve yeni RNA iplikçikleri sentezlenir (çift sarmal RNA yapısı

üzerinden tek sarmal yeni RNA genom yapılarının sentezi). Yine virüsün çoğalma sürecinde, RNA'nın çift sarmal yapısını açma görevi için helikazlar, hatalı veya zarar görmüş nükleotidleri kesmek ve düzeltmek için egzonükleazlar/ endonükleazlar ve virüsün protein kısımlarının (özellikle spike protein aktivasyonu için önemli basamak) kesilmesi/ düzenlenmesi için proteaz tipi enzimler görevlidir (36,37).

2.2.2 SARS-CoV-2 Virüs Kaynaklı Akciğer Hasarı ve İmmünolojik Yanıt

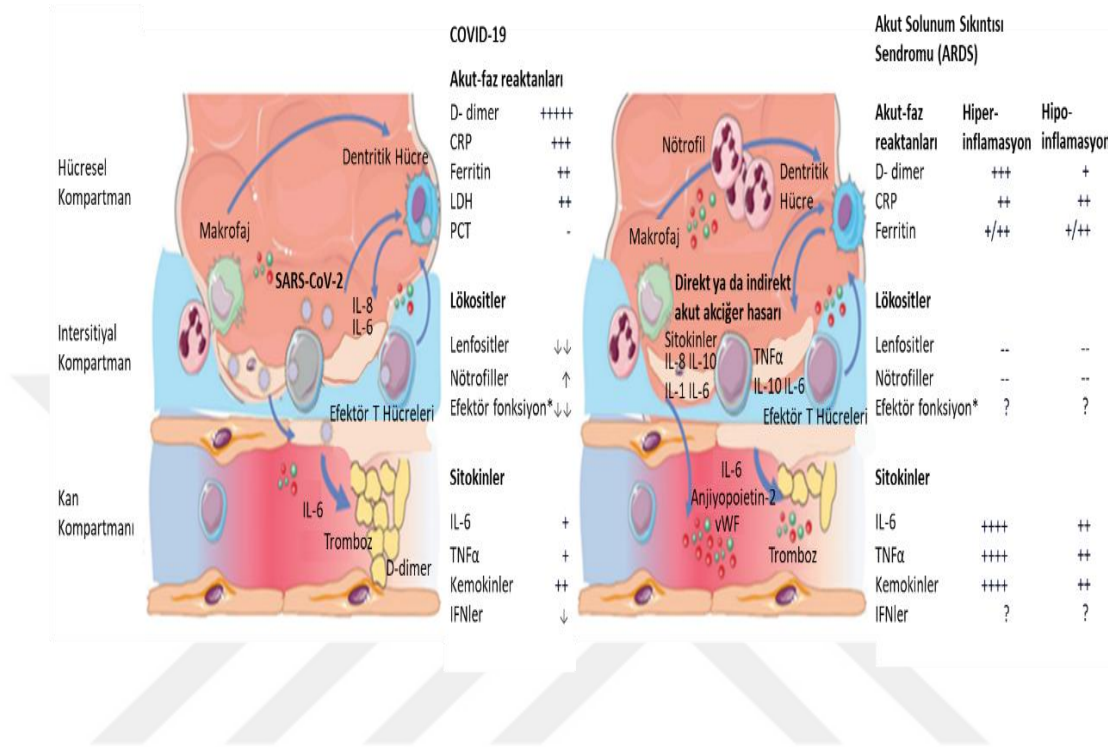
Damlacık yolu ile bulaşan SARS-CoV-2 virüsünün konak ile ilk temasında enfekte ettiği ilk hücresel yapılar nazofarengeal, trakeal veya nazal olfaktuar bölgede bulunan mukozal hücrelerdir ve virüsün kuluçka dönemi ortalama 3 ile 14 gün arasında değişmekte olup, bağışıklık durumuna göre değişir (38). Konak hücre ile füzyon ve ssRNA'nın ilgili hücreye aktarımı sonrası viral replikatör proteinlerin sentezi hücre endoplazmik retikulum membranından köken alarak başlatılır. Çift membranlı hücresel veziküller içinde bir ara basamak olarak gerçekleşen ssRNA yapısından dsRNA yapısına dönüşüm, hücre genetik materyalinin sitoplazmik Patent Tanıma Reseptörleri/ Pattern Recognition Receptors (PRRs) tarafından belirlenmesine imkan tanıyabilir (39). Melanoma Farklılaşma ilişkili Protein 5/ Melanoma Differentiation-Associated Protein 5 (MDA5) veya Retinoik Asit ile İndüklenebilir Gen I/ Retinoic Acid-Inducible Gene I (RIG-I) reseptörleri, sitoplazmik PRRs arasında SARS-CoV-2 virüsünü en iyi tanıyabilen reseptörler olarak bilinir ve virüsün geçici uzun dsRNA genetik materyalini algıladıktan sonra tip I (IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω) ve tip III (IFN- λ 1–4) interferon üretimini başlatır (40) (**Resim 1c**).

İnterferonlar ve kemokinler hücrelerin bağışıklık sistemi yanıtının temel sinyallerini oluşturan sitokinler olup ve hem epitel hücrelerden hem de lokal immune hücreler (nötrofil, makrofaj, vb.) tarafından endozomal toll-benzeri reseptörleri/ toll-like receptors (TLRs) ve enfeksiyona sebebiyet veren etkenin (SARS-CoV-2) karşılaşması sonucu üretimleri tetiklenir (41). İnterferonlar, antiviral hücresel yanıtı başlatmak için otokrin veya parakrin yoldan interferon bazlı genlerin üretimini tetikleyerek antiviral aktivitenin başlamasını sağlar (38). Aynı zamanda, sitokinlerin üretimi enfeksiyona sebebiyet veren viral etkenlerin elimine edilmesine yardımcı olan

adaptif B ve T hücrelerinin üretimini başlatır. İlgili viral etken konaktan elimine edilemez ise, üst solunum yolu kaynaklı viral partiküllerinin trakeobronşiyal hat boyunca yavaş yayılımı ve alt solunum yolu enfeksiyonu tablosuna dönüşümüne sebebiyet verebilir. Alt solunum yolları yayılımı ile enfekte alveoller (Alveolar tip 1 (AT1) ve alveolar tip 2 (AT2) hücreler) O₂/CO₂ değişiminin yani doku oksijenizasyon regülasyonunun bozulmasına ve pulmoner yüzey gerilimini azaltan sürfaktan üretiminin engellenmesine sebep olur (7,42).

SARS-CoV-2 ile enfekte akciğer dokusu hafiften ciddi düzeye kadar farklı şekillerde klinik görünümüne sahip olabilir ve bu özellikle enfekte bireyde görülen nefes darlığının (dispne) dolayısıyla doku hipoksemisinin şiddetiyle ilişkilidir (42) Ciddi COVID-19 hastalarında nefes darlığı ve hipoksemi oluşumu sonrası, ilerleyici solunum yetmezliği ve devamında Akut Respiratuar Distres Sendromu/ Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) görülmesi olasıdır. ARDS, akciğerde inflamasyon ve pulmoner vasküler kaçak tabloları ile kendini gösteren; ilerleyici oksijenizasyon bozukluğuna sebep olmuş bir akciğer hasarı tablosudur (7). Aslında, ARDS klinik bir tanıdır ve tanıda 2014 yılında yayınlanan Berlin Kriterleri kullanılmaktadır. Bu kriterler kısaca; akut başlangıçlı (genellikle risk faktörlerine maruziyetten sonraki 7 gün içinde) veya kötüleşen solunumsal semptomlar, ağır hipoksemi (PaO₂/FiO₂ ile tanımlanan orta-şiddetli oksijenizasyon bozukluğu, pozitif ekspirasyon sonu basıncı/ positive end-expiratory pressure (PEEP) > 5 cm H₂O ve PaO₂/FiO₂ < 200 mmHg) ve kalp yetmezliği ya da sıvı fazlalığı ile açıklanamayacak bilateral radyografik opasitelerin izlenimiyle karakterizedir (42,43). COVID-19 tanılı hastaların hipoksemik solunum yetmezliği ile seyredenleri, sistemik hiperinflamasyon belirtileri ve buna sebep olan pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF) salınımının artışı ve rutin laboratuvar parametrelerinden D-dimer (44), ferritin (45) ve C-reaktif protein (CRP) (44) gibi inflamatuvar belirteçlerin de yüksek konsantrasyonlarının saptanmasıyla prezente olur. İlaveten, hastane yatışları sırasında takip edilen serum IL-6, IL-8 ve TNF seviyeleri, hastanın mortalite takibi için güçlü ve bağımsız belirleyicilerdir (6,22). COVID-19 ve ARDS durumlarının hücresel, interstisyel ve kan kompartmanlarındaki akut faz reaktantları (D-dimer, CRP ve

ferritin), lökositler (nötrofil ve lenfositler) ve sitokinler (IL-6, TNF α ve kemokinler) üzerinde yapabileceği çeşitli değişiklikler **Resim 2**'de ayrıca prezente edilmektedir.



Resim 2. COVID-19 ile ARDS Hastalarındaki İnflamatuvar Süreçlerin Mekanistik Karşılaştırması; her iki durumda da hücresel, interstisyel ve kan kompartmanlarında bağışıklık hücreleri ve mediyatörler aktif rol oynamaktadır. COVID-19'da, SARS-CoV-2 enfeksiyonu IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin üretimi artmakta, trombosit aktivasyonu ve D-dimer yükselmesi ile belirgin bir hiperkoagülasyon durumu gözlemlenmektedir. ARDS'de ise akut akciğer hasarı direkt veya dolaylı yollarla gelişirken, inflamatuvar süreç daha şiddetli seyretmekte ve IL-6, TNF- α gibi sitokinler daha belirgin bir artış göstermektedir. Ayrıca, COVID-19'da lenfosit sayısında azalma ve nötrofil aktivasyonunda artış izlenirken, ARDS'de bu hücresel değişiklikler daha çeşitlidir (2).

2.2.3 SARS-CoV-2 İlişkili Sitokin Fırtınası

Sitokin fırtınası kandaki belirli pro-inflamatuar sitokinlerin ani artışıyla sonuçlanan ve viral patogenezi şiddetlendirerek sepsise, ARDS'ye veya çoklu organ yetmezliğine neden olabilen patolojik bir durumdur. Sitokin fırtınası benzeri durumlar SARS, MERS, H5N1/H7N9 etkenleri ile ve diğer solunum yolu virüslerinde de gözlemlenebilmektedir (46). SARS-CoV-2 ile ilişkili, aşırı sitokin üretimi ve çoklu organ yetmezliği ile karakterize sitokin fırtınası, sekonder hemofagositik sendrom veya hemofagositik lenfositosis sendromuyla benzerlik göstermektedir (47). COVID-19 hastalığına sahip bireylerde; IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-18, granülosit koloni uyarıcı faktör/ granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), monosit kemotaktik protein/ monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, MCP-3, makrofaj inflammatuar protein 1 alfa/ macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1A), IFN- γ ve TNF- α gibi birçok serum sitokini yükselmiş olarak izlenebilir (48). Özellikle IL-6, TNF- α ve IFN- γ sitokinlerindeki yükselişlerin, viral enfeksiyonlara bağlı sitokin fırtınasının temel özelliği olduğu görülmektedir (38). Ayrıca, SARS-CoV-2 tarafından indüklenen sitokin fırtınası, T yardımcı hücreleri tarafından salınan IL-4 ve IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin artışı ile de ilişkilidir. Ancak, şiddetli SARS-CoV-2 enfeksiyonu durumunda hem toplam T hücre sayısı hem de CD4 $^{+}$ ve CD8 $^{+}$ T hücre alt grup sayıları daha hafif vakalara göre önemli ölçüde düşük saptanabilir (49). Bu durum, özellikle ciddi ve kritik COVID-19 hastalarında yüksek düzeyde T hücre kaybı olduğunu ve hastalık ciddiyeti ile total T hücre sayısı arasındaki negatif ilişkiyi göstermektedir. İlave olarak, sitokin fırtınası için önemli role sahip ve üç farklı sınıftan oluşan interferonlar (Tip I: IFN- α , β ve ω ; Tip II: IFN- γ ; Tip III: IFN- λ) çeşitli sinyal yolları üzerinden farklı dokularda aktivite gösterirler. Örneğin, Tip I interferonlar çeşitli organlardaki endotel hücrelerde belirgin şekilde görülürken; IFN- λ mide, bağırsak ve akciğerlerin epitel hücrelerinde belirgindir, ancak merkezi sinir sistemi ve dalakta sınırlı aktiviteye sahiptir. Nötrofiller ise viral yayılmayı baskılamak için yüksek düzeyde IFN- λ sekrete ederken, vücudun antiviral yanıtını güçlendirmek adına IFN- α ve IFN- β gibi bazı tip I interferonları da üretebilir. Şiddetli COVID-19 vakalarında ise, IFN- α ve IFN- β gibi Tip I interferonlar ile IFN- γ (Tip 2) 'nın, daha hafif vakalara göre önemli ölçüde düşük olduğu

belirlenerek (41), SARS-CoV-2 enfeksiyonunun şiddetli vakalarda vücudun interferon üretimini inhibe ettiğini, altında yatan mekanizma hala belirsizliğini korumasına rağmen, düşündürmüştür.

2.2.4 SARS-CoV-2 Kaynaklı Akciğer Dışı Patolojiler

SARS-CoV-2 virüsü kaynaklı COVID-19 hastalığının akciğer dışında farklı organ ve sistemler üzerinde (multisistemik) çeşitli etkileri mevcuttur. Kardiyovasküler, renal, gastrointestinal, nörolojik, endokrine, dermatolojik ve hematolojik sistemler üzerinde çeşitli patolojik bozukluklara sebebiyet verdiği farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalarda izlenen kardiyovasküler komplikasyonlar arasında, doğrudan viral invazyon veya inflamatuvar yanıt nedeniyle miyokardiyal hasar (50), miyokardit ve aritmiler gibi tablolar görülmüş iken; ciddi vakalarda akut koroner sendroma (51) yatkınlık bildirilmiştir.

Ayrıca, virüsün hiperkoagülabileiteyi tetikleyerek derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner emboli (PE) riskini de artırabildiği bildirilmiştir (52). COVID-19 kaynaklı böbrek tutulumu olan hastaların önemli bir kısmında böbrek fonksiyon parametrelerinin (Yüksek serum kreatinini, artmış kan üre azotu (BUN) veya düşük glomerüler filtrasyon hızı (GFR)) bozulması ile birlikte akut böbrek hasarı gelişir ve hastalarda erken belirtiler olarak proteinüri ve hematüri izlenebilir (53). Bu durum, virüsün böbrek hücrelerine verdiği harabiyet, sitokin fırtınası veya sistemik hipoksi sonucu ortaya çıkabilir ve hastalık ciddiyeti ile pozitif korelasyona sahiptir (54). Özellikle ciddi COVID-19 hastalığı ile hospitalize olmuş ve ileri tedavi koşulları gerektiren vakalarda, kreatin ve kreatinin gibi böbrek fonksiyonlarını gösterir metabolitlerde anlamlı yükseklikler bildirilmiştir (22). Gastrointestinal sistemle ilgili olarak da hastalarda ishal, bulantı ve kusma gibi non-spesifik bulgular izlenebilmektedir. Bu durum, gastrointestinal sistemdeki ACE2 reseptörlerinin varlığıyla ilişkilendirilebilir. Ayrıca, yüksek karaciğer enzimleri (ALT ve AST) ile birlikte karaciğer hasarının ve sistemik inflamasyonun izlendiği vakalarda görülmüştür (55). SARS-CoV-2 virüsü doğrudan veya dolaylı yollar ile sinir sistemini geniş bir yelpazede etkileyerek nörolojik komplikasyonlara da yol açabilmektedir. Bu

komplasyonlar, bař ağrısı ve anosmi (koku kaybı) gibi hafif semptomlardan ensefalopati ve hiperkoagölabilite kaynaklı inme gibi daha ciddi komplasyonlara kadar uzanan bir skalada değişebilmektedir (56,57). Dahası, SARS-CoV-2 virüsü kaynaklı periferik sinir hasarı sonucu ortaya çıkan ve bir tür polinöropatik sendrom olan Guillain-Barré Sendromu (GBS) da bazı ciddi COVID-19 hastalarında nadir de olsa görölmüştür (57,58). Ayrıca, yoğun inflamasyona bağlı immün sistemdeki değişiklikler, viral yükün kalıcılığı, latent virüslerin yeniden aktif hale gelmesi, doku hasarı, mikropıhtılaşma, endotel işlev bozukluğu, mitokondriyal disfonksiyon, metabolik değişiklikler, akciğer fonksiyon değişiklikleri, hormonal değişiklikler veya otonom sinir sistemi düzensizlikleri gibi çeşitli sebeplere bağlı ortaya çıkabilen "uzun COVID" ve "COVID-19'un post-akut sekelleri/ post-acute sequelae of COVID-19 (PASC)" durumlarında da bu nörolojik etkilerin nasıl seyredeceği üzerine araştırmalar yapılmaktadır (59). COVID-19'un endokrin ve metabolik etkileri değerlendirildiğinde ise, özellikle hiperglisemiye yol aarak diyabet hastalarının genel durumunu daha da kötüleştirebileceği bildirilmiştir (60). Virüs, bu etkiyi pankreasta lokalize beta hücrelerine zarar vererek ya da sistemik inflamasyon yoluyla insülin direncini artırarak tetikleyebilir veya kötüleştirebilir (61). Ayrıca, literatürde bazı hastalarda otoimmün veya inflamatuvar etkilere bağlı olarak subakut tiroidit gelişimi de olduğu bildirilmiştir (62). Hastalığın yaratabileceği hematolojik bozukluklar arasında ise özellikle lenfopeni ve trombositopeni tabloları görölmekte ve bunlar genellikle hastalığın ciddiyetiyle ilişkilidir. Ek olarak, ciddi COVID-19 vakalarında yaygın damar içi pıhtılaşma/ disseminated intravascular coagulation (DIC) gibi ölümcül kanama ve pıhtılaşma durumları da ortaya çıkabilir (63).

2.3 Yoğun Bakım Süreçlerinde COVID-19 Hastalığı

COVID-19 pandemisi, hastalığın 2020 yılındaki ilk dalga sürecinde yoğun bakım ünitesine (YBÜ) yatışlarda ciddi artışlara sebebiyet olmuştur. Hastalık ilişkili YBÜ'ne yatışlar ise genellikle ARDS, septik şok veya çoklu organ yetmezliği ile ilişkili olarak izlenmiştir. Ciddi hastalarda görölen bu tabloların düzensiz bir bağışıklık yanıtı ile karakterize olduğu ve sitokin fırtınası (IL-6, IL-1 β , TNF- α , vb.) ile hiperinflamasyon tablolarına yol aatığı bildirilmiştir (64). Ciddi COVID-19 hastalarında görölen

özellikle ARDS kaynaklı solunum yetmezliğinin yanı sıra, yoğun bakım ünitesi hastalarında sıklıkla kardiyovasküler komplikasyonlar da (Miyokardit, aritmiler, tromboembolik olaylar ve hiperkoagülabilité kaynaklı venöz tromboembolizm) izlenmektedir (65). Ayrıca, yine bu hastalarda akut böbrek hasarının, hastaların %40'ı kadarında görülebildiği ve hatta böbrek yetmezliği tablosuna ilerleyebileceği gösterilmektedir (66). Hatta, bu komplikasyonların ve hastalık ciddiyetinin COVID-19'a ait farklı varyantlar ile enfeksiyon durumunun farklı şekilde prezante olabileceğini gösteren çalışmalar da literatürde bulunmaktadır (67–70). Bu yayınlarda belirtildiği üzere, omicron varyantının daha düşük ölüm oranları ve daha kısa yoğun bakım süreleri, daha hafif bir klinik seyir gösterdiği ve bundan dolayı, delta varyantına kıyasla yoğun bakım kaynaklarına daha az yük getirdiği söylenmektedir (67,71). Dünyadaki farklı ülkelerde yapılan farklı çalışmalar ile COVID-19 virüsünün delta ve omicron varyantları karşılaştırıldığında, yoğun bakım tedavisi gerekli hasta gruplarında, kaynak kullanımında da önemli farklar olduğu ortaya koyulmuştur. Özellikle, delta varyantı daha kötü komplikasyonlar ve yüksek ölüm oranlarına yol açarken, omicron varyantı daha olumlu klinik seyirlerle ilişkilendirilmiş ve yoğun bakım ünitelerinin kaynak kullanımının daha verimli yönetilebilmesini sağlamıştır (70).

Yoğun bakım ünitesinde tedavi gören bu ciddi veya kritik hastaların tedavi süreçlerinin temelini ise solunum desteği oluşturmaktadır ve bu destek non-invaziv ek oksijen desteğinden, invaziv mekanik ventilasyona kadar geniş bir yelpazede uygulanabilmektedir (71). Yüzüstü pozisyonlama, kortikosteroidler (deksametazon gibi) ve antikoagülasyon tedavisi de, yoğun bakımda mortaliteyi azaltmaya ve oksijenlenmeyi iyileştirmeye yardımcı olan standart tedaviler olarak gösterilmektedir (72). Hatta, dirençli hipoksemisi olan hastalar için ekstrakorporeal membran oksijenasyonu da gerekli olabilmektedir (73). Bu uygulamalara rağmen, bu hasta gruplarında ölüm oranlarının %25-30 kadar yüksek olduğu bildirilmiştir (74). Ayrıca, tedavi sürecinde sitokin fırtınasına karşı hedefe yönelik ajanlar olan tosilizumab (IL-6 reseptör blokörü) ve barisitinib (JAK inhibitörü) gibi anti-inflamatuarların da YBÜ'de tedavi gören hastalarda daha iyi prognostik süreçler elde etmek amacıyla kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır (75). Uygulanan tedavilere rağmen, ciddi COVID-19 hastaları

hastalığın akut süreci sonrası kalıcı komplikasyonlardan dolayı uzun süreli rehabilitasyona ihtiyaç duyabilmektedir. Özellikle YBÜ’de tedavi görmüş hastalarda taburculuktan sonra izlenen ve genellikle solunumsal veya nörolojik bulgular ile izlenen post-COVID-19 durumları da ciddi hastaların tedavi süreçlerinin iyileştirilmesi ve hızlandırılması gerekliliklerini göstermektedir (74). Ayrıca, ciddi hastalarda komorbiditelerin taburculuk sonrası uzun vadeli prognozlar üzerinde önemli belirleyiciler olduğu ve bu yüzden, bu hastaların YBÜ süreçlerini yönetmek için multidisipliner yaklaşımların önemi çeşitli çalışmalarda öne sürülmektedir (76).

2.4 Metabolomik ve COVID-19 İlişkili Metabolit Çalışmaları

2.4.1 Metabolomik Tanımı ve Önemi

Metabolomik; hücreler, dokular, biyolojik sıvılar veya organizmalar içindeki küçük moleküllerin, yani metabolitlerin kapsamlı bir şekilde niceliksel ve niteliksel analizi olarak tanımlanabilir (77). Genellikle incelenen metabolitler (yağ asitleri, amino asitler, şekerler, nükleotitler, sülfonlar, ketonlar veya organik asitler) hücresel süreçlerin son ürünlerini temsil eder. Analizlerin dinamik yapısı sayesinde farklı matrislerdeki fizyolojik metabolit değişimlerinin gerçek zamanlı izlenmesinde özellikle değerlidir. İlaveten; genetik, çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin doğrudan metabolitler üzerinde yarattığı değişiklikleri de saptayarak hangi metabolik yollarda hangi analitler üzerinden etkiler oluştuğunu da tespit edebilmesi açısından oldukça değerlidir (77).

Genomik, transkriptomik ve proteomik gibi daha geniş bir "omik" bilimleri yelpazesinin bir parçası olan metabolomik, sağlık ve hastalıkların temelinde yatan komplike biyokimyasal yolak değişimlerini anlamaya odaklanmıştır. Bu araştırmalar kapsamında, incelenen biyolojik örnekte bulunan metabolitlerin taranması, tanımlanması, miktarlarının ve değişimlerinin belirlenmesi ile yorumlanması, NMR spektroskopisi (24,78) veya LC/GC-MS (24,79,80) gibi ileri analitik teknikler kullanılarak gerçekleştirilir.

Metabolomik uygulamaları; biyobelirteç (6) ve ilaç keşifleri (81), yolak analizleri (13), kişiselleştirilmiş tıp, hastalık teşhisi (82), beslenme ve çevre uygulamaları (79) gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Metabolomik en umut verici uygulamalarından biri biyobelirteç keşfidir. Metabolik çalışmaların en önemli kullanım alanlarından olan ve çalışmamız kapsamında da kullandığımız hastalıkların erken teşhisi için yeni biyobelirteçler tanımlayabilmek ve metabolik süreçlerin nasıl düzenlendiğini, bunların sağlık ve hastalık durumlarına nasıl katkıda bulunduğunu yolak analizleri üzerinden bütüncül şekilde anlatabilmek, bu tip kapsamlı araştırmaların kritik önemini ortaya koymaktadır (77). Özellikle, hakkında araştırma yapılan hastalıklar ile ilgili metabolomik profil çıkarma (kansere alt tipleri, nörodejeneratif hastalıklar, metabolik bozukluklar, enfeksiyon etkenlerine bağlı değişimler) veya bu hastalıklar ile ilgili hastalık spesifik biyobelirteçlerin tanımlanabilmesi; ilgili hastalık durumları açısından değerli teşhis ve prognoz araçları sağlayarak kişiselleştirilmiş tıpta farklı tedavi stratejileri uygulayabilmeye yardımcı olabilir (20).

2.4.2 Metabolomik Çalışmalarında NMR

2.4.2.1 NMR Tanımı ve Ölçüm Prensipleri

NMR, manyetik alan altında çekirdeklerin rezonans özelliklerini analiz ederek kimyasal, fiziksel, biyolojik ve hatta medikal uygulamalarda bilgi sağlayan ileri düzey bir spektroskopi yöntemidir. Bu yöntem, özellikle hidrojen (^1H), karbon (^{13}C), azot (^{15}N) ve fosfor (^{31}P) gibi manyetik momente sahip atom çekirdeklerinin hareketlerini inceleme prensibine dayanır (83). NMR ölçüm sisteminin temel bileşenleri sırasıyla; manyetik alan üreten cihaz (süper iletken mıknatıs), RF (radyo frekansı) iletici ve dedektörü, örnekleme sistemi ve veri işleme yazılımıdır (84). Manyetik alan üreten cihaz, güçlü ve sabit bir manyetik alan üretir ve bu alan, çekirdeklerin manyetik momentlerini hizalamak için gereklidir. Üretilen manyetik alanın şiddeti, NMR cihazının duyarlılığını ve çözünürlüğünü belirler. Radyo frekansı ileticinin oluşturduğu sinyaller, manyetik alanda hizalanmış çekirdekleri uyarak enerji seviyeleri arasında geçiş yapmalarını sağlar. Ardından, bu çekirdeklerden yayılan

enerji sinyalleri de dedektör tarafından algılanır. Analizi yapılacak örneklerin cihaza yüklenmesi öncesinde, manyetik özelliklerini etkilemeyecek bir solvent içinde (ör. D₂O veya CDCl₃) çözülerek, 5 mm çapında NMR tüplerine yerleştirilir ve daha sonrasında örnekleme sistemi üzerinden ilgili cihazda analizlere başlanır. Analizlerin son aşamasında ise, veri işleme yazılımı yardımıyla algılanan sinyaller Fourier dönüşümü ile işlenerek frekans spektrumuna dönüştürülür. Elde edilen spektrumdan kimyasal kayma, spin-spin bağlantısı (J-coupling) veya entegrasyon benzeri bilgiler elde edilir (85).

2.4.2.2 Metabolomik Alanında NMR Yönteminin Rolü ve Önemi

NMR, metabolomik çalışmalarında kullanılan en önemli iki yöntemden biri olup, diğer bir yöntem olan MS ile tamamlayıcı bir rol oynar. NMR'ın metabolomik analizlerdeki yetkinliği şu temel özelliklere dayanmaktadır:

- Non-destrüktif ve yüksek tekrarlanabilirlik özelliği: NMR analizleri sırasında örnek fiziksel olarak değişmez ve beraberinde örneğin tekrarlı ölçümlerine olanak tanır. Bu özelliği sayesinde uzun vadeli biyomarker takibi ve standartlaştırılmış analizlerde daha çok tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (86).

- Kalitatif ve kantitatif analiz yapabilme özelliği: NMR, metabolitlerin hem kimyasal yapısını tanımlamada (kalitatif analiz) hem de metabolitlerin konsantrasyonlarını doğru bir şekilde ölçmede (kantitatif analiz) kullanılır. Bunun temel sebebi, NMR sinyal yoğunluğunun doğrudan molekül konsantrasyonu ile orantılı olmasıdır (85).

- Çoklu matris uygunluğu: NMR analizlerinde; kan, idrar, bos veya hücre kültürü süpernatantları gibi çok çeşitli biyolojik matrisler kullanılabilir (87).

- Yapısal bilgi sağlama özelliği: NMR, moleküler düzeyde metabolitlerin yapılarını çözümlmek ve bununla özellikle yeni metabolitlerin tanımlanması veya bilinmeyen bileşiklerin kimyasal yapı analizlerinin yapılmasında kritik bir rol oynar (85).

NMR metodu yukarıda sıralanan çeşitli avantajlarının yanında bazı sınırlamalara da sahiptir:

- Düşük hassasiyet: Özellikle MS yöntemi ile kıyaslandığında, NMR'ın hassasiyeti nispeten düşüktür. Ancak, modern yüksek alanlı (600 MHz ve üzeri) NMR cihazlarının kullanımı ve kriyojenik problemlerin entegrasyonu ile bu dezavantaj büyük ölçüde giderilmiştir (88).

- Maliyeti ve işletim gereksinimleri: NMR cihazlarının yüksek maliyeti ve uzman kullanıcı gerekliliği, erişimi sınırlayan faktörlerdendir. Ancak, veri paylaşımı ile merkezileştirilmiş platformların (MetaboHub) yaygınlaşması bu sınırlamaları aşmada yardımcı olmaktadır (89).

Kısaca, NMR spektroskopisi metabolomik çalışmalarda metabolitlerin tanımlanması ve miktarlarının ölçülmesinde, ayrıca biyolojik sistemlerin bütüncül olarak anlaşılmasında kritik bir role sahiptir. Özellikle, gelişen teknoloji ve veri analizi yöntemleri ile NMR'ın metabolomik sahasındaki etkinliğinin daha da artması beklenmektedir. Özellikle, MS yöntemi ile entegre yaklaşımlar ve yapay zeka tabanlı büyük veri analizleri ile NMR metabolomik çalışmaların merkezinde kalmaya devam edecektir (86).

2.4.3 COVID-19 Hastalığının Araştırılmasında NMR

COVID-19 hastalığının moleküler düzeyde anlaşılması ve hastalığın teşhis, prognoz ve tedavisinde ilerleme kaydedilmesi amacıyla metabolomik yaklaşımlar giderek daha fazla önem kazanmıştır. Bu bağlamda, NMR spektroskopisi COVID-19 hastalığının moleküler mekanizmalarını ve etkilediği organizmadaki değişen metabolik yolları belirlemek ve beraberinde, biyobelirteçler keşfetmek ve yeni tedavi protokolleri geliştirebilme süreçlerini desteklemek için güçlü bir araç olarak kullanılmıştır. NMR metodu ayrıca, plazma, serum ve idrar gibi çeşitli biyolojik sıvılardaki metabolik değişikliklerin analizinde de kritik rol oynamaktadır (24).

COVID-19 hastalarında, NMR metodu ile yapılan çeşitli metabolik analizlerde; bağışıklık tepkilerinin, inflamasyon ve enerji metabolizması ilişkili metabolik yolların değiştiği izlenmiştir ve bu değişimler, hastalık şiddetiyle ilişkili biyobelirteçlerin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (6). Özellikle, enerji metabolizması ile ilişkili D-fruktoz, laktik asit ve süksinik asit gibi metabolitlerin COVID-19 hastalarında artmış olduğu; buna karşın guanosin monofosfat, sitrik asit ve 2-palmitoil-gliserol gibi metabolitlerin ise azalmış olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiş ve devamında hastalık ciddiyeti ile ilişkilendirilmiştir (90). Bu durum, hücresel enerji veriminin enfeksiyon durumunda değiştiği ve dalgalanmalara sebep olabileceğini ortaya çıkarmıştır (11). Enerji ve karbonhidrat metabolizması üzerinde virüsün yarattığı etkiler gibi; trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, pürin metabolizması ve poliaminler ile nikotinamid metabolitleri de hastalık tarafından etkilenen metabolit ve metabolik yollar olarak değerlendirilmiştir (13). Diğer bir enerji metabolizması ilişkili metabolit grubu olan açilkarnitinler (yağ asitlerinin (FA) mitokondriye β -oksidasyon için girişinde görevli) ise COVID-19 ilişkili hafif ve ağır hasta gruplarında karşılaştırılmış ve ağır hastalık grubunda anlamlı düzeyde arttıkları bulunmuştur (80). Yine aynı çalışmada ağır hasta gruplarında, hafif hasta grupları ve kontrol grubuna göre β -oksidasyon sonucu üretilen ve enerji metabolizmasında görevli keton cisimciklerinin de daha çok arttığı gösterilmiştir. İlaveten, laktat/piruvat oranının oksijen yetersizliği ve hücresel stresin bir göstergesi olarak farklı prognoza sahip COVID-19 hastalarında belirgin şekilde değişmiş olduğunu gösterir çalışmalar da literatürde bulunmaktadır (91).

Amino asit profillerindeki değişimler değerlendirildiğinde ise, özellikle glutamin ve arginin seviyelerindeki değişimler, bağışıklık yanıtı ve inflamatuvar süreçlerle ilişkilendirilmiştir. SARS-CoV-2 pozitif ile negatif (kontrol) grupların karşılaştırıldığı bazı çalışmalarda, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla biyojenik aminlerin (histidin, triptofan ve 3-metilhistidin) enfekte grupta azaldığı gözlemlenmiştir. Yine aynı entegratif çalışmalarda hastalık grubunda azalan lipoprotein bileşikleri arasında plazma apolipoprotein A1 ve apolipoprotein A2'nin yer almakta olduğu ve dolayısıyla hastalık tanısındaki önemi ortaya konmuştur (92). Ek olarak, sağlıklı kontrol grubu ile SARS-CoV-2 enfekte pozitif hastalar arasında aromatik amino asitlerden olan fenilalanin ve tirozin seviyelerine ilişkin değişiklikler de tespit edilmiştir. Özellikle, tip

2 diyabet veya karaciğer/böbrek yetmezliği gibi kronik hastalıklara sahip COVID-19 hasta gruplarında bu aromatik amino asitlerin seviyelerinin çok daha fazla arttığı ve bu durumun karaciğerin katabolik fonksiyonundaki azalma veya insülin direnci sebepli tirozin aminotransferaz enziminin baskılanması faktörlerinden dolayı olabileceği öne sürülmüştür (80,92). Ayrıca, özellikle şiddetli COVID-19 durumunda, pro-enflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-1 β ve TNF- α gibi) belirgin şekilde arttığı, buna karşın T lenfositlerinin azaldığı çeşitli metabolomik çalışmalarda gösterilmiştir (93).

Kısaca, NMR spektroskopisi, COVID-19'un metabolik düzeyde anlaşılması, hastalığın tanısal ve prognostik belirteçlerinin tanımlanması, tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi veya ilaç etkinliklerinin takibi gibi çeşitli alanlarda farklı çalışmalarda kullanılmıştır. Özellikle hızlı ve tekrarlanabilir analiz sağlayabilmesi, büyük ölçekli klinik çalışmalar ve bireysel hasta takibi için yöntemin kullanabilirliği açısından büyük avantajlar sunmaktadır.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışma Tasarımı ve Hastalar

Çalışmamızda, metabolomik analizler için eş zamanlı olarak toplanmış serum örnekleri (n = 32) ve idrar örnekleri (n = 32), ¹H-NMR yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. İlgili örnekler, Nisan 2020’de düzenli aralıklarla (0 (10 Nisan 2020), 1. (13 Nisan 2020), 2. (17 Nisan 2020) ve 3. (20 Nisan 2020) zaman noktalarında, her hasta için dört serum ve dört idrar örneği olarak) toplanmış ve analizlerine kadar –80°C’de muhafaza edilmiştir. Örnekler, kritik COVID-19 nedeniyle durumu kötüleşen ve YBÜ’ye destekleyici bakım için yatırılan hastalardan (n = 8; dört erkek ve dört kadın; 48–77 yaş arası) alınmıştır. Bu hastalar farklı prognostik süreçlerine göre gruplandırılmıştır: sağlıklı taburcu (ST, n = 4), polinöropatik sendrom (PS, n = 2) ve Vefat (n = 2). PS tanılı hasta grubu, YBÜ sürecindeki klinik değerlendirmelerinde distal kas zayıflığı, kas atrofi, uyuşma, karıncalanma, yanma hissi gibi duyuşsal bozukluklar, azalmış-kaybolmuş refleksler veya Guillain-Barré sendromu benzeri bulgular gösteren hastalardan oluşmaktadır. Ayrıca, tüm hastalar Dünya Sağlık Örgütü Klinik İyileşme için Ordinal Ölçek (OSCI) (6) skoruna göre klinik olarak kritik (5-8 puan aralığı) olarak sınıflandırılmıştır.

Tüm hastalarda, nazal sürüntüler kullanılarak (vNAT® Transfer Tüpü, Bioeksen Moleküler Diagnostikleri) RT-qPCR yöntemiyle (CFX96 Touch Real-Time PCR Belirleme Sistemi, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD; Bio-Speedy® COVID-19/Flu RT-qPCR Kit, Bioeksen Moleküler Diagnostikleri, İstanbul, Türkiye) SARS-CoV-2 enfeksiyonu pozitif olarak doğrulanmıştır. Prognostik gruplandırmalar, YBÜ tedavisi sonunda hastaların durumlarına göre yapılmıştır. PS ve Vefat grupları açısından, analiz için uygun örnek toplama zamanları, yeterli örnek miktarı ve örneklerin değerli örnek oluşu gibi durumlar değerlendirilerek, sınırlı sayıdaki hasta örnekleri kullanılarak çalışma tasarlanmıştır. Sonuç olarak, dört farklı hastadan, dört farklı zaman noktasında eş zamanlı olarak toplanan 16 serum ve 16 idrar örneği olacak şekilde toplamda 32 örnek PS ve Vefat hasta grupları kapsamında çalışmaya dahil edilmiştir. Benzer şekilde, ST grubu, yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş dört farklı hastadan aynı

zaman noktalarında toplanan 16 serum ve 16 idrar örneği olacak şekilde toplanan, toplamda 32 örnekten oluşmaktadır. ST grubu örnekleri, pandeminin başlamasından önce (aşılama veya farklı ilaç etkileşimleri olmaksızın) gerçek zamanlı olarak toplanmış ve kritik COVID-19 hastalarında serum ve idrar örneklerindeki spesifik metabolik etkileri ve metabolit değişimlerini belirlemek açısından değerli kabul edilerek, çalışmamıza dahil edilmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda ST grubu kontrol grubu olarak kabul edilmiş, ancak sağlıklı kontrol grubu olarak değerlendirilmemiştir. Ayrıca, çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, cinsiyet, YBÜ kalış süresi ve prognostik durumları gibi demografik bilgilerde **Tablo 1**'de sunulmuştur.

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik verileri. Yaş ve yoğun bakım ünitesinde yatış süre verileri ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur.

Prognostik Gruplar	Toplam Hasta Sayısı	Toplam Örnek Sayısı	Yaş (Yıl)	Cinsiyet	YBÜ Yatış Süresi (Gün)
Sağlıklı Taburcu	4	16 Serum/ 16 İdrar	61.75 $\pm$ 11	2 E/2 K	16.5 $\pm$ 3.5
Polinöropatik Sendrom	2	8 Serum/ 8 İdrar	63 $\pm$ 12.73	2 E	102 $\pm$ 53.7
Vefat	2	8 Serum/ 8 İdrar	70.5 $\pm$ 9.2	2 K	24 $\pm$ 1.4

3.2 ¹H-NMR Spektroskopisi İçin Numune Hazırlık Süreci

Analiz öncesi -80°C 'de tutulan tüm numuneler, 1 saat boyunca 4°C 'de çözölmeye bırakılmıştır. Kısa süreli vortex işlemine tabi tutulan örnekler, $14.000\times\text{g}$ 'de, 4°C 'de, 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen süpernatantlar ayrılmıştır. Elde edilen süpernatantlar, Bruker'den direkt olarak temin edilen ticari tampon çözeltileri (Bruker, Billerica, MA, ABD) ile serum örnekleri için ($300\mu\text{L}$ tampon (0.9% NaCl ve D_2O içinde 0.1% TSP) : $300\mu\text{L}$ serum), idrar örnekleri için ($60\mu\text{L}$ tampon (D_2O içinde 0.5 M KH_2PO_4 ve 0.05% TSP) : $540\mu\text{L}$ idrar) oranlarında karıştırılarak hazırlanmış ve her bir numunenin nihai hacmi $600\mu\text{L}$ olacak

şekilde ayarlanmıştır. Numuneler daha sonra 1 dakika boyunca elle nazikçe çalkalanmış ve ardından 5 mm'lik SampleJet™ NMR tüplerine aktarılmıştır (94).

3.3 1H-NMR Spektroskopisi ile Numune Analizleri

Tüm NMR analizleri, 5 mm BBI probuna sahip ve 5°C'ye ayarlanmış Bruker SampleJet™ robotik soğutma sistemi ile donatılmış 600 MHz Bruker Avance IVDr sistemi (Bruker) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm yöntemler, COVID-19 numuneleri için önceki araştırmalara dayalı olarak doğrulanmış (95) ve analiz öncesinde gerekli kalibrasyon tamamlanmıştır. Kalite kontrol için B.I. BioBank QC™ modülü (Bruker), metabolitlerin konsantrasyon ölçümleri için ise B.I. QUANT-PS™ modülü ve B.I. QUANT-UR™ modülü (Bruker) kullanılmıştır. Ölçümü yapılan metabolitler arasında, serumda asetik asit, asetoasetik asit, aseton, sitrik asit, kreatin, kreatinin, formik asit, glukoz, tirozin, d-3-hidroksibütirik asit, laktik asit, pirüvik asit ve treonin gibi toplamda 41 tane hastalık ilişkili metabolit bulunmakta iken; idrarda metiyonin, fukoz, lizin, hippurat, 2-fenilpropionat, glutamin, 3-indoksilsülfat, uridin, formik asit, malik asit, pirüvik asit, 3-metilhistidin, trigonelline, taurin ve kreatinin gibi 150 tane hastalık ilişkili metabolit incelenmiştir. Tek boyutlu (1D) 1H-NMR spektrumu, Bruker'ın standart NMR yazılımı olan TopSpin (sürüm 3.6.2) kullanılarak 300 K sıcaklıkta elde edilmiştir. Solvent baskılama yöntemiyle gerçekleştirilen standart 1D NMR deneyi, toplam 4 dakikalık bir deney süresi ile 32 taramadan oluşmaktadır (96).

Öncelikle, NMR spektrumunun kalitesini kontrol etmek amacıyla bir nükleer Overhauser etkisi spektroskopisi/ nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) deneyi uygulanmış ve metabolitlerin ölçümünü sağlamak amacıyla serum örnekleri için B.I. BioBankQuant-PS™ modülü, idrar örnekleri için B.I. QUANT-UR™ modülü kullanılmıştır. Ayrıca, makromoleküler sinyalleri filtrelemek için bir Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) deneyi gerçekleştirilmiştir. Her metabolitin sinyal paternlerini analiz etmek amacıyla istatistiksel toplam korelasyon spektroskopisi/ statistical total correlation spectroscopy (STOCSY) de önceki araştırmalara dayalı olarak optimize edilerek, uygulanmıştır (97). Gözlemlenen metabolitlere ait sinyal

paternleri, yapılan ölçümleri doğrulamak için IVDr ölçümler ile entegre edilmiş ve ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, NMR metabolitlerinin ölçümü, harici referans sinyalleri olarak tanımlanan elektronik referans sinyalleri ile konsantrasyon belirleme/ electronic reference for in vivo concentration determination (ERETIC) kalibrasyonuna dayalı olarak yapılmıştır (98). Yapılan ölçümlere kalibrasyon entegrasyonu, önceki çalışmalarda tanımlanan atım uzunluğuna dayalı konsantrasyon tayini / pulse length-based concentration determination (PULCON) prensibi ile sağlanmıştır (99). Metabolit sinyallerinden arındırılmış bir bölgede, çözücü baskılamalı 1D NMR spektrumuna 10 mM konsantrasyonunda yapay bir referans piki eklenmiştir. Ardından, kantitatif kalibrasyonlar elde edilmiş ve B.I. Methods QC prosedürlerine uygun olarak analit konsantrasyonları bilinen özel bir referans materyali kullanılarak doğrulanmıştır. İnsan vücut sıvısı örneklerinin (serum ve idrar örnekleri) hazırlanması ve NMR protokolleri, Dona ve arkadaşlarının çalışmasından (87) uyarlanmıştır.

3.4 İstatistiksel Analiz ve Veri Yorumlama

Çalışmamız dahilinde olan istatistiksel analizler, çevrimiçi kapsamlı bir program olan MetaboAnalyst 6.0 (www.metaboanalyst.ca) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri setinde belirlenen eksik veriler, her bir değişkenin bilinen deteksiyon limitleri kullanılarak, düzenlenmiştir. Tüm spektrumlar, logaritmik (taban 10) transformasyonlar ve otomatik ölçekleme teknikleri kullanılarak normalize edilmiştir. İlgili veri setlerine hem tek değişkenli hem de çok değişkenli analizler uygulanmıştır. Denetimsiz etkileşimli temel bileşen analizleri/ unsupervised interactive principal component analysis (iPCA) ve denetimli ortogonal kısmi en küçük kareler diskriminant analizleri/ supervised orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), seçilen meta verilere göre farklı renkler veya şekiller kullanılarak 2D ve 3D grafiklerle hem serum hem de idrar ölçüm verileri için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Verilerin dağılım paternleri Shapiro–Wilk Testi ile sınanmış, deney grupları arasındaki farklılıklar ise Mann–Whitney U Testi ve Kruskal–Wallis Testi ile araştırılmıştır.

İki bağımsız değişkenin (prognoz ve zaman) etkilerini ve potansiyel etkileşimlerini gözlemlemek için iki yönlü varyans analizi/ two-way analysis of variance (ANOVA), ardından Bonferroni düzeltmeli post-hoc testi uygulanmıştır. Gruplar arasında iki yönlü ANOVA'da anlamlı farklılık gösteren metabolitlerin etkisinin derecesini belirlemek için lineer kovaryat analizleri gerçekleştirilmiştir ve karşılaştırılan ikili gruplar arasındaki farkların derecesi **Tablo 2**'de serum ve idrar örnekleri için ayrı ayrı sunulmuştur. Ayrıca, incelenen iki faktör ve bunların etkileşimleri ile ilişkili temel değişim paternlerini belirlemek amacıyla tekrarlayan ölçümlü ANOVA–eşzamanlı bileşen analizi/ ANOVA–simultaneous component analysis (ASCA) uygulanmıştır. ASCA analizi, daha önceki çalışmalarda tanımlanan algoritmalara (100) dayanarak yapılmış ve karşılaştırılan gruplar arası farklılıklar eğim grafikleri ile sunulmuştur. İlâveten, prognoz, zaman ve etkileşim faktörleri için permütasyon testi kullanılarak ASCA analizinin validasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında, hem prognoz hem de zaman faktörleri için random forest analizi yapılmış; değişkenlerin doğrulukta ortalama azalış oranları değerlendirilerek, değişken önem grafikleri oluşturulmuş ve devamında, ilgili analitlerin metabolomik sınıflandırma üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Hem iki yönlü ANOVA (F değeri >2.5) (101) hem de ASCA'da (leverage/SPE saçılım grafikleri) (102) istatistiksel olarak anlamlı bulunan ($p < 0.05$) metabolitler; prognoz, zaman ve etkileşim faktörleri dikkate alınarak hem serum hem de idrar örnekleri için tanımlanmıştır. Son olarak, Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi/ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) dayalı veritabanı kullanılarak ST, PS ve Vefat grupları arasındaki metabolik yolak farklılıklarını belirleme analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, iki yönlü ANOVA ve ASCA'da seviyeleri gruplar arası anlamlı derecede farklı olan metabolitlerin etkilediği metabolik yolları belirlemek amacıyla yapılmıştır. KEGG sonuçları, farklı gruplar arasındaki anlamlı metabolitlere bağlı olarak tanımlanmış ve etkilenen yollar, etki değeri > 0.1 ve $p < 0.05$ kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

Tablo 2. Serum ve idrar örnekleri için prognostik gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren metabolitlerin etki büyüklüklerini gösteren doğrusal kovaryat/ linear covariate analiz sonuçları. Tek yıldız ile hem iki yönlü ANOVA hem de ASCA’da anlamlı olanlar, çift yıldız ile yalnızca ANOVA’da anlamlı olanlar belirtilmiştir. Pozitif değerler artışı, negatif değerler azalışı göstermektedir.

Metabolitler	Vefat vs. Sağlıklı Taburcu	Polinöropatik Sendrom vs. Sağlıklı Taburcu	F değeri	p değeri
<i>Serum</i>				
Kreatin*	1.148	1.516	8.306	0.007
Tirozin*	1.468	1.141	7.917	0.007
Formik asit**	0.782	1.545	7.422	0.008
Fenilalanin**	1.429	0.793	6.477	0.015
Metiyonin	0.998	1.301	6.170	0.016
Etanol	1.089	1.154	5.684	0.019
Aseton	(-) 0.842	0.741	5.670	0.019
Pirüvik asit	0.745	1.311	5.488	0.020
Asetik asit	1.184	0.806	4.790	0.033
Treonin	(-) 1.156	(-) 0.846	4.735	0.033
<i>İdrar</i>				
Taurin*	0.29	1.68	8.24	0.032
3-hidroksivalerik asit*	0.97	1.52	7.22	0.034
Arjinin**	(-) 0.69	1.11	7.07	0.035
Formik asit*	1.07	1.39	6.65	0.039
D-laktoz**	1.50	0.43	6.45	0.039

4 BULGULAR

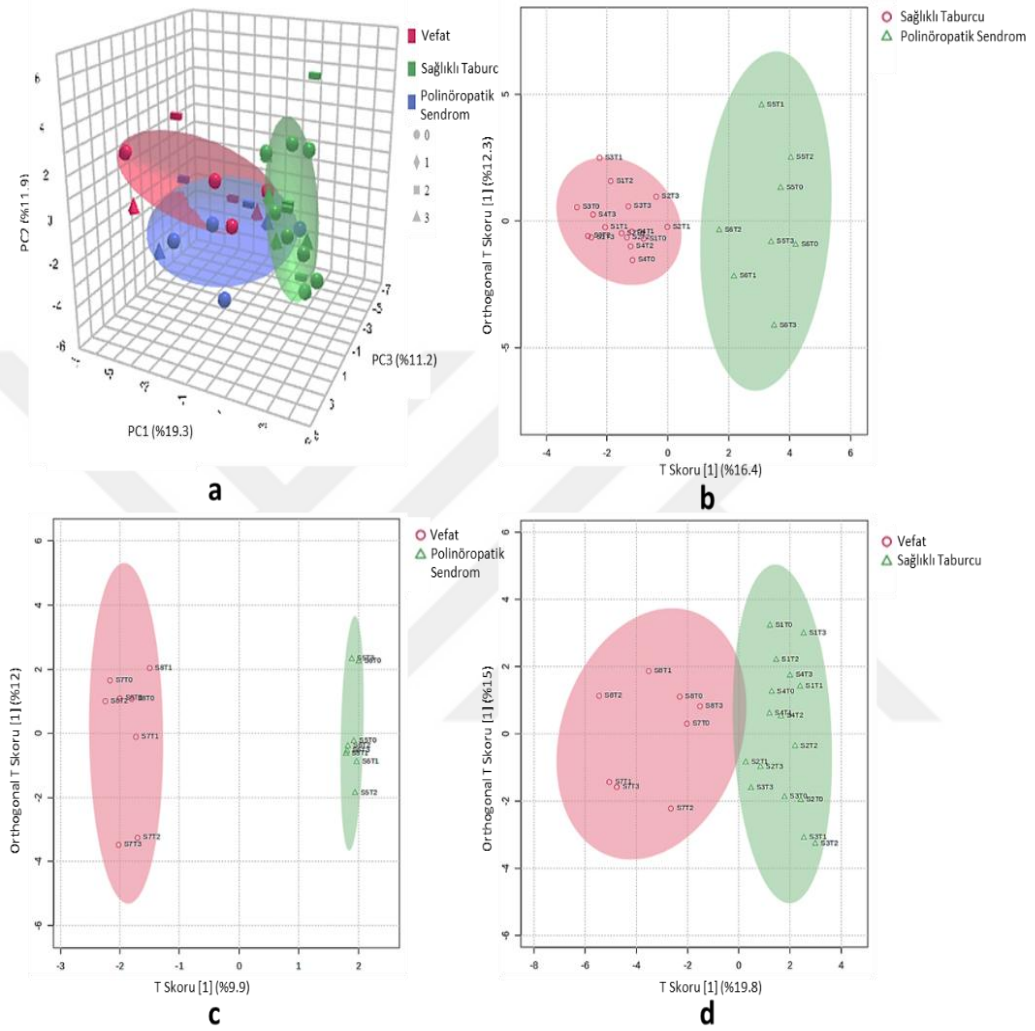
4.1 ST, PS ve Vefat Gruplarında ¹H-NMR Analizi ile Metabolik Farklılıklar

YBÜ’de tedavi gören kritik COVID-19 hastalarında SARS-CoV-2 enfeksiyonunun neden olduğu spesifik metabolik değişiklikleri araştırmak amacıyla, sekiz farklı hastadan gerçek zamanlı olarak toplanan 32 serum ve 32 idrar örneği ¹H-NMR yöntemi ile incelenmiştir. YBÜ’de tedavi ve takip süreçlerindeki farklı prognostik sonuçlarına göre, ST grubu dört, PS grubu iki ve Vefat grubu iki hasta olacak şekilde gruplandırılmıştır.

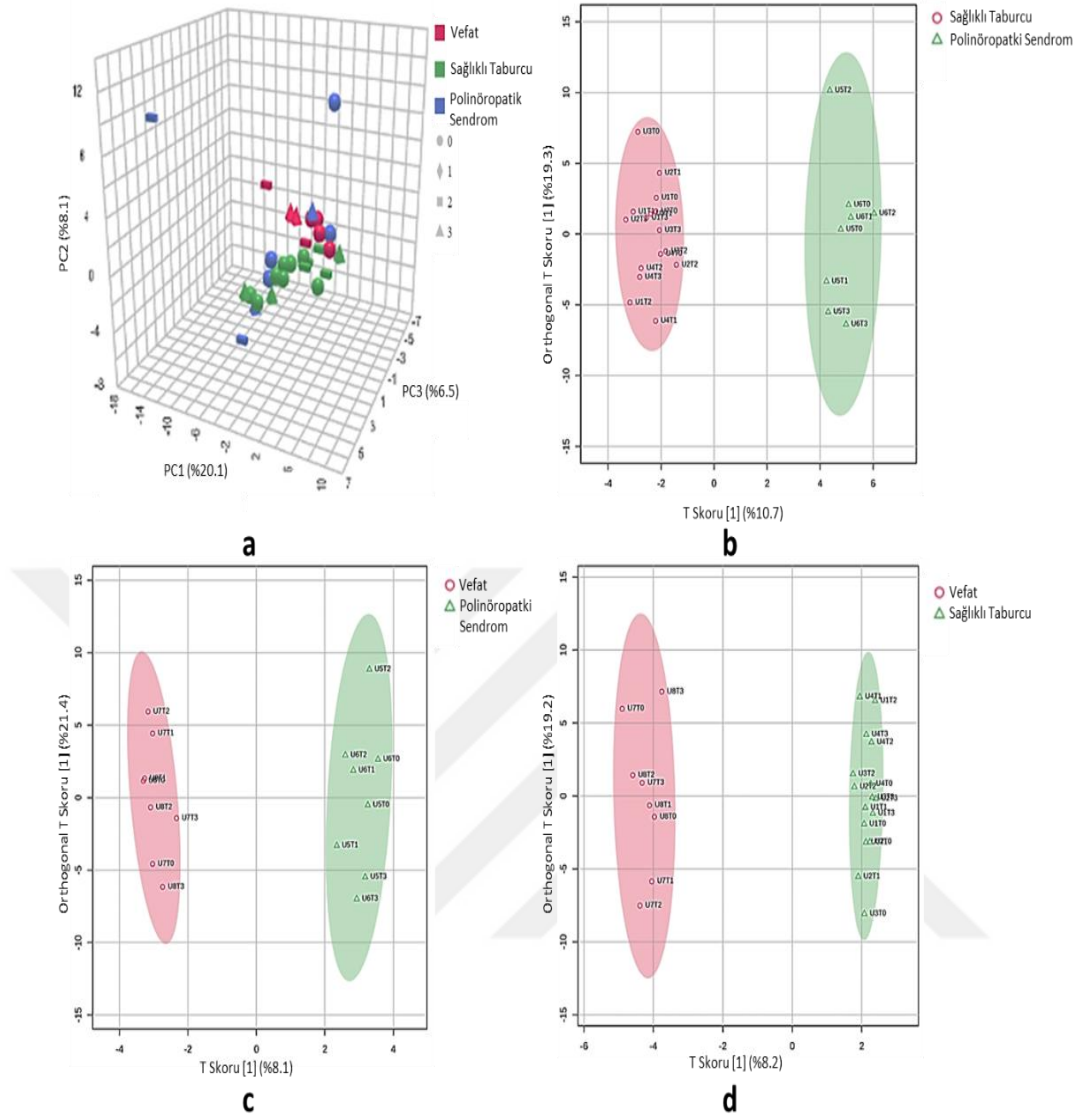
B.I. QUANT-PS™ analizleri ile, trimetilamin-N-oksit, amino asitler ve türevleri, karboksilik asitler, esansiyel besinler, keto asitler ve türevleri, karbonhidratlar ve türevleri ile dimetilsülfon gibi sülfon bileşikler dahil olmak üzere 41 farklı metabolitin serum konsantrasyonları; B.I. QUANT-UR™ analizleri ile ise, aminler ve türevleri, amino asitler, karboksilik asitler, yağ asitleri ve türevleri, D-gluconic acid gibi hidroksi asitler, keto asitler, pürin-pirimidin ve piridin türevleri ve şeker türevleri dahil 122 farklı metabolitin idrar konsantrasyonlarının kantitatif olarak belirlenmesi sağlanmıştır. İlgili metabolitlerin konsantrasyonları, mmol/L biriminde tanımlanmıştır.

Öncelikle, analiz edilen idrar ve serum numuneleri için ayrı ayrı olacak şekilde ve prognoz ile zaman değişkenlerini içeren etkileşimli temel bileşen analizi (iPCA) 3D skor grafiği kullanılarak alt grupları ayırt edici bir metabolit profili oluşturulmuştur. İlgili grafiklerde temel bileşenler 1, 2 ve 3, grupları arasındaki varyasyonun serum analizleri için yaklaşık %42,4’ünün açıklanabilirliği görülmüştür (PC1: %19,3, PC2: %11,9, PC3: %11,2). İdrar analizlerinde ise bu açıklanabilir total varyasyon değeri %34,7 olarak izlenmiştir (PC1: %20,1, PC2: %8,1, PC3: %6,5). İlaveeten, YBÜ’de tedavi gören COVID-19 hastalarından alınan örneklerin toplama zamanlarına göre farklı prognoz grupları arasında daha net bir ayrım sağlamak için 2D OPLS-DA grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafikler ile, ikili prognostik gruplar arasında net

ayrımalar, ilgili örneklerin toplanma zamanı da dahil edilmiş şekilde, serum örnekleri için **Şekil 1**'de idrar örnekleri için ise **Şekil 2**'de gösterilmektedir.



Şekil 1. (a) Serum analizleri için iPCA 3D skor grafiğinde, prognostik gruplar renklerle, örnek toplama zamanları ise şekillerle gösterilmiştir (toplam varyans: %42.4, PC1>PC2>PC3). **(b-d)** Yoğun bakım COVID-19 hastalarının serum analizlerinde, örnek toplama zamanına göre prognostik grupların (ST, PS, Vefat) ayrımını gösteren 2D OPLS-DA skor grafikleri.



Şekil 2. (a) İdrar analizleri için iPCA 3D skor grafiğinde, prognostik gruplar renklerle, örnek toplama zamanları ise şekillerle gösterilmiştir (toplam varyans: %34.7, PC1>PC2>PC3). **(b-d)** Yoğun bakım COVID-19 hastalarının idrar analizlerinde, örnek toplama zamanına göre prognostik grupların (ST, PS, Vefat) ayrımını gösteren 2D OPLS-DA skor grafikleri.

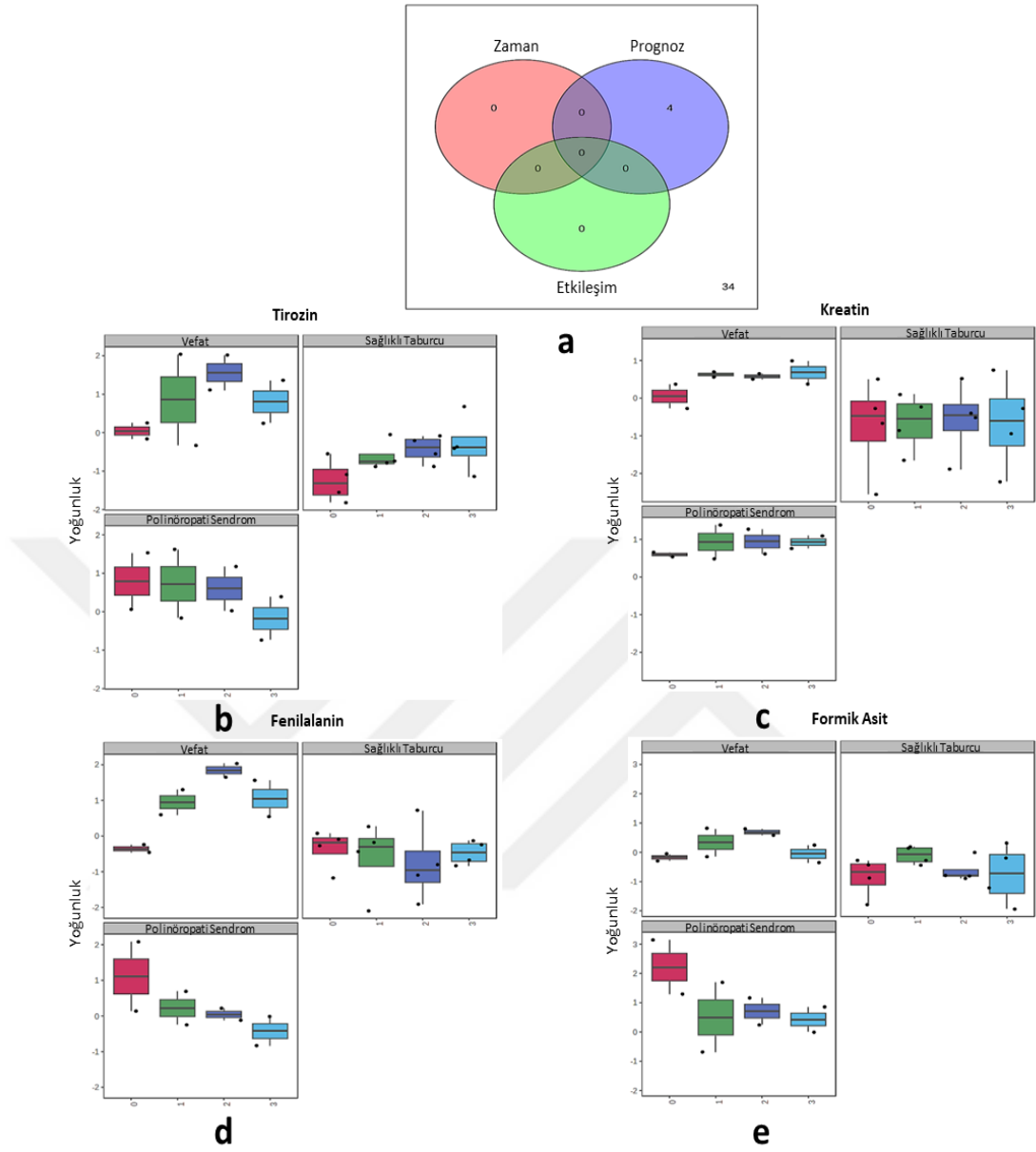
PCA ve OPLS-DA sonuçları ile gruplar arasında net ayrımların gösterilmesinin ardından, karşılaştırılan gruplar arasındaki ayrışmaya neden olan metabolitleri araştırmak için post-hoc Bonferroni düzeltilmeli iki yönlü ANOVA uygulanmıştır. Bu analiz, prognoz farklılıklarının, örnek toplama zamanlarının ve bunların

etkileşimlerinin örnekler arasındaki ayrışma üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Sonuçlar ile, gruplar arasında anlamlı ayrışmaya yol açabilecek metabolitler tanımlanmaya çalışılmıştır. İki yönlü ANOVA’da, grupları ayırt eden analitler $F > 2.5$ (101) ve $p < 0.05$ kriterleri ile serum ve idrar analizlerine ayrı ayrı uygulanmıştır. Bu kriterler aynı zamanda, prognoz, toplama zamanı ve etkileşim değişkenlerinin etkilerini ayrı ayrı değerlendirmek için de uygulanmıştır. İlgili analizlerle ilgili detaylı sonuçlar **Tablo 3**'te sunulmuştur. Serum analizleri için, özellikle tirozin, kreatin, formik asit ve fenilalanin, yalnızca prognoz faktörüne bağlı olarak grupları ayırt etmede anlamlı farklılık göstermiştir ($p < 0.05$, **Şekil 3**).



Tablo 3. Tablo, serum ve idrar örneklerinde hem iki yönlü ANOVA hem de ASCA analizlerinde anlamlı farklılık gösteren metabolitleri içermektedir. Metabolitler, prognoz, örnek toplama zamanı ve etkileşim faktörlerine göre sınıflandırılmıştır. ANOVA’da $F > 2.5$ ve $p < 0.05$ olan metabolitler, ASCA’da ise iyi modellenmiş leverage/SPE oranlarına sahip ve $p < 0.05$ değerine ulaşan metabolitler seçilmiştir. Serumda kreatin ve tirozin, idrarda taurin, 3-hidroksivalerik asit ve formik asit prognoz açısından anlamlı bulunmuş ve yıldız ile belirtilmiştir.

Metabolitler	Post-Hoc Bonferroni Düzeltmesi ile İki Yönlü ANOVA						ANOVA Eşzamanlı Bileşen Analizi (ASCA)								
	Prognoz		Zaman		Etkileşim		Prognoz			Zaman			Etkileşim		
	F değeri	p değeri	F değeri	p değeri	F değeri	p değeri	Leverage	SPE	p değeri	Leverage	SPE	p değeri	Leverage	SPE	p değeri
Serum															
Tirozin*	12.41	0.001	1.36	0.28	0.98	0.47	0.089	0.57	<0.05						
Kreatin*	9.5	0.001	0.21	0.88	0.06	1.00	0.088	1.36	<0.05						
Formik asit	11.68	0.001	0.56	0.65	1.66	0.18									
Fenilalanin	9.8	0.001	0.06	0.98	2.21	0.09									
İzolösin										0.10	0.68	<0.05			
Lizin										0.09	2.69	<0.05			
Gliserol										0.17	1.59	<0.05			
Laktik asit													0.20	0.81	<0.05
Sitrik asit													0.14	4.02	<0.05
N-Dimetilglisin													0.13	1.66	<0.05
3-hidroksibütirik asit													0.14	1.45	<0.05
İdrar															
Taurin*	25.69	0.001	4.12	0.59	3.18	0.47	0.045	2.66	<0.05						
3-hidroksivalerik asit*	9.82	0.024	0.94	0.89	0.40	0.93	0.046	0.43	<0.05						
Formik asit*	8.72	0.041	0.27	0.99	0.83	0.78	0.041	0.81	<0.05						
Arjinin	10.52	0.023	0.54	0.94	0.77	0.79									
D-laktoz	12.76	0.016	2.04	0.73	2.28	0.51									
Malik asit	11.21	0.022	3.57	0.59	8.74	0.01									
3-hidroksi-3-metilglutarik asit										0.048	0.89	<0.05			
Etilmalonik asit										0.045	0.59	<0.05			
Oxaloasetik asit										0.043	1.15	<0.05			
Laktik asit													0.06	1.32	<0.05

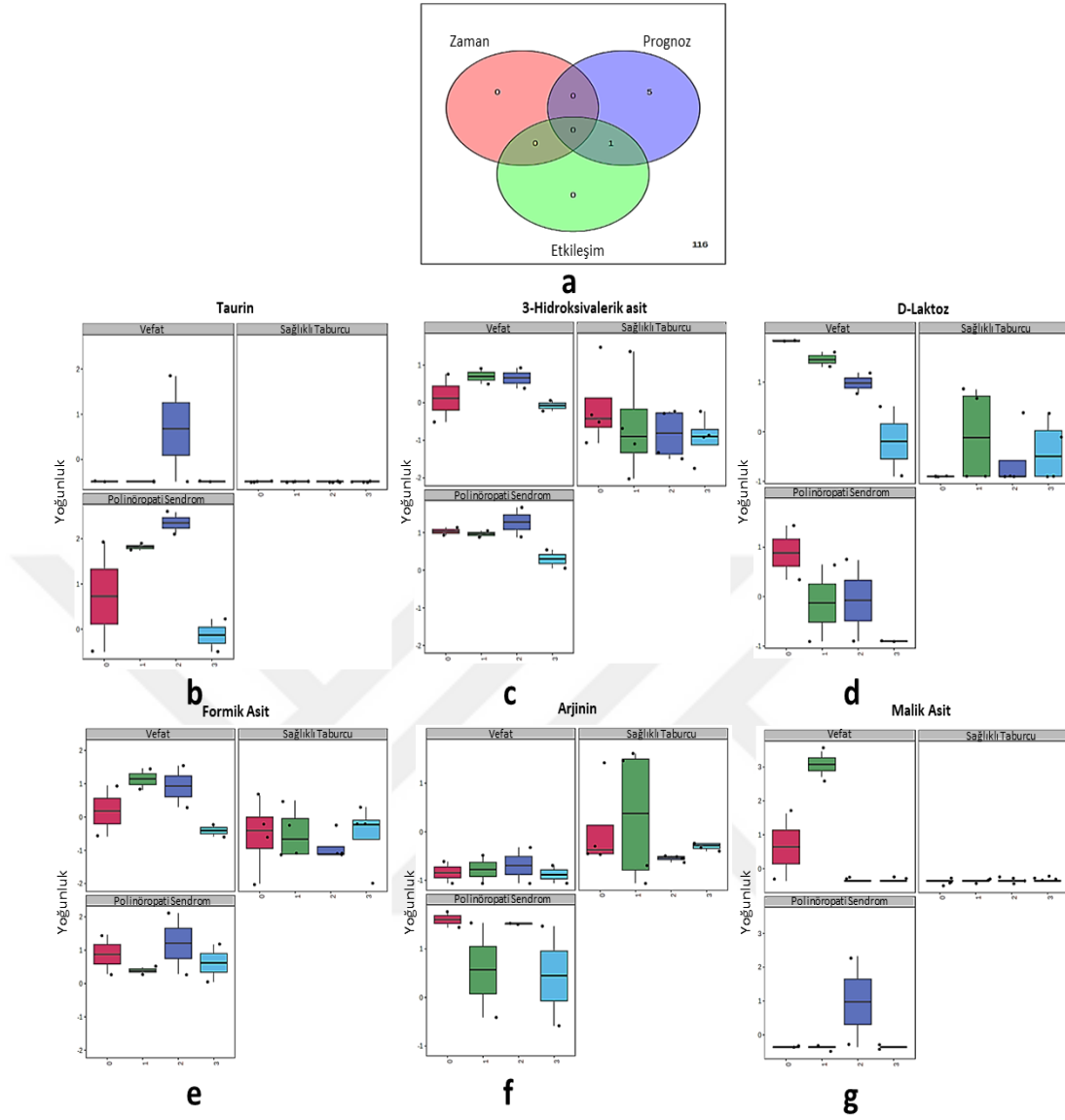


Şekil 3. (a) İki yönlü ANOVA, serum analizlerine dayalı prognoz, toplama zamanı ve etkileşim faktörlerine göre anlamlı metabolit sayılarını gösteren bir Venn diyagramı ile sunulmuştur. **(b-e)** Tirozin, kreatin, fenilalanin ve formik asidin prognostik gruplara (ST, Vefat, PS) ve örnek toplama zamanlarına (0, 1., 2., 3. zaman noktaları) göre değişen göreceli miktarlarını gösteren kutu-bıyık/ box-whisker grafikleri.

Zaman ve etkileşim değişken setlerinde ise, iki yönlü ANOVA ile gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren herhangi bir metabolit belirlenememiştir. İdrar analizlerinde

ise, taurine, 3-hidroksivalerik asit, arginin, formik asit ve D-laktoz, yalnızca prognoz faktörüne bağlı olarak grupları ayırt etmede anlamlı farklılık gösterirken; malik asitin ise hem prognoz hem de etkileşim faktörleri için anlamlı gruplar arası farklılık gösterdiği görülmüştür ($p < 0.05$, **Şekil 4**). İki yönlü ANOVA analizlerine göre, prognoz ve toplama zamanına bağlı olarak seviyeleri anlamlı derecede farklılık gösteren analitlerin değişimlerini göstermek için ayrıca kutu-bıyık/ box-whisker grafikleri oluşturulmuştur (**Şekil 3 ve 4**).





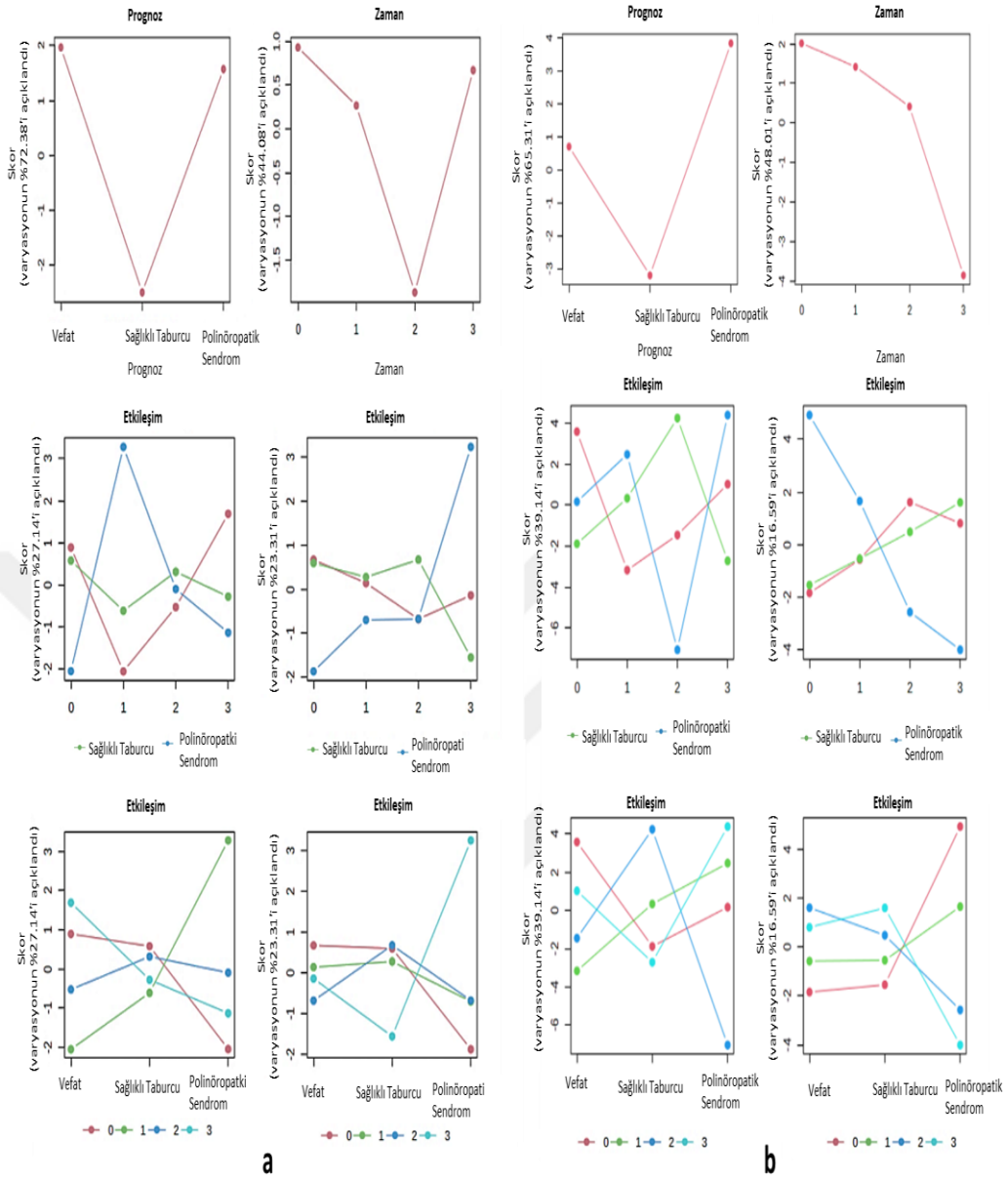
Şekil 4. (a) İki yönlü ANOVA, idrar analizlerine dayalı prognoz, toplama zamanı ve etkileşim faktörlerine göre anlamlı metabolit sayılarını gösteren bir Venn diyagramı ile sunulmuştur. **(b-g)** Taurin, 3-hidroksivalerik asit, D-laktoz, formik asit, arjinin ve malik asidin prognostik gruplara (ST, Vefat, PS) ve örnek toplama zamanlarına (0, 1., 2., 3. zaman noktaları) göre değişen görece miktarlarını gösteren kutu-bıyık/ box-whisker grafikleri.

Ek olarak, bu analitlerin etkilerini gruplar arasında değerlendirmek için doğrusal kovaryat/ linear covariate analizler gerçekleştirilmiş ve analitlerin etki büyüklükleri

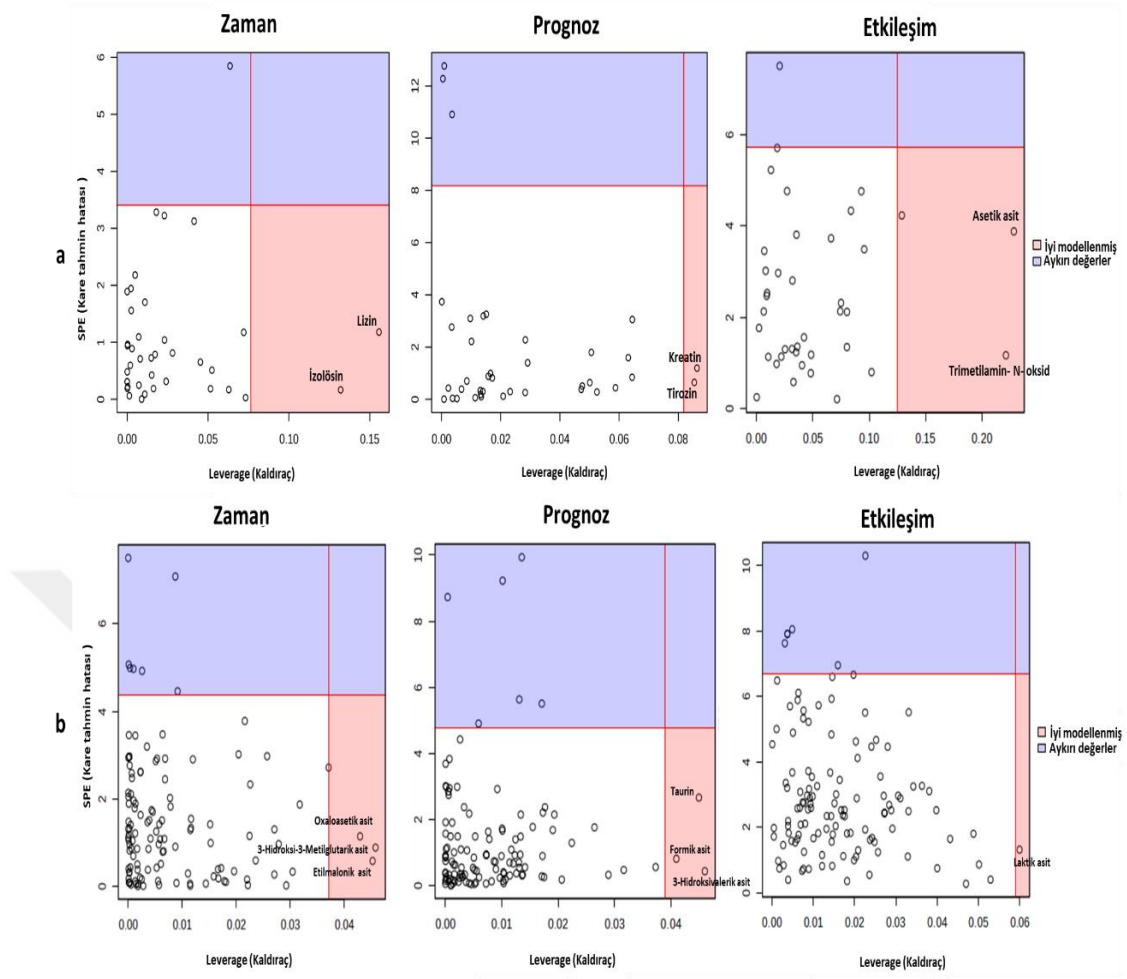
belirlenmiştir (**Tablo 2**). Serum analiz sonuçlarına göre yapılan box-whisker/ kutu-bıyık grafikleri ve doğrusal kovaryat/ linear covariate analizlere göre, kreatin seviyeleri, PS (1.516 kat) ve Vefat (1.148 kat) gruplarında ST grubuna kıyasla artmıştır. Benzer şekilde, tirozin seviyeleri PS (1.468 kat) ve Vefat (1.141 kat) gruplarında ST grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Formik asit seviyeleri, PS grubunda (1.545 kat) ST grubuna göre anlamlı derecede yüksek, Vefat grubunda ise orta derecede bir artış göstermiştir (0.782 kat). Fenilalanin seviyeleri, hem Vefat (1.429 kat) hem de PS (0.793 kat) gruplarında ST grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Özellikle, kreatin ve tirozin seviyelerindeki farklılıklar, iki yönlü ANOVA ve doğrusal kovaryat/ linear covariate analiz sonuçlarına göre yoğun bakımda hastalık progresyonunun biyobelirteçleri olabilecek potansiyellerini işaret eden en dikkat çekici bulgular olarak değerlendirilmiştir. İdrar analiz sonuçları değerlendirildiğinde ise; 3-hidroksivalerik asit ve formik asit seviyeleri, özellikle PS grubu için sırasıyla (1.52 : 1.39 kat) olacak şekilde, Vefat grubu kıyaslamalarında ise sırasıyla (0.97 : 1.07 kat) olacak şekilde, ST grubuna kıyasla artmıştır. Taurin seviyeleri ise, PS grubunda (1.68 kat) ST grubuna göre anlamlı derecede yüksek belirlenirken, Vefat grubunda ise ST grubuna göre daha düşük seviyede bir artış izlenmiştir (0.29 kat). D-laktoz seviyeleri için ise, Vefat grubunda (1.50 kat) ST grubuna göre daha anlamlı derecede yüksek artış izlenirken, PS grubunda ise ST grubuna göre daha düşük seviyeli bir artış görülmüştür (0.43 kat). Arginin metabolitindeki gruplar arası anlamlı seviye farklılıklarına gelindiğinde ise, PS grubunda (1.11 kat) ST grubuna göre anlamlı bir artış görülmesine karşın; Vefat grubunda ((-) 0.69 kat) ST grubuna göre anlamlı bir azalış olduğu kaydedilmiştir. Son olarak iki yönlü ANOVA analizlerinde hem prognoz hem de etkileşim faktörleri için anlamlı bulunan malik asit ise, prognoza dayalı olarak yapılan kovaryat analizlerinde istatistiksel olarak anlamsız ($p=0.21$) bulunduğundan dolayı, çalışma sonuçları arasında gruplar arası ayrımı sağlayabilecek güvenilir bir metabolit olarak değerlendirilememiştir. Serum analiz sonuçlarına benzer olarak, idrar analizlerinde de zaman faktörü adına, iki yönlü ANOVA ile gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren herhangi bir metabolit belirlenememiştir.

4.2 Prognoz, Zaman ve Etkileşim Faktörlerine Dayalı Anlamlı Paternlerin Tanımlanması

Prognoza dayalı metabolit değişim dinamiklerini zaman faktöründen sistematik bir şekilde ayırt etmek için ASCA analizleri gerçekleştirilmiştir (103). Bu istatistiksel yöntem yardımıyla, tüm veri setindeki varyasyonlar, farklı değişkenlerin etkilerine ve bunların etkileşimlerine göre alt bölümlere ayrılmıştır (100). ASCA analizi, prognoz, örnek toplama zamanı ve etkileşim faktörleri ile ilişkili iyi modellenmiş bileşenleri belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Scree grafikleri, özdeğerler ile faktörler arasındaki ilişkiyi grafiksel olarak göstermek için kullanılmıştır ve özdeğerlerin büyüklüğünde önemli azalmalar tespit edilerek çıkarılacak faktörlerin sayısı belirlenmiştir (**Şekil 5a**). Bu grafikler hem serum hem de idrar analizlerinde değerlendirilen farklı metabolitler kapsamında ayrı ayrı oluşturulmuştur. Prognoz, örnek toplama zamanı ve bunların etkileşimiyle ilişkili temel paternler, ilgili alt modellerin temel component analizlerinden PC1'lere dayalı skor grafikleriyle oluşturulmuştur. Bu grafiklerde serum örnekleri için, 2. toplama zamanında skorların hızlıca azalmış olduğunu ve ardından 3. toplama zamanında tam tersi yönde hızlı bir artış olduğu gösterilmiştir. ST grubundaki skorlar, prognoz açısından PS ve Vefat gruplarından anlamlı derecede daha düşük bulunmuş ve etkileşim için farklı değişim paternleri gözlemlenmiştir (**Şekil 5a**). İdrar analizlerinde ise, prognoz açısından skorlar en düşük yine ST grubu için görülmüş ve ardından Vefat grubu ile en yüksek açıklanabilir varyasyon skorları PS grubunda izlenmiştir. Toplama zamanına dayalı idrar örneklerindeki skorlar değerlendirildiğinde, ilk toplama zamanından son toplama zamanına kadar devamlı azalan bir varyasyon skorlanması görülmüştür (**Şekil 5b**). Ayrıca, prognoz, zaman ve etkileşim faktörleri ile ilişkili temel eğilimler, leverage/SPE grafikleri kullanılarak hem serum (**Şekil 6a**) hem de idrar (**Şekil 6b**) örnekleri için ayrı ayrı ve ayrıntılı şekilde ortaya konulmuştur. Düşük SPE ve yüksek leverage değerlerine sahip değişkenlerin, ilgili modellere anlamlı derecede katkıda bulunduğu kabul edilmiştir.



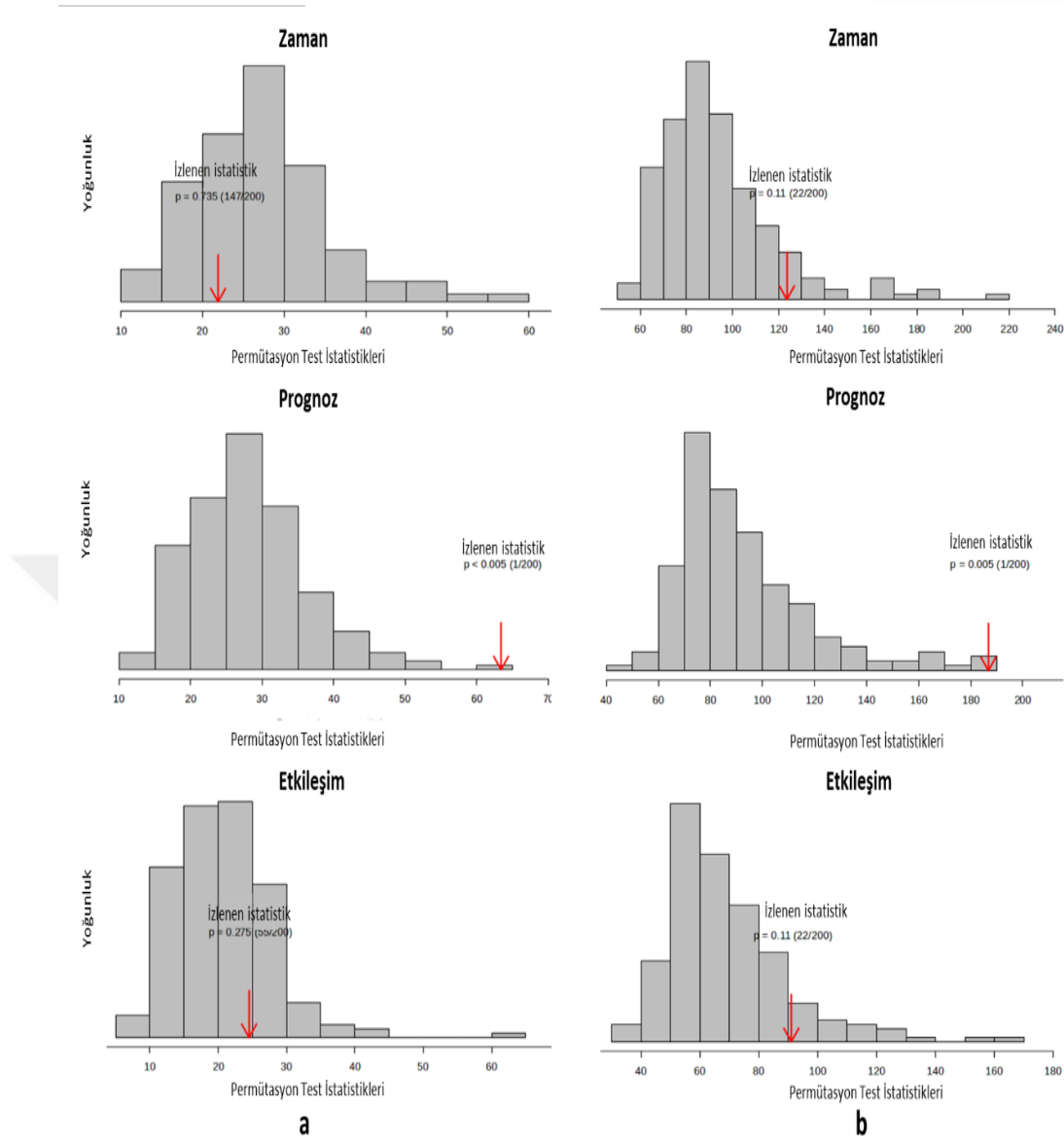
Şekil 5. (a, b) Serum ve idrar örneklerinde, metabolit değişimlerinin zaman (0, 1, 2., 3. zaman noktaları) ve prognostik gruplar (ST, Vefat, PS) arasındaki temel paternleri ve etkileşimlerini gösteren scree grafikleri. Skorlar, gruplar arasındaki açıklanabilir varyans yüzdesini temsil etmektedir.



Şekil 6. (a, b) Serum ve idrar analizlerinde, zaman, prognoz ve etkileşimlerine ilişkin ASCA alt modellerine ait leverage/SPE (kaldıraç/kare tahmin hatası) dağılım grafikleri. Kırmızı alandaki metabolitler anlamlı paternlerle uyumlu, mavi alandakiler ise aykırı değerleri temsil etmektedir.

İstatistiksel güç analizleri, prognoz, örnek toplama zamanı ve bunların etkileşim faktörleri için modelin geçerliliğini değerlendiren 200 tekrarlı permütasyon testi ile değerlendirilmiştir. Ancak, doğrulama modelinin sonuçlarına göre, yalnızca prognozun hem serum (**Şekil 7a**) metabolomu hem de idrar (**Şekil 7b**) metabolomu üzerinde anlamlı bir etkisi olabileceği ($p < 0.005$) gösterilmiş, buna karşın örnek toplama zamanının (serum ($p = 0.735$); idrar ($p=0.11$)) ve bu faktörlerin etkileşiminin (serum ($p = 0.275$); idrar ($p=0.11$)) ilgili matriksteki metabolik değişiklikleri açıklamada anlamlı olmadığı bulunmuştur. Bu sonuçlar ayrıca, prognoz ve örnek

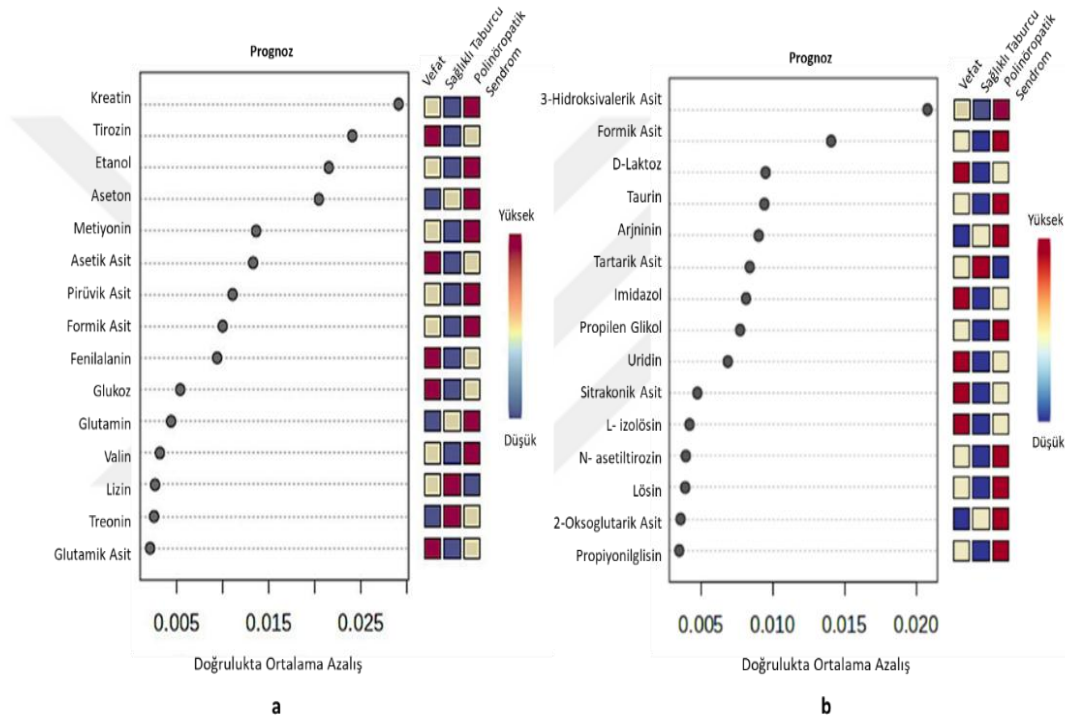
toplama zamanının etkileşim eksikliğine bağlı olarak bağımsız faktörler olduğunu da göstermiştir. Bu doğrulama sonrası yapılan analizler, serum örnekleri için prognoz üzerinde önemli etkileri olan metabolitler olarak kreatin ve tirozin'i tanımlarken; idrar örnekleri içinse taurin, 3-hidroksivalerik asit ve formik asit tanımlanmıştır. İlaveten, zaman değişkeni için iyi modellenmiş analitler serum örnekleri için lizin, izolösin ve gliserol, idrar örnekleri için oxaloasetik asit, 3-hidroksi-3-metilglutarik asit ve etilmalonik asit; etkileşim değişkeni için ise serum örnekleri için sitrik asit, N-dimetilglisin, 3-hidroksibütirik asit ve laktik asit, idrar örnekleri içinse yalnızca laktik asit belirlenmiş olsa da, permütasyon testi kullanılarak yapılan doğrulama sürecinde toplama zamanı ve etkileşim faktörleri açısından istatistiksel anlamlılık olmaması nedeniyle, bu metabolitlerin serum veya idrar metabolomu üzerinde anlamlı etkileri olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 7. (a, b) Serum ve idrar örneklerinde ASCA analizlerine dayalı permütasyon testleri ile model doğrulama grafikleri. ‘ $p < 0.05$ ’ eşğine göre iki analizde de yalnızca prognoz faktörü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Ayrıca, prognostik gruplar arasında en yüksek ayırt edici etkiye sahip metabolitleri belirlemek için hem serum hem de idrar örnekleri için ayrı ayrı random forest analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde, her bir metabolitin model performansı üzerindeki etkisi, ortalama doğruluk azalması ölçütü ile değerlendirilmiştir. Daha yüksek bir değer, ilgili metabolitin grupların tahmin edilmesindeki önemini göstermektedir. Ek

olarak, random forest sınıflandırması, %21.9'luk bir out-of-bag (OOB) hata oranı ile prognostik tahminlerde güçlü bir doğruluk sağlamış olduğunu göstermiş ve serum analizlerinde, kreatin ile tirozin metabolitlerinin sınıflandırmada en büyük etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 8a). İdrar analizleri ise seruma kıyasla daha düşük bir doğruluk ile sonuçlanmış ve %40.6'lık bir out-of-bag hata oranı ile prognostik tahminlerde bulunulabileceği görülmüştür. Özellikle sınıflamada en çok etkiye sahip metabolitler ise, 3-hidroksivalerik asit ve formik asit olarak izlenmiştir (Şekil 8b).



Şekil 8. (a, b) Serum ve idrar metabolitleri için prognostik grupları tahmin eden random forest değişken önem grafikleri. Daha yüksek ortalama doğruluk düşüşü, metabolitin tahmindeki önemini gösterirken, kırmızı yüksek, mavi ise düşük önemi ifade etmektedir.

4.3 Önemli Metabolik Yolak Değişiklikleri

KEGG veritabanı kullanılarak yapılan çift yönlü analizlerle, iki yönlü ANOVA ve ASCA analizleri ile serum ve idrar örnekleri için belirlenen anlamlı ve farklı

metabolitlerin etkisi değerlendirilerek üç prognoz grubu karşılaştırılmıştır. Etkilendiği düşünülen temel metabolik yollar tanımlanmış ve elde edilen bulgular tüm örnekleri içerir şekilde **Tablo 4**'te sunulmuştur. Serum örnekleri için yapılan yolak analizlerinde tanımlanan 10 KEGG yolundan yalnızca 5'i, kreatin ve tirozin metabolitlerinin yapılan tüm genel istatistiksel analizlerde anlamlılık göstermesi nedeniyle anlamlı kabul edilmiştir ve çalışma sonuçları içinde güvenilir olarak kabul edilmiştir. Bu yollar; fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi; glisin, serin ve treonin metabolizması; fenilalanin metabolizması; arjinin ve prolin metabolizması; ve tirozin metabolizması olarak sıralanabilir. Serum yolak analizlerinde değerlendirilen anlamlı farklara sebebiyet veren metabolitler olarak; kreatinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, glisin, serin ve treonin metabolizması ile arjinin ve prolin metabolizması yollarında gözlemlenen önemli değişikliklerde kilit bir rol oynadığı görülmüşürken, tirozinin ise fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi, fenilalanin metabolizması ve tirozin metabolizması yollarındaki değişimlere önemli etkileri olduğu görülmüştür. Ancak, PS ve Vefat grupları arasında ilgili metabolitler üzerinden anlamlı bir farka sahip metabolik yolak bulunamamıştır. İdrar örnekleri için yapılan yolak analizlerinde ise, tanımlanan 4 KEGG yolundan yalnızca 2'si, taurin ve formik asit (hem iki yönlü ANOVA hem de ASCA analizleri sonucu istatistiksel anlamlı bir metabolitler) metabolitleri bazlı değişimler izlendiğinden anlamlı kabul edilmiştir ve çalışma sonuçları içinde güvenilir olarak kabul edilmiştir. Bu yollar sırasıyla, taurin ve hipotaurin metabolizması ile glyoksilat ve dikarboksilat metabolizması yolları olarak sıralanabilir. Bu noktada, özellikle taurin metabolitinin en yüksek etki değeri ile PS grubunu ST grubundan 'taurin ve hipotaurin metabolizması' üzerinden ayırdığı belirlenirken; formik asidin ise, PS ve Vefat gruplarını 'glyoksilat ve dikarboksilat metabolizması' yolağı üzerindeki değişiklikler ile ST grubundan ayırdığı gözlenmiştir. Buna karşın, serum yolak analizlerine benzer olarak, PS ve Vefat grupları arasında ilgili metabolitler üzerinden anlamlı bir farka sahip metabolik yolak bulunamamıştır. Bu sonuçlarla, kritik COVID-19 vakalarında hem serum hem de idrar gibi farklı matrikslerde yapılan metabolomik analizleri ile spesifik metabolik yolların işlevinde bozulmalar veya değişimler olduğunu ve bu yolların serum için, özellikle kreatin ve tirozin düzeyleriyle ilişkili; idrar için ise taurin ve formik asit düzeyindeki değişimler ile ilişkili olabileceği görülmüştür.

Tablo 4. Serum ve idrar örnekleri için KEGG yolak analizleri, prognoz, örnek toplama zamanı ve etkileşim faktörlerine göre yapılan ANOVA ve ASCA analizlerine dayanarak; ST, PS ve Vefat gruplarında etkilenen metabolik yolları göstermektedir. PS ve Vefat arasında anlamlı değişiklik bulunmamıştır. Serumda kreatin ve tirozin, idrarda taurin ve formik asit düzeylerindeki farklılıklara bağlı etkilenen metabolik yollar tek yıldızla gösterilmiştir.

Metabolik Yolak (KEGG)	Polinöropatik Sendrom vs. Sağlıklı Taburcu			Vefat vs. Sağlıklı Taburcu		
	p-değeri	Metabolitler	Etki Değeri	p-değeri	Metabolitler	Etki Değeri
Serum						
Glisin, serin ve treonin metabolizması*	< 0.001	Kreatin N-Dimetilglisin	0.43	0.001	Kreatin	0.36
Glikosilat ve dikarboksilat metabolizması	< 0.001	Formik asit Sitrik asit	0.14	< 0.001	Formik asit Sitrik asit	0.14
Sitrat döngüsü (TCA döngüsü)	< 0.001	Sitrik asit	0.23	0.002	Sitrik asit	0.22
Glikoliz/Glikoneogenez	< 0.001	Laktik asit	0.13	< 0.001	Laktik asit	0.13
Arginin ve prolin metabolizması*	< 0.001	Kreatin	0.21	0.002	Kreatin	0.20
Fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi*	< 0.001	Tirozin Fenilalanin	1.0	< 0.001	Tirozin Fenilalanin	1.0
Fenilalanin metabolizması*	< 0.001	Tirozin Fenilalanin	0.36	< 0.001	Tirozin Fenilalanin	0.36
Piruvat metabolizması	< 0.001	Laktik asit	0.27	< 0.001	Laktik asit	0.27
Tirozin metabolizması*	< 0.001	Tirozin	0.14	0.002	Tirozin	0.13
Butanoat metabolizması				0.003	3-Hidroksibütirik asit	0.11
İdrar						
Taurin ve hipotaurin metabolizması*	< 0.001	Taurin	0.43			
Glyoksilat ve dikarboksilat metabolizması*	0.01	Formik asit	0.11	0.005	Formik asit	0.11
Arjinin ve Prolin Metabolizması	0.013	Arjinin	0.24	0.015	Arjinin	0.24
Arjinin Biyosentezi	0.023	Arjinin	0.40			

Son olarak, serum örnekleri için yalnızca iki yönlü ANOVA'da prognoz grupları arasında anlamlı farklılık gösteren fenilalanin ve formik asit düzeyleri ile yalnızca ASCA analizi temelinde farklılık gösteren ancak doğrulama testlerinden geçemeyen sitrik asit, laktik asit, N-dimetilglisin ve 3-hidroksibütirik asit düzeyleri de KEGG

analizi ile değerlendirilmiştir. İdrar örnekleri içinse, benzer şekilde yalnızca iki yönlü ANOVA'da prognoz grupları arasında anlamlı farklılık gösteren arjinin, D-laktoz ve malik asit ile yalnızca ASCA analizi temelinde anlamlı farklılık gösteren diğer metabolitler de KEGG analizi ile değerlendirilmiştir. Ancak, bu metabolitler üzerinden yapılan ilgili analizlere dayalı olarak, farklı prognostik gruplar arasında bazı metabolik olarak farklılıkları gözlemlenmiş olsa da, bu bulgular çalışma sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ve güvenilir kabul edilmemiştir.



5 TARTIŞMA

SARS-CoV-2 virüsü kaynaklı COVID-19 hastalığının günümüzde mortalite ve morbidite üzerindeki etkisi pandeminin erken evrelerine kıyasla oldukça azalmış olsa da, çeşitli mutasyonlardan kaynaklanan varyantlar üzerinden, özellikle immün yetmezliği olan hastalarda, yaşlı bireylerde ve birden fazla komorbiditesi bulunan hastalarda halen YBÜ'ye yatışı gerektiren kötü prognozlara yol açmaya devam edebilmektedir (4). COVID-19 pandemisinin başlangıcından bu yana, SARS-CoV-2 virüsünün insanlara ait farklı numune matrisleri (serum, plazma, idrar, vs.) üzerindeki özgün etkilerini araştırmak amacıyla çeşitli entegre metabolomik çalışmalar, 1H-NMR veya LC/GC-MS gibi farklı metodolojiler kullanılarak yapılmıştır (78,104,105). Şimdiye kadar yapılan çok çeşitli çalışmalar literatüre önemli katkılar sağlamasına rağmen, yoğun bakım ortamında aşılardan kaynaklanan etkileşim olmaksızın (pandemi başlangıcı) kritik COVID-19 hastalarında prognostik farklılıkları ve gerçek zamanlı değişiklikleri eş zamanlı toplanan hem idrar hem de serum örneklerinde topluca değerlendiren çalışmalar literatürde bulunmamaktadır.

Literatürdeki bazı çalışmalarda, YBÜ'ye COVID-19 nedeniyle yatırılan kritik hastaların çoğunda zatürre benzeri semptomlar, ARDS veya çoklu organ yetmezliği gibi solunum ve sistemik bozukluklar gözlemlenmiş olup, bu hastalarda ortalama ölüm oranı %41,6 (güven aralığı %95 = 34,0-49,7) olarak bildirilmiştir (88,102). COVID-19 nedeniyle YBÜ'de bulunan kritik hastaların yönetimini ve hayatta kalma oranlarını artırmak için SARS-CoV-2'nin farklı insan matrislerindeki (serum, plazma, idrar) metabolitlerin değişimleri üzerindeki spesifik etkisini ortaya koyan ve zamanında etkili müdahalelerin geliştirilmesini kolaylaştıran metabolomik çalışmaların ilerletilmesi, hem bu ciddi hastaların tedavilerinin kolaylaştırılması hem de total morbidite/mortalite oranlarının düşürülmesi açısından oldukça büyük önem taşımaktadır.

Yaptığımız bu öncü çalışmada, pandeminin başlangıcında (Nisan 2020) gerçek ve eş zamanlı olarak toplanan serum ve idrar örnekleri kullanılarak, COVID-19 nedeniyle YBÜ'ye yatırılan farklı prognozlara sahip kritik COVID-19 hastalarının serum ve

idrar matrikslerinde oluşabilecek metabolit değişiklikleri ve beraberinde bu metabolitlerin ilişkili oldukları metabolik yollar üzerindeki anlamlı etkileri incelenmeye çalışılmıştır. Çalışmamız kapsamında analiz edilen tüm örneklerin pandemi başında hastaneye yatırılan COVID-19 hastalarından toplanmış olması, aşılamanın veya çeşitli tedavi protokolleri sırasında uygulanan ilaçlara dayalı interfere edici faktörlerin analiz sonuçları üzerindeki etkisini en aza indirerek, analize dayalı verilerin doğruluğunun artırılması da sağlanmıştır. Çalışmada ayrıca, YBÜ'deki hastalarda izlenen farklı prognostik süreçler ve serum ile idrar matrikslerindeki metabolit dalgalanmalarının zamansal olarak ayrı ayrı değerlendirilmesi durumları göz önünde bulundurularak, SARS-CoV-2 virüsünün sebep olduğu kritik COVID-19 tablosunun patofizyolojisinde rol oynayan potansiyel metabolitler ve ilişkili metabolik yollar belirlenmeye çalışılmıştır. Dahası, elde edilen veriler, YBÜ'deki hastalarda metabolit düzeyindeki moleküler değişikliklerin çeşitli prognostik sonuçları öngörmede prospektif olarak kullanılabileceğine dair öncü olabilecek bilgiler ortaya koymuştur.

5.1 Kritik COVID-19'da Serum Analizleri: Anlamlı Prognostik Metabolitler

Çalışmamızda serum örneklerinin analiz sonuçlarına dayalı prognostik değerlendirme sırasında belirli metabolitlerin (kreatin, tirozin, formik asit ve fenilalanin) seviyelerinde önemli değişiklikler gözlemlenmiş olup, YBÜ'deki hastalardaki bu metabolit değişimlerinin belirli biyokimyasal yollarda da çeşitli düzensizliklere yol açabileceği görülmüştür.

Kreatin ve tirozin metabolit seviyeleri PS ve Vefat gruplarında ST grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur (**Tablo 2**). Özellikle, tirozin seviyeleri en yüksek Vefat grubunda gözlemlenirken, kreatin seviyeleri en yüksek PS grubunda tespit edilmiştir. PS grubundaki kreatin seviyelerindeki bu belirgin artış, azot metabolizmasının yaygın ve uzun süreli düzensizliği veya böbrek disfonksiyonunun uzun vadeli etkisi ile açıklanabilir (107). Ek olarak, fosfokreatinin kreatine dönüşümünün, ağırlıklı olarak kas hücrelerinde kreatin kinaz tarafından gerçekleştirildiği ve özellikle kritik COVID-19 gibi şiddetli enfeksiyon durumlarında oluşan ağır hücresel hasara yanıt olarak

arttığı literatürdeki bazı çalışmalarda ortaya konulmuştur (108). Ciddi enfeksiyon tablolarında hızlı artışı görülebilen ‘fosfokreatinin kreatine dönüşüm’ fenomeni, çalışmamızın bulgularıyla da tutarlı olup, COVID-19 gibi yoğun inflamasyon, hücre hasarı ve artan enerji ihtiyacının gözlemlendiği durumlarda, serum kreatin seviyelerinde de tespit edilebilir ve anlamlı bir artışa yol açabileceğini göstermektedir (109). Ayrıca, PS grubundaki hastalarda serum kreatin seviyelerindeki daha belirgin artışın, bu hastalardaki periferik kas uyarımındaki bozulmaya bağlı olarak, yoğun bakım tedavisi sırasında daha fazla kas atrofisine yol açmasından kaynaklanabileceği de düşünülebilir. Bir diğer metabolomik çalışmada ise beyin bioenerjetiklerinin belirteçleri olan kreatin ve fosfokreatin seviyeleri değerlendirilmiş (110) ancak, PS gibi nörolojik semptomlar sergileyen post-COVID-19 hastalarının beyin korpus kallozum dokusunda, bu analitlerin doku birikiminin hastalar ve sağlıklı kontrol grupları arasında anlamlı bir fark göstermediği rapor edilmiştir (110). Buna karşın çalışmamızda, PS ve Vefat gruplarında serum metabolit seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı artışlar olduğu ve farklı prognostik gruplar arası ikili karşılaştırmalarda serum kreatin seviyelerindeki değişimlerin bazı önemli metabolik yollarda (glisin, serin ve treonin metabolizması, arjinin ve prolin metabolizması) (78) önemli değişikliklere yol açabileceği tespit edilmiştir. İlgili değişikliklerin, COVID-19'un neden olduğu daha ciddi ve belirgin şekilde bozulmuş enerji metabolizmasıyla ilişkili olduğu, bunun da büyük bir inflamatuvar yanıt (sitokin fırtınası) (22), oksidatif stres (mitokondriyal işlevlerin bozulması) (111) ve organ disfonksiyonuna (özellikle karaciğer ve böbreklerde) yol açtığı çeşitli çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Literatürde, COVID-19 hastalarında CRP ve IL-6 gibi inflamatuvar belirteçlere benzer şekilde serum/plazma kreatin metabolit düzeylerinde de anlamlı bir artış olduğu gösteren ve özellikle ciddi COVID-19 hastaları ile hafif hastalığı olanlar veya sağlıklı kontroller kıyaslandığında kreatin düzeyleri arasında önemli farklar olduğu gösterilmiştir (22). Ancak çalışmamız literatürde bulunan önceki çalışmalara ek olarak, yoğun bakımda bulunan hastalarda dalgalanan kreatin düzeylerinin farklı prognostik sonuçları öngörebileceğini ortaya koyması açısından oldukça değerlidir. Buna karşın, COVID-19 pozitif hastalar ile sağlıklı kontrolleri karşılaştıran başka bir araştırmada gruplar arasında plazma kreatin düzeylerinde anlamlı bir fark belirlenemediğini söyleyen çalışmalar da mevcuttur (91). Bu durum, kritik hasta

grupları arasında metabolit değişikliklerinin değerlendirilmesinin ve hastalık progresyonunu izlemek için kullanılabilecek farklı metabolitlerin belirlenmesinin önemini açıkça vurgulamaktadır. Ayrıca, ciddi COVID-19 hastalığı sonrası iyileşen bireylerin sıklıkla nörolojik sekellerle karşılaştığı ve hastanede yatış sırasında potansiyel olarak çoklu organ yetmezliği yaşadıklarının da bildirildiğı çalışmalar mevcuttur (112). Bu durumun, belirli amino asitlerin ve onların metabolitlerinin plazma konsantrasyonlarında dalgalanmalara yol açtığı (Azalan alanin, triptofan, serin, glutamin ve histidin düzeyleri veya artan fenilalanin, tirozin ve kreatin düzeyleri) ve çalışmamızdaki bulgularla uyumlu olduğu izlenmiştir (113). Çünkü, belirli amino asitlerin bağışıklık sistemi, hücre yenilenmesi veya doku onarımı gibi süreçler üzerinde kritik rolleri bulunmaktadır (114) ve dolayısıyla bu amino asitlerin metabolizmasındaki anormallikler nörolojik defisitlere veya çoklu organ yetmezliğine neden olabilir (115). Bu bağlamda çalışmamız, yoğun bakımda bulunan kritik COVID-19 hastalarının prognostik ayrımı ve hastalık progresyonunun izlenmesi için kullanılabilecek kreatin, tirozin, formik asit ve fenilalanin gibi serum metabolit düzeylerindeki anlamlı değişiklikleri göstererek literatüre önemli katkıda bulunmaktadır.

Prognostik gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren bir başka metabolit olan tirozin; nörotransmitterlerin (dopamin, epinefrin, norepinefrin) , tiroid hormonlarının, melanin ve çeşitli proteinlerin sentezi için oldukça önemli bir öncül olup, çeşitli çalışmalarda ciddi COVID-19 hastalarında plazma düzeylerinde ve metabolizmasında anlamlı bir değişiklik olduğu belirlenerek, hastalık progresyonuyla ilişkili metabolik dalgalanmalara sebep olabileceğı gösterilmiştir (116). Çalışmamızın sonuçlarını destekleyen bu bulgulara ek olarak, bazı metabolomik çalışmalar, ciddi COVID-19 hastalarında fenilalanin ve triptofan gibi diğer aromatik amino asitlerle birlikte tirozin düzeylerinde de belirgin artışlar gözlemlemiş ve bunun sistemik inflamasyonla ilişkili hepatik disfonksiyonu veya artmış protein katabolizmasını işaret ettiğini belirtmiştir (109,117). Çalışmamızın bulguları önceki araştırmalarla benzer ve uyumlu olsa da, literatüre yeni bir perspektiften katkı da sağlamıştır. Özellikle, çalışmamız yalnızca yoğun bakımda (OSCI skoru = 5–8) tedavi gören ve farklı prognozlara sahip kritik COVID-19 hastalarını içermekte olup, bu tür kritik hastaların tedavisi sırasında kreatin

ve tirozin gibi metabolit düzeylerindeki dalgalanmaların izlenmesinin önemini direkt olarak vurgulamaktadır. Bu tür bir yaklaşım, kritik enfeksiyonlar sırasında meydana gelen metabolik değişikliklerin anlaşılmasına, hastalık progresyonunun ve sonuçlarının yakın takibinin yapılabilmesine ve terapötik stratejilere rehberlik edilmesine katkı sağlayabilir. Ayrıca, çalışmamız aşı ile ilişkili analitik etkilerin potansiyel müdahalesini ortadan kaldırmak amacıyla pandeminin başında (Nisan 2020) toplanan kritik hasta örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu nokta, çalışmayı önceki araştırmalardan ayırarak, örneklerin aynı anda hem prognostik hem de zaman bazlı değerlendirmelerini sağlamaktadır (78,80). Literatürdeki bazı çalışmalar akut COVID-19 dönemi ile iyileşme evresindeki hasta gruplarını karşılaştırırken, akut hastalık döneminde plazma tirozin ve öncüsü olan fenilalanin düzeylerinin artmış olduğunu ancak, iyileşme ile birlikte bu düzeylerin de azaldığını bildirmiştir (80,109). Çalışmamızda da bu aromatik metabolitlerin serum düzeylerinin kontrol grubuna (ST) kıyasla, Vefat ve PS gruplarında arttığı gözlenmiştir. Ancak, her iki grupta tirozin düzeylerindeki benzer oransal artışa rağmen, fenilalanin düzeylerindeki oransal artış Vefat grubunda belirgin şekilde daha fazladır (**Tablo 2**). Bu farklılık, kritik COVID-19 hastalarının izleminde fenilalanin/tirozin oranının da potansiyel bir takip ölçütü olabilme rolünü vurguluyor olabilir (117). Ayrıca, KEGG analiz bulgularımızda ise tirozin ve fenilalanin metabolitleri tarafından önemli ölçüde etkilenen "fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi" (78) ve "fenilalanin metabolizması" (109) yollarında da anlamlı değişiklikler olduğu ortaya konulmuştur. Bu metabolik yollarındaki değişimler, PS ve Vefat gruplarını ST grubundan etkin bir şekilde ayırmaya yardımcı olabilecek önemli etki değerleri ortaya koymaktadır (**Tablo 4**). Bu yolların bağışıklık sistemi fonksiyonu (118), nörotransmitter üretimi (119) ve hücrel stres yanıtlarında (117) kritik rolleri göz önüne alındığında, bu değişikliklerin çalışmamız sonuçlarını güçlendirdiği görülmektedir. Daha spesifik olarak ise, sepsis veya viral enfeksiyonlar sırasında artan fenilalanin ve tirozin düzeyleri, bağışıklık sistemi aktivasyonu ve kritik COVID-19 hastalarında görülen kardiyovasküler hastalık riskiyle de ayrıca ilişkilendirilmiştir (120,121). Tirozin bazlı nörotransmitterlerin (dopamin, epinefrin ve norepinefrin) sentezi dikkate alındığında, tirozin ve metabolitlerinin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin nörolojik fonksiyonu önemli ölçüde etkileyebileceği önceki

çalışmalarla detaylıca belirtilmiştir (109,122). İlave olarak, fenilalanin ve tirozin gibi aromatik amino asitlerin, şiddetli enfeksiyonlar sırasında bağışıklık sistemini uyaran B hücrelerini aktive ettiği de literatürde bildirilmiştir (121). Bu nedenle, çalışmamızın sonuçları, bu amino asitlerin şiddetli enfeksiyonlar sırasında serum veya plazma konsantrasyonlarındaki artışın nedenini benzer şekilde açıklamaktadır ve literatürü destekleyici niteliktedir. Güncel çalışmalarda ayrıca, fenilalanin/tirozin oranındaki artışın hastalık şiddetini ve progresyonunu gösterdiği de ortaya konulmuştur (117,122). Yine çalışmamızda bu oran doğrudan karşılaştırma parametresi olarak analiz edilmemiş olmasına karşın, kontrol grubuna kıyaslandığında PS grubunda Vefat grubuna göre daha büyük bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm bu çalışma ve bulgulara karşın, literatürde çalışmamız karşıtı bulgulara sahip birkaç çalışma da bulunmaktadır. İlgili bir çalışmada, hastalık şiddetinden bağımsız olarak, COVID-19 grubunda plazma tirozin düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu bildirmiştir (24). Ayrıca, yine bir diğer araştırmada COVID-19 sebepli yoğun bakım hastalarında azalmış tirozin düzeyleri ve artmış fenilalanin/tirozin oranı olduğu bildirilmiştir (123). Tüm bu bulgular, yoğun bakımda COVID-19 hastaları arasında aromatik amino asitlerin düzeylerindeki değişikliklerin ve fenilalanin/tirozin oranının ayırt edici faktörler olarak araştırılmasını içeren daha kapsamlı zamansal ve prognostik çalışmalara duyulan ihtiyacı yeniden vurgulamaktadır.

Mevcut literatürde, COVID-19 ile ilişkili olarak insan serum ve plazma örneklerindeki formik asit seviyelerini değerlendiren çalışma sayısı oldukça nadir olmasına rağmen, idrar örneklerindeki formik asit seviyesi değişikliklerini bildirmiş bazı çalışmalar bulunmaktadır (105,124). Bu çalışmaların birinde, COVID-19 hastalarında idrar formik asit seviyelerinin yaşa göre değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (105). Diğer bir çalışmada ise, COVID-19 hastalarında idrar formik asit seviyelerindeki artışın, bakteriyel floraya ait değişikliklerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (124). Bununla birlikte, bir başka metabolomik çalışmada, HIV ile enfekte hastalarda “glikoksilat ve dikarboksilat metabolizması” yolağındaki bozulmalara bağlı olarak bağırsak mukozası bütünlüğünün bozulması, mikrobiyom ve flora değişiklikleri ile kronik inflamasyon ilişkili plazma formik asit seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir (125). Genel olarak bu çalışmalar, COVID-19 ve HIV gibi viral enfeksiyonlarda

formik asit seviyelerindeki değişimlere katkıda bulunan potansiyel metabolik ve mikrobiyal faktörleri ortaya koymuş ve viral hastalıklar bağlamında metabolizma, bağışıklık yanıtları ve mikrobiyal sağlık arasındaki daha geniş bağlantılara işaret etmiştir. Bu çalışmalar ışığında, çalışmamızda izlenen PS ve Vefat gruplarındaki serum formik asit seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla yükseldiğı ve “glikoksilat ve dikarboksilat metabolizması” yolağındaki bozulmaların literatüre yeni bir katkı sağladığı görülmüştür. Yaptığımız çalışmada, serum formik asit seviyelerinin PS grubunda Vefat grubuna göre 2 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu farklılık, hipoksi seviyeleri, asit-baz homeostazındaki bozulmalar ve formik asit gibi toksik organik asitlerin artan sentezi dahil olmak üzere hastalara özgü çeşitli faktörlerle ilişkilendirilebilir. Son olarak, iki yönlü ANOVA analizinde formik asit seviyelerinde prognostik gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiş, ancak ASCA (leverage/SPE oranları) tarafından bu farklılık doğrulanmamıştır. Bu nedenle, yalnızca mevcut bulgulara dayanarak, kritik COVID-19 hastalarının prognostik gruplarını ayırt etmek için serum formik asit seviyelerindeki değişimlerin değerlendirilmesi tamamen güvenilir olarak kabul edilemez. Bu bulgular, farklı hasta grupları arasındaki potansiyel metabolik farklılıkları vurgulayarak, daha kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi gereken ileri araştırmaların gerekliliğini tekrardan ortaya koymuştur.

Yaptığımız çalışmada, COVID-19 nedeniyle yoğun bakımda yatan kritik COVID-19 hastalarının serum konsantrasyonlarındaki gerçek zamanlı metabolit değişimlerine dayalı olarak yapılan ASCA analizlerinde, lizin, izolösin ve gliserol metabolitleri zaman faktörü temelli değerlendirmelerde iyi modellenmiş paternler sergilemiştir. Ancak, bu metabolitler, permütasyon testi kullanılarak gerçekleştirilen doğrulama sürecinde elde edilen sonuçlar ($p = 0.735$) nedeniyle anlamlı metabolitler olarak değerlendirilememiştir. Bazı çalışmalar, bu analitler ile COVID-19 hastalığının şiddeti arasında bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur (21,126). Özellikle, izolösinin SARS-CoV-2 replikasyonunda önemli bir rol oynadığı bildirilmiş (21) ve plazma seviyelerindeki düşüşlerin kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (24). Bununla birlikte, mevcut çalışmamızda ise ASCA doğrulama sürecinde zaman faktörünün istatistiksel anlamlı bir etken olarak tanımlanmaması nedeniyle, bu analitlerle ilgili elde edilen sonuçlar güvenilir bulunmamış ve kesin bir şekilde değerlendirilememiştir.

5.2 Kritik COVID-19’da İdrar Analizleri: Anlamlı Prognostik Metabolitler

Çalışmamız kapsamında, idrar örneklerinin analiz sonuçlarına dayalı olarak yapılan prognostik değerlendirmelerde serum örneklerinden farklı olarak, bazı metabolitlerin (taurin, 3-hidroksivalerik asit, formik asit, arjinin, malik asit ve D-laktoz) seviyelerinde anlamlı değişiklikler tespit edilmiştir. Bu bulgular, yoğun bakım ünitesindeki hastalarda bu metabolitlerin idrar düzeylerindeki değişiminin, çeşitli biyokimyasal yollarda belirgin düzensizliklere neden olabileceğini ortaya koymuştur. Özellikle, bu metabolitlerin seviyelerindeki dalgalanmalar, COVID-19’un şiddetli formlarında metabolik dengenin nasıl bozulabileceğine ve bunun farklı prognozlar üzerindeki etkilerine ışık tutmaktadır. Serum örneklerinde görüldüğü gibi idrar örneklerinde de izlenebilen bu tür farklı metabolit değişimlerinin, kritik hastalık sürecinde oldukça fazla öneme sahip biyokimyasal süreçlerde rol oynadığı ve bu süreçlerin genelde enerji üretimi, bağışıklık yanıtı ve hücrel strese bağlı yoğun inflamasyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar, farklı matrikslerde incelenebilen metabolit seviyelerindeki değişimlerin, özellikle çalışmamız kapsamında değerlendirilen COVID-19 enfekte yoğun bakım hastalarında hem prognostik farklılıkların belirlenmesi hem de klinik yönetimin iyileştirilmesi için önemli bir araç olabileceğini göstermektedir.

Karşılaştırılan farklı prognostik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı idrar seviye farkı bulunan metabolitlerden biri olan, taurin metabolitinin seviyesi ST grubuna göre Vefat grubunda hafif bir artış gösterirken, PS grubunda ise belirgin bir artış gözlenmiştir (**Tablo 2**). Kükürt içeren ve sülfür türevi bir amino asit olan taurin, vücutta çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerde kritik rol oynar ve özellikle YBÜ’de COVID-19 gibi viral enfeksiyon sebepli yatan hastalar için idrar seviyelerindeki değişimlerin belirlenebilmesi, bu hastaların prognostik süreç takipleri ve bu süreçlerin yönetimi sırasında önemli bir yere sahip olabilir. Taurin ayrıca vücutta, safra asidi konjugasyonu, osmoregülasyon, membran stabilizasyonu ve antioksidatif savunma gibi süreçlerde de oldukça önemli bir role sahiptir, ilaveten immün yanıtın düzenlenmesi, mitokondriyal fonksiyonların ve kalsiyum homeostazının düzenlenmesinde aktif role sahiptir (127). YBÜ’deki kritik COVID-19

hastalarında idrar taurin seviyelerindeki değişimlerin, sistemik inflamasyon, oksidatif stres ve karaciğer veya böbrek hasarı gibi organ disfonksiyonlarından kaynaklanan metabolik bozukluklarla ilişkili olabileceği de bazı çalışmalarda bildirilmiştir (128). Dahası, taurin'in inflamasyonu modüle etme ve mitokondriyal fonksiyonları düzenlemedeki rolü, ağır enfeksiyonlar ve kritik hastalıklardaki önemini daha da vurgulamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar, taurin eksikliğinin oksidatif hasara karşı artan duyarlılık, azalmış bağışıklık direnci ve kritik hastalarda kötü sonuçlarla ilişkili olduğunu göstermiştir (127,129). Çalışmamız sonuçlarına göre de ST hastalarında taurin'in idrar konsantrasyonları, dolayısıyla idrar ile atılımının diğer gruplara göre daha düşük seviyelerde olduğu önceki çalışmalarla uyumlu şekilde bulunmuştur. PS grubundaki hastalarla Vefat grubu kıyaslandığında ise, PS grubu hastalarının idrar taurine seviyelerindeki daha yüksek konsantrasyonların ise uzun süreli yoğun bakım takip sürecindeki organ hasarları, yaygın kas kayıpları veya periferik sinir hasarları kaynaklı olabileceği literatürdeki önceki çalışmalara dayalı olarak düşünülmüştür.

Literatürdeki metabolomik çalışmalar değerlendirildiğinde ise, artan serum veya plazma taurin seviyelerinin, sitokin fırtınalarının neden olduğu oksidatif strese karşı artmış bir antioksidatif yanıtı yansıtabileceği, azalan seviyelerin ise; organ disfonksiyonuna bağlı olarak taurin biyosentezinde bozulmalara işaret edebileceği bildirilmiştir (130). Yine aynı çalışmalarda, COVID-19'un akut fazında gözlemlenen yüksek plazma taurin seviyelerinin, kontrol gruplarına kıyasla 3 aylık takip sürecindeki hastalarda da belirgin şekilde artmış olarak izlendiğinden bahsedilmektedir ve bu şekilde plazma veya serum taurin artışını hem akut COVID-19 hem de PACS ile ilişkilendirilmiştir (105,130,131). İlave olarak, çalışmamız dahilinde KEGG analiz sonuçlarında, özellikle PS grubu ile kontrol grubu arasında idrar taurin seviye farklılıkları etkisi ile anlamlı farklı olarak belirlenmiş 'taurin ve hipotaurin metabolizması' yolağı, literatürde yapılmış çalışmaların birinde COVID-19 hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu plazma seviyeleri arasında anlamlı etkilenen metabolik yollar arasında sıralanmıştır (130) ve çalışmamız bu yönüyle de güncel literatürü destekleyici niteliktedir. Entegratif olarak LC-MS, GC-MS ve NMR metodlarının tümü kullanılarak yapılan metabolomik çalışmalarda da, ciddi COVID-

19 hastalarında hafif semptomlar gösteren hastalara veya kontrol gruplarına kıyasla yükselmiş serum ve plazma taurin seviyelerinden bahsedilmiştir (132). Bizim çalışmamızda ise incelenen farklı prognostik gruplar arasında serum taurin düzeyleri arasında grupları ayırabilecek anlamlı bir fark belirlenememişken, idrar analizlerinde PS ve Vefat gruplarında ST grubuna göre anlamlı artışlar belirlenmiştir. İdrar seviyelerindeki yükselişler böbrek filtrasyonundaki değişiklikler, bağırsak mikrobiyotasındaki bozukluklar veya safra asidi metabolizmasındaki düzensizliklerle ilişkilendirilebilirken, düşüşler ise glomerüler filtrasyon veya tübüler geri emilimdeki bozukluklara işaret edebilir (131). Bu durum düşünüldüğünde, hem Vefat hem de PS grubu dahilindeki hastaların, YBÜ tedavi süreçlerindeki çeşitli komorbidite faktörlerinin de araştırılarak çalışmaya dahil edilmesi, çalışma sonuçlarını daha açıklayıcı hale getirebilir. Ancak, taurin metabolitinin kalp kası, iskelet kasları ve beyin üzerindeki önemli işlevleri bilindiğinden ve nörolojik işlevlerin gerçekleştirilmesindeki önemli rolü de düşünüldüğünde; PS gibi nörolojik sekele sahip ve uzun süreli hastane yatışı olan hasta gruplarında çoklu kas kayıpları ve periferik nöron tahribatlarından dolayı, çalışmamız kapsamında PS grubunda belirlenen idrar taurin seviyelerindeki diğer gruplara kıyasla daha yüksek artışlar önceden de bahsedildiği gibi oldukça anlamlı olarak düşünülebilir. Yine bu noktada çalışmamız bulgularını destekleyici nitelikte, idrar veya serum taurin seviye artışları ve COVID-19 hastalık ciddiyeti arasında pozitif korelasyonları açıklayan literatür çalışmaları da bulunmaktadır (105,124,131). Ayrıca, idrar taurininin, oksidatif stres veya asit-baz dengesizlikleri gibi akut metabolik değişimlerin daha dinamik bir göstergesi olarak hizmet ettiği düşünülürken, serum taurininin kronik hastalık şiddetini veya doku hasarını yansıttığı bildirilmektedir (128). Bundan dolayı, hem serum hem de idrar taurin analizlerinin beraber gerçekleştirilip yorumlanması, ilgili hasta gruplarında metabolik disfonksiyonları ve hastalık prognostik farklılıklarını anlamada daha bütünsel bilgiler sağlayarak, COVID-19 gibi kritik hastalıkların anlaşılmasında değerli bir rol oynayabilir.

İdrar örnekleri ile yapılan istatistiksel analizlerde prognostik gruplar arası anlamlı bulunan diğer metabolitlerden olan, 3-hidroksivalerik asit ve formik aside gelindiğinde ise; bu metabolitlerin güncel literatürde COVID-19 ile ilişkilendirildiği oldukça az

çalışma bulunmaktadır. Bu noktada yaptığımız çalışmada bulduğumuz öncü veriler, ileride bu analitleri kapsayacak şekilde yapılabilecek daha kapsamlı çalışmalara yol gösterici niteliktedir. Uçucu bir organik asit olan formik asit sahip olduğu özellikler nedeniyle özellikle LC-MS/MS yöntemi ile yapılan çoğu analizlerde kritik rol oynamaktadır. LC-MS/MS yöntemi ile yapılan çalışmalarda mobil faz katkı maddesi olarak yaygın şekilde kullanılan formik asit, kromatografik ayrımın iyileştirilmesi, iyonizasyon verimliliğinin artırılması, pH dengesinin sağlanması ve analitlerin stabilize edilmesi gibi çeşitli amaçlarla tercih edilmektedir (133). Bizim çalışmamızda ise ¹H-NMR yöntemi ile daha hassas ve selektif bir metabolik profillemeye hedeflendiğinden, burada idrarda izlenen formik asit seviyelerinin ve değişimlerinin, LC-MS/MS yöntemi genelinde oluşabilecek interferans etkilerine benzer bir durum olduğu düşünülmemelidir.

Metanolün birincil toksik metaboliti olan formik asit, vücutta metabolize edildiğinde öncelikle formaldehite ve ardından formik asite dönüşerek metabolik asidoza veya optik sinire zarar vererek potansiyel körlüğe neden olabilir (134). Güncel literatürde özellikle COVID-19 döneminde artmış metanol toksikasyon vakaları, vücutta formik asit birikimi ve beraberinde intraserebral kanama vakalarının artışı da bildiren çalışmalar olmuştur (135). Ayrıca, yine formik asidin metaboliti olan formaldehitin vücutta birikimi ve ilaveten idrarda formik asit konsantrasyon artışı ile Alzheimer hastalık ciddiyeti arasındaki pozitif korelasyonu gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur (136). Bu çalışmalarda özellikle, erken Alzheimer hastalığının tanısında idrar formik asit seviye değişimlerinin takibinin, hastalık tanısı açısından potansiyel ve yeni bir biyobelirteç olabileceği vurgulanmaktadır (136). Çalışmamız verileri incelendiğinde de PS ve Vefat gruplarında, ST grubuna kıyasla anlamlı artmış idrar formik asit seviyeleri izlenmiş ve kritik COVID-19 hastalığı ilişkili YBÜ süreçlerindeki daha kötü prognostik sonuçlarla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. COVID-19 hastalık sürecinde serum, plazma veya idrar formik asit seviye değişimlerini inceleyen metabolik çalışmalarında ise, idrar formik asidinin yaş ile bağlantılı olarak değişebileceği (105) veya bakteriyel flora ile bağlantılı olarak idrar düzeylerinin değişeceği ve COVID-19 hastalarında, sağlıklı kontrollere göre daha yüksek seviyelerde tespit edildiğinden bahsedilmiştir (124). Bizim çalışmamızda da

benzer olarak, daha kötü hastalık prognostik süreçlerine sahip gruplarda idrar formik asit düzeyleri yüksek olarak tespit edilmiştir. Yine literatürde bizim çalışmamıza benzer şekilde, COVID-19 hastalık ciddiyeti ile plazma formik asit seviyeleri arasında pozitif korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (109). Ayrıca, yine çalışmamızda kontrol grubunun PS ve Vefat gruplarından idrar formik asit seviyeleri dayalı 'glyoksilat ve dikarboksilat metabolizması' yolağı üzerinden ayrışması da bu hasta gruplarının intestinal mikrobiyotalarındaki değişimlerden kaynaklanıyor olabilmektedir. Çünkü, ilgili yolağın insanlarda intestinal mikrobiyata aktivitesi kaynaklı etki sürdürdüğü önceki çalışmalarda belirtilmiştir (131). Güncel çalışmamızda ayrıca önceki çalışmaları destekleyecek şekilde, YBÜ'de tedavi gören farklı prognoza sahip kritik COVID-19 hastalarına ait idrar örnek analizlerinde, kötü prognoz ile ilişkili artmış idrar formik asit seviyeleri izlenmiştir ve çalışma tüm bu yönleriyle literatüre önemli katkı sağlayacak niteliktedir.

İdrar analizlerinde PS ve Vefat gruplarında, ST grubuna göre artmış olarak izlenen 3-hidroksivalerik asit metaboliti ise, üçüncü karbonunda bir hidroksil grubu (-OH) bulunan, düz zincirli ve dallanmamış 5 karbonlu bir yağ asididir ve formik aside benzer olarak insan mikrobiotasında bulunan bazı mikroorganizmaların fermantasyon süreçlerinde veya farklı yağ asidi metabolizmalarında ortaya çıkabilen bir ara metabolittir (137). Ancak, 3-hidroksivalerik asidin COVID-19 ile olan ilişkisini gösterir herhangi bir çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır. Buna karşın, vücuttaki protein katabolizması veya vücudun nütrisyonel durumu ile ilişkili olabileceği düşünüldüğünden, YBÜ'de tedavi gören ve farklı prognoza sahip COVID-19 hastalarında 3-hidroksivalerik asit idrar seviyelerinin PS ve Vefat gruplarında kontrol grubuna kıyasla artmış olarak belirlenmesi, beklenen bir sonuç olarak düşünülebilmekte (11) ve literatüre yeni bir katkı sağlayacak potansiyele sahip olarak görülmektedir. Ayrıca, yine 3-hidroksivalerik asit idrar düzeylerinin PS grubundaki hastalarda Vefat grubuna göre daha fazla yükselişinin sebebi ise, yine bu gruptaki hastalarda olan uzun süreli YBÜ takip ve tedavisi ilişkili ya da periferel nöronal hasar kaynaklı yaygın kas hasarı olarak değerlendirilebilir.

İki yönlü ANOVA analizlerinde prognostik gruplar arası istatistiksel anlamlı bulunduğu halde, ASCA analizlerinde belirlenemeyen, arjinin, D-laktoz ve malik asit metabolitleri ile ilgili literatürde yapılmış bazı metabolik çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan bazıları bu metabolitleri çeşitli enfeksiyonlarla ilişkilendirirken, bazıları ise COVID-19 özelinde serum, plazma veya idrar seviye değişimleriyle ilgili sonuçlar sunmuştur. İlgili çalışmaların birinde COVID-19 hastalık başlangıcı ve progresyonu ile ilişkili serum metabolitleri arasında tirozin ve arjinin'in olduğu ve bu metabolitlere dayalı karşılaştırılan gruplar arası etkilenen metabolik yolların, tirozin metabolizması ve arjinin biyosentezi yolları olduğu söylenmiştir (138). Bahsedilen çalışmada kullanılan örnek matriksi de değerlendirildiğinde, özellikle serum tirozin artışları ve hastalık progresyonu arasındaki pozitif korelasyon açısından çalışmamız sonuçlarıyla uyumludur. Ancak, çalışmamız sonuçlarında serum arjinin düzeyleri ile ilgili prognostik gruplar arası anlamlı bir farkı gösteren bulgu izlenmemiştir. Buna karşın, çalışmamızda değerlendirilen idrar örneklerinden Vefat grubuna ait sonuçlardaki idrar arjinin düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük seviyeli bulunması literatürü destekleyici niteliktedir ve Vefat grubundaki hastaların arjinin ilişkili T hücre fonksiyonlarında azalış, vücut katabolik süreçlerinde artış ve beraberinde immün sistem yetersizliğini destekler niteliktedir. İlaveten, PS grubu idrar sonuçlarında izlenen kontrol grubuna göre artmış arjinin seviyeleri ise, bu hastaların daha uzun süreli bir YBÜ izlem sürecinde daha fazla artmış immün yanıtlarını ve dolayısıyla artmış idrar arjinin seviyeleri ile açıklanabilir. Yine başka bir çalışmada da hem vücut immünitesi hem protein sentezi hem de nütrisyonel metabolik süreçlerde önemli görevlere sahip bir amino asit olan arjinin'in serum seviyelerinin COVID-19 enfekte yetişkin ve çocuklarda azalmış olarak bulunduğu ileri sürülmüştür (113). Bu noktada çalışmamız idrar analizlerinde en düşük arjinin konsantrasyonuna sahip grup Vefat grubu olarak izlendiğinden, çalışmamız sonuçları güncel literatürü destekleyici niteliktedir. Ayrıca, yine birçok metabolomik çalışmasında KEGG analizleri sonucu etkilenmiş metabolik yollar içerisinde bulunan, arjinin biyosentez ve, arjinin ve prolin metabolizması yollarının bizim çalışmamız idrar sonuçlarına göre karşılaştırılan prognostik gruplar arasında da anlamlı farklı olarak bulunması da önceki çalışmalarla uyumludur (130). D-laktoz analiti ise genellikle glikoz ve galaktoz monomerlerinden oluşan bir disakkarit grubu karbonhidrattır. D-laktozun hücresel ve

metabolik düzeydeki önemi büyük ölçüde karbonhidrat metabolizmasındaki rolüne ve enerji üretimine dayanır. Çalışmamızda özellikle Vefat grubunda daha yüksek olmak kaydıyla, hem Vefat hem de PS gruplarının idrar sonuçlarında görülen ST grubuna göre artmış D-laktoz metaboliti sonuçlarını tam olarak destekleyici literatürde henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, enfeksiyonlar ve yüksek inflamasyon sırasında, D-laktoz ve diğer karbonhidratların bağırsak mikrobiyotası üzerinde etkileri olduğu ve D-laktozun fermentasyonu sonucu oluşan kısa zincirli yağ asitlerinin intestinal bariyer fonksiyonlarını güçlendirebileceği ve patojenlerin sistemik dolaşıma geçişini engelleyebileceğini (139), yine beraberinde immün yanıtları modüle ederek pro-enflamatuvar süreçlerin regülasyonunda (140) rol aldığını belirten çalışmalar mevcuttur. Bu noktalar düşünüldüğünde ise çalışmamız sonuçları ilgili metabolitle ilgili geçmiş araştırma sonuçlarıyla paralel gözükmetedir ve ST grubunda izlenmiş olan düşük idrar D-laktoz atılımı ile ilgili analitin vücuttaki koruyucu fonksiyonlarının sürdürülebilmesini, açıklayabilir niteliktedir. COVID-19 ile bu analitin daha önceden ilişkilendirildiği herhangi bir çalışma ise henüz bulunmamaktadır, bu yönüyle çalışmamız COVID-19 nedeniyle YBÜ’de izlemi yapılan kritik hasta gruplarında farklı prognostik özelliklere göre idrar D-laktoz seviyelerinde farklılıklar olabileceğini göstermesi ve özellikle bu yükselmenin ST ve PS gruplarına kıyasla en çok Vefat grubunda izlenmesi açısından ön bilgi verici niteliktedir. Malik asit metabolite için ise, idrar örnekleri için yapılan iki yönlü ANOVA analizinde hem prognostik hem de etkileşim faktörleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunan tek metabolit olmasına rağmen, sonrasında prognoz faktörüne dayalı yapılan lineer kovaryat analiz sonuçlarında ‘ $p > 0.05$ ’ olarak izlendiğinden ve önceki analiz sonuçları ile tutarlı olmadığından dolayı, çalışmamız kapsamında güvenilir bir metabolit olarak değerlendirilmemiştir. Ancak önceki çalışmalara bakıldığında, serum malik asit seviyelerindeki değişimlerin COVID-19 hastalık ciddiyeti ile ilişkili olabileceğinin belirtilmiş (141) olduğu ve ayrıca, plazma malik asit seviyelerinde, karaciğer hasarı ve damar endotel fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak ciddi ve kritik COVID-19 hastalarında sağlıklı kontrollere göre yüksek oranda azalma olabileceği ile ilgili bilgiler bulunmaktadır (90). Çalışmamızda ise, bahsedilen çalışmalardan farklı olarak hem idrar matriksi değerlendirilmiş hem de yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip ¹H-NMR metodu kullanılmıştır. Bulgularımızda ise özellikle Vefat grubunda daha yüksek

olacak şekilde, hem Vefat hem de PS gruplarındaki hastaların idrar analizlerinde ST grubuna kıyasla artmış idrar malik asit seviyeleri saptanmıştır. Ancak, çalışmamızda malik asitle ilgili yapılan istatistiksel analizlerde belli uyumsuzluklar olduğundan anlamlı ve güvenilir sonuçlara sahip olmadığı kabul edilerek, ileride yapılacak daha geniş çaptaki metabolik analizlerde ilgili analitle ilgili seviye değişimlerinin daha doğru sonuçlarla aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

Yaptığımız çalışmada, COVID-19 nedeniyle yoğun bakımda yatan kritik hastaların idrar konsantrasyonlarındaki gerçek zamanlı metabolit değişimlerine dayalı olarak yapılan ASCA analizlerinde ise, oxaloasetik asit, 3-hidroksi-3-metilglutarik asit ve etilmalonik asit metabolitleri zaman faktörü temelli değerlendirmelerde iyi modellenmiş paternler sergilemiştir. Ancak, bu metabolitler, permütasyon testi kullanılarak gerçekleştirilen doğrulama sürecinde elde edilen sonuçlar ($p = 0.11$) nedeniyle anlamlı metabolitler olarak değerlendirilememiştir.

6 SINIRLILIKLAR

Bu çalışmanın birkaç önemli sınırlılığı bulunmaktadır. İlk olarak, çalışma COVID-19 pandemisinin erken dönemlerinde YBÜ’de takip ve tedavide olan hastalardan belirli aralıklarla (gerçek zamanlı) alınan örnekler (hem serum hem de idrar örnekleri eş zamanlı olarak) üzerinde gerçekleştirildiği için, örneklem büyüklüğü küçüktür. Ancak, çalışmada ilgili hastalardaki prognostik farklılıklar ile birlikte cinsiyet ve yaş benzerlikleri dikkate alınarak örnekler toplanmış olup, bu durum örnekleri değerli kılmakla birlikte, bulgularımızın daha geniş bir popülasyona genellenebilirliği konusunda soru işaretleri bulunmaktadır. Çalışmanın bir diğer önemli sınırlılığı, kontrol grubunun sağlıklı bireylerden değil, COVID-19 enfeksiyonu sonrası YBÜ’ye yatırılan ve iyileştikten sonra taburcu edilen hastalardan (ST grubu) oluşmasıdır. Bu durum, uygun örneklerin ilgili zamandaki toplanmasına ilişkin kısıtlamalardan kaynaklanmıştır. Ayrıca, yaş, cinsiyet ve hastanede (YBÜ) kalış süresi çalışmaya dahil edilmiş olsa da, küçük örneklem büyüklüğü, bu faktörlerin zamana bağlı veya prognostik serum/idrar metabolit değişiklikleriyle potansiyel ilişkilerinin daha detaylı incelenmesini sınırlamıştır. Bu nedenle, gelecekteki çalışmalar daha büyük örneklem büyüklükleriyle gerçekleştirilmeli ve hasta komorbiditeleri, özel tedaviler ve kullanılan belirli ilaçlar gibi kapsamlı klinik karakterizasyonlar da dahil edilmelidir. Bu noktalar, COVID-19 sonuçlarını değerlendirmede kullanılacak farklı metabolomik verilerin sağlamlığını, güvenilirliğini ve öngörü gücünü arttıracaktır.

7 SONUÇ

COVID-19, YBÜ'deki hastaların serum ve idrar örneklerinde farklı metabolik değişiklikler yaratabilir ve bu değişimlerin ayrı ayrı saptanabilmesi, ilgili kritik hasta gruplarında prognostik farklılıklara dayalı bireysel sınıflama ve hasta yönetimini mümkün kılabilir. PS ve Vefat gruplarında, serum analizlerinde sırasıyla kreatin ve tirozin düzeylerinin, idrar analizlerinde ise taurin, 3-hidroksivalerik asit ve formik asit düzeylerinin artışı, ST grubu ile karşılaştırıldığında bu metabolitlerin potansiyel prognostik biyobelirteçler olarak değerlendirilebileceğini göstermiş ve YBÜ'deki kritik COVID-19 hastalarının hastalık seyrine dair değerli bilgiler sunmuştur. Çalışmamız ayrıca, aşı etkisinden bağımsız olarak elde edilen örneklerin analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında yapılan analizlerde her ne kadar gerçek zamanlı ve anlamlı olarak tanımlanabilecek metabolit değişimleri görülmemiş olsa da, daha büyük bir örneklem büyüklüğüyle hastalık ilerleyişine dair zamansal belirteçlerin tanımlanabilmesi de mümkün olabilir. Ayrıca, farklı prognostik gruplar arasında ilgili metabolitler üzerinden en çok etkilenen yolaklar ($p < 0.05$), serum analizlerinde 'fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi' yolağı; idrar analizlerinde ise 'taurin ve hipotaurin metabolizması' yolağı olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, bu çalışma serum analizleri için, kreatin veya tirozin düzeylerindeki değişikliklerden etkilenen 'glisin, serin ve treonin metabolizması', 'fenilalanin metabolizması', 'arjinin ve prolin metabolizması' ve 'tirozin metabolizması' gibi; idrar analizleri için ise, taurin veya formik asit düzeylerinden etkilenen 'taurin ve hipotaurin metabolizması' ve 'glyoksilat ve dikarboksilat metabolizması' gibi diğer metabolik yolakların da farklı prognostik gruplar arasında dikkate değer şekilde değiştiğini göstermiştir. Bu bulguların daha geniş ölçekli çalışmalarla doğrulanması, kişiselleştirilmiş kritik hasta takip ve tedavilerini geliştirmek ve özellikle kritik COVID-19 nedeniyle YBÜ'de takibi yapılacak hasta sonuçlarını iyileştirmek açısından oldukça önemlidir.

8 KAYNAKLAR

1. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. Vol. 20, Nature Reviews Microbiology. Nature Research; 2022. p. 270–84.
2. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, Taylor MD, Sinha P, Calfee CS, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. Vol. 8, The Lancet Respiratory Medicine. Lancet Publishing Group; 2020. p. 1233–44.
3. WHO COVID-19 dashboard. (2024).
4. Ayenew T, Gedfew M, Fetene MG, Workneh BS, Telayneh AT, Edmealem A, et al. Prevalence of mortality among mechanically ventilated patients in the intensive care units of Ethiopian hospitals and the associated factors: A systematic review and meta-analysis. Gebrekidan K, editor. PLoS One [Internet]. 2024 Jul 23;19(7):e0306277. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0306277>
5. Rejdak K, Fiedor P, Bonek R, Łukasiak J, Chełstowski W, Kiciak S, et al. Amantadine in unvaccinated patients with early, mild to moderate COVID-19: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. Eur J Neurol. 2024 Jan 14;31(1).
6. Byeon SK, Madugundu AK, Garapati K, Ramarajan MG, Saraswat M, Kumar-M P, et al. Development of a multiomics model for identification of predictive biomarkers for COVID-19 severity: a retrospective cohort study. Lancet Digit Health. 2022 Sep 1;4(9):e632–45.
7. Tunçay E, Moçin Ö, Ediboğlu Ö, Adıgüzel N, Güngör S, Işcanlı İ, et al. Evaluation of Long-Coronavirus Disease 2019 Cases Readmitted to Intensive Care Units Due to Acute Respiratory Failure: Point Prevalence Study. Thoracic Research and Practice. 2024 Aug 2;25(4):162–7.

8. AlManie S, AlHazami M, Ebrahim A, Attique M. Assessment of Direct Medical Cost of Hospitalized COVID-19 Adult Patients in Kuwait During the First Wave of the Pandemic. *ClinicoEconomics and Outcomes Research*. 2024 Jul;Volume 16:509–22.
9. Chen LM, Li JB, Wu R. Predictors of COVID-19 severity in autoimmune disease patients: A retrospective study during full epidemic decontrol in China. *Heart & Lung*. 2024 Nov;68:272–8.
10. Christodoulou A, Katsarou MS, Emmanouil C, Gavrielatos M, Georgiou D, Tsolakou A, et al. A Machine Learning-Based Web Tool for the Severity Prediction of COVID-19. *BioTech*. 2024 Jul 1;13(3):22.
11. Shi D, Yan R, Lv L, Jiang H, Lu Y, Sheng J, et al. The serum metabolome of COVID-19 patients is distinctive and predictive. *Metabolism*. 2021 May 1;118.
12. Masuda R, Lodge S, Nitschke P, Spraul M, Schaefer H, Bong SH, et al. Integrative Modeling of Plasma Metabolic and Lipoprotein Biomarkers of SARS-CoV-2 Infection in Spanish and Australian COVID-19 Patient Cohorts. *J Proteome Res*. 2021 Aug 6;20(8):4139–52.
13. Haj AK, Hasan H, Raife TJ. Heritability of Protein and Metabolite Biomarkers Associated with COVID-19 Severity: A Metabolomics and Proteomics Analysis. *Biomolecules*. 2023 Jan 1;13(1).
14. MARSEGLIA GL, GELARDI M, SANTUS P, CIPRANDI G. Reappraisal of Pidotimod: an immunomodulatory agent with 30-year evidence. *Minerva Med*. 2024 Jul;
15. Peluso MJ, Ryder D, Flavell RR, Wang Y, Levi J, LaFranchi BH, et al. Tissue-based T cell activation and viral RNA persist for up to 2 years after SARS-CoV-2 infection. *Sci Transl Med*. 2024 Jul 3;16(754).
16. Zhang Q, Jiao L, Chen Q, Bulstra CA, Geldsetzer P, de Oliveira T, et al. COVID-19 antibody responses in individuals with natural immunity and with vaccination-induced immunity: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev*. 2024 Jul 19;13(1):189.

17. Sumner KM, Yadav R, Noble EK, Sandford R, Joshi D, Tartof SY, et al. Anti-SARS-CoV-2 Antibody Levels Associated With COVID-19 Protection in Outpatients Tested for SARS-CoV-2, US Flu Vaccine Effectiveness Network, October 2021–June 2022. *J Infect Dis.* 2024 Jul 25;230(1):45–54.
18. Matsuyama T, Yoshinaga SK, Shibue K, Mak TW. Comorbidity-associated glutamine deficiency is a predisposition to severe COVID-19. *Cell Death Differ.* 2021 Dec 18;28(12):3199–213.
19. Lewis HM, Liu Y, Frampas CF, Longman K, Spick M, Stewart A, et al. Metabolomics Markers of COVID-19 Are Dependent on Collection Wave. *Metabolites.* 2022 Aug 1;12(8).
20. Páez-Franco JC, Torres-Ruiz J, Sosa-Hernández VA, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Pérez-Fragoso A, et al. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Sci Rep.* 2021 Dec 1;11(1).
21. Thiele I, Fleming RMT. Whole-body metabolic modelling predicts isoleucine dependency of SARS-CoV-2 replication. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022 Jan 1;20:4098–109.
22. Thomas T, Stefanoni D, Reisz JA, Nemkov T, Bertolone L, Francis RO, et al. COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. *JCI Insight.* 2020 Jun 23;5(14).
23. Bruzzone C, Lu S, Diercks T, Arana E, Gil-martí J, Embade N, et al. iScience II SARS-CoV-2 Infection Dysregulates the Metabolomic and Lipidomic Profiles of Serum the Metabolomic and Lipidomic Profiles of Serum. 2020;
24. Gama-Almeida MC, Pinto GDA, Teixeira L, Hottz ED, Ivens P, Ribeiro H, et al. Integrated NMR and MS Analysis of the Plasma Metabolome Reveals Major Changes in One-Carbon, Lipid, and Amino Acid Metabolism in Severe and Fatal Cases of COVID-19. *Metabolites.* 2023 Jul 1;13(7).

25. Baranovicova E, Bobcakova A, Vysehradsky R, Dankova Z, Halasova E, Nosal V, et al. applied sciences The Ability to Normalise Energy Metabolism in Advanced COVID-19 Disease Seems to Be One of the Key Factors Determining the Disease Progression — A Metabolomic NMR Study on Blood Plasma. 2021;4–6.
26. Schmelter F, Mallagaray A, Ehlers M, Lehrian S, Lixenfeld AS, Martin E, et al. Metabolic and Lipidomic Markers Differentiate COVID-19 From Non- Hospitalized and Other Intensive Care Patients. 2021;8(December):1–12.
27. Valdés A, Moreno LO, Rello SR, Orduña A, Bernardo D, Cifuentes A. Metabolomics study of COVID-19 patients in four different clinical stages. *Sci Rep.* 2022;12(1):1–11.
28. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. Vol. 7, *Nature Reviews Microbiology*. 2009. p. 439–50.
29. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. Vol. 24, *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2016. p. 490–502.
30. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020 Feb 20;382(8):727–33.
31. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens Emerging Infectious Diseases • www [Internet]. Available from: www.cdc.gov/eid
32. COVID-19 Weekly Epidemiological Update Global overview.
33. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. Vol. 3, *Annual Review of Virology*. Annual Reviews Inc.; 2016. p. 237–61.
34. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):281-292.e6.

35. Gan HH, Twaddle A, Marchand B, Gunsalus KC. Structural Modeling of the SARS-CoV-2 Spike/Human ACE2 Complex Interface can Identify High-Affinity Variants Associated with Increased Transmissibility. *J Mol Biol.* 2021 Jul 23;433(15).
36. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8.
37. Ghosh AK, Brindisi M, Shahabi D, Chapman ME, Mesecar AD. Drug Development and Medicinal Chemistry Efforts toward SARS-Coronavirus and Covid-19 Therapeutics. Vol. 15, *ChemMedChem*. John Wiley and Sons Ltd; 2020. p. 907–32.
38. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshev V. Sars-Cov-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
39. Romano M, Ruggiero A, Squeglia F, Maga G, Berisio R. A structural view of sars-cov-2 rna replication machinery: Rna synthesis, proofreading and final capping. Vol. 9, *Cells. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*; 2020.
40. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. Vol. 19, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research; 2021. p. 155–70.
41. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients [Internet]. Available from: <https://www.science.org>
42. Molina-Molina M, Hernández-Argudo M. Respiratory consequences after COVID-19: Outcome and treatment. *Revista Espanola de Quimioterapia*. 2022 Apr 1;35:67–72.
43. Estenssoro E, Loudet CI, Dubin A, Kanoore Edul VS, Plotnikow G, Andrian M, et al. Clinical characteristics, respiratory management, and

- determinants of oxygenation in COVID-19 ARDS: A prospective cohort study. *J Crit Care*. 2022 Oct 1;71.
44. Sayit AT, Elmali M, Deveci A, Gedikli O. Relationship between acute phase reactants and prognosis in patients with or without covid-19 pneumonia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2021;63.
 45. Pancaldi E, Pascariello G, Cimino G, Cersosimo A, Amore L, Alghisi F, et al. Thrombotic risk in patients with COVID-19. Vol. 22, *Reviews in Cardiovascular Medicine*. IMR Press Limited; 2021. p. 277–86.
 46. Yin J, Liu S, Zhu Y. An overview of the highly pathogenic H5N1 influenza virus. Vol. 28, *Virologica Sinica*. 2013. p. 3–15.
 47. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. Vol. 395, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2020. p. 1033–4.
 48. Thepmankorn P, Bach J, Lasfar A, Zhao X, Souayah S, Chong ZZ, et al. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2 infection: The spectrum of its neurological manifestations. Vol. 138, *Cytokine*. Academic Press; 2021.
 49. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation*. 2020 May 1;130(5):2620–9.
 50. Shi S, Qin M, Shen B, Cai Y, Liu T, Yang F, et al. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol*. 2020 Jul 1;5(7):802.
 51. Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T, et al. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol*. 2020 Jul 1;5(7):811.
 52. Middeldorp S, Coppens M, van Haaps TF, Foppen M, Vlaar AP, Müller MCA, et al. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020 Aug;18(8):1995–2002.

53. Pei G, Zhang Z, Peng J, Liu L, Zhang C, Yu C, et al. Renal Involvement and Early Prognosis in Patients with COVID-19 Pneumonia. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2020 Jun;31(6):1157–65.
54. Hirsch JS, Ng JH, Ross DW, Sharma P, Shah HH, Barnett RL, et al. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int*. 2020 Jul;98(1):209–18.
55. Zhang C, Shi L, Wang FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020 May;5(5):428–30.
56. Newcombe VFJ, Dangayach NS, Sonnevile R. Neurological complications of COVID-19. *Intensive Care Med*. 2021 Sep 1;47(9):1021–3.
57. Brauer T, Paika S, Kotwani R, Khanna D. Neurological Complications of COVID-19 Infection: A Comprehensive Review. *Cureus* [Internet]. 2024 Jul 23; Available from: <https://www.cureus.com/articles/247264-neurological-complications-of-covid-19-infection-a-comprehensive-review>
58. Blanco-Ruiz M, Martín-Aguilar L, Caballero-Ávila M, Lleixà C, Pascual-Goñi E, Collet-Vidiella R, et al. A nationwide Guillain–Barré syndrome epidemiological study in Spain during the <scp>COVID</scp> -19 years. *Eur J Neurol*. 2024 Aug 12;
59. Durstenfeld MS, Weiman S, Holtzman M, Blish C, Pretorius R, Deeks SG. Long COVID and post-acute sequelae of SARS-CoV-2 pathogenesis and treatment: A Keystone Symposia report. *Ann N Y Acad Sci*. 2024 May 1;1535(1):31–41.
60. Bornstein SR, Rubino F, Khunti K, Mingrone G, Hopkins D, Birkenfeld AL, et al. Practical recommendations for the management of diabetes in patients with COVID-19. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020 Jun;8(6):546–50.
61. Apicella M, Campopiano MC, Mantuano M, Mazoni L, Coppelli A, Del Prato S. COVID-19 in people with diabetes: understanding the reasons

- for worse outcomes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020 Sep;8(9):782–92.
62. Asfuroglu Kalkan E, Ates I. A case of subacute thyroiditis associated with Covid-19 infection. *J Endocrinol Invest.* 2020 Aug 5;43(8):1173–4.
 63. Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Huang Q, Tang YQ, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Mar 27;5(1):33.
 64. Grasselli G, Tonetti T, Protti A, Langer T, Girardis M, Bellani G, et al. Pathophysiology of COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome: a multicentre prospective observational study. *Lancet Respir Med.* 2020 Dec;8(12):1201–8.
 65. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers DAMPJ, Kant KM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res.* 2020 Jul;191:145–7.
 66. Enikeev D, Taratkin M, Efetov S, Shlomina A, Boldyreva M, Galkina I, et al. Acute kidney injury in COVID-19: are kidneys the target or just collateral damage? A comprehensive assessment of viral RNA and AKI rate in patients with COVID-19. *Curr Opin Urol.* 2021 Jul;31(4):363–8.
 67. Piralla A, Mojoli F, Pellegrinelli L, Ceriotti F, Valzano A, Grasselli G, et al. Impact of SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants in patients requiring intensive care unit (ICU) admission for COVID-19, Northern Italy, December 2021 to January 2022. *Respir Med Res.* 2023 Jun;83:100990.
 68. Bonsignore M, Hohenstein S, Kodde C, Leiner J, Schwegmann K, Bollmann A, et al. The disease course of hospitalized COVID-19 patients during the delta and omicron periods in consideration of vaccination status. *Dtsch Arztebl Int.* 2022 Sep 5;
 69. Aldawish S, Abusaris R, Almohammadi E, Althobiti F, Albarrag A. Effectiveness of COVID-19 vaccines against ICU admission during

- Omicron surge in Saudi Arabia: a nationwide retrospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2023 Dec 1;23(1).
70. Lottes M, Grodd M, Grabenhenrich L, Wolkewitz M. Assessing the impact of Delta and Omicron in German intensive care units: a retrospective, nationwide multistate analysis. *BMC Health Serv Res.* 2024 Dec 1;24(1).
 71. Lottes M, Grodd M, Grabenhenrich L, Wolkewitz M. Assessing the impact of Delta and Omicron in German intensive care units: a retrospective, nationwide multistate analysis. *BMC Health Serv Res.* 2024 Sep 23;24(1):1107.
 72. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine.* 2021 Feb 25;384(8):693–704.
 73. Barbaro RP, MacLaren G, Boonstra PS, Combes A, Agerstrand C, Annich G, et al. Extracorporeal membrane oxygenation for COVID-19: evolving outcomes from the international Extracorporeal Life Support Organization Registry. *The Lancet.* 2021 Oct;398(10307):1230–8.
 74. Santos MMS, Pereira IJ, Cuboia N, Reis-Pardal J, Adrião D, Cardoso T, et al. Predictors of early and long-term mortality after ICU discharge in critically ill COVID-19 patients: A prospective cohort study. *PLoS One.* 2023 Nov 2;18(11):e0293883.
 75. Rosas IO, Bräu N, Waters M, Go RC, Hunter BD, Bhagani S, et al. Tocilizumab in Hospitalized Patients with Severe Covid-19 Pneumonia. *New England Journal of Medicine.* 2021 Apr 22;384(16):1503–16.
 76. Sherren PB, Camporota L, Sanderson B, Jones A, Shankar-Hari M, Meadows CI, et al. Outcomes of critically ill COVID-19 patients managed in a high-volume severe respiratory failure and ECMO centre in the United Kingdom. *J Intensive Care Soc.* 2022 May 14;23(2):233–6.
 77. Metabolomics beyond biomarkers and towards mechanisms.
 78. Tristán AI, Jiménez-Luna C, Abreu AC, Arrabal-Campos FM, Salmerón A del M, Rodríguez FI, et al. Metabolomic profiling of COVID-19 using serum and urine samples in intensive care and

- medical ward cohorts. *Sci Rep* [Internet]. 2024 Oct 10;14(1):23713. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-74641-9>
79. Oh SW, Imran M, Kim EH, Park SY, Lee SG, Park HM, et al. Approach strategies and application of metabolomics to biotechnology in plants. *Front Plant Sci*. 2023 Aug 11;14.
 80. Valdés A, Moreno LO, Rello SR, Orduña A, Bernardo D, Cifuentes A. Metabolomics study of COVID-19 patients in four different clinical stages. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1).
 81. Armitage EG, Barbas C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives. *J Pharm Biomed Anal*. 2014 Jan;87:1–11.
 82. Tebani A, Abily-Donval L, Afonso C, Marret S, Bekri S. Clinical Metabolomics: The New Metabolic Window for Inborn Errors of Metabolism Investigations in the Post-Genomic Era. *Int J Mol Sci*. 2016 Jul 20;17(7):1167.
 83. Freire F, Seco JM, Quiñoá E, Riguera R. The prediction of the absolute stereochemistry of primary and secondary 1,2-diols by ¹H NMR spectroscopy: principles and applications. *Chemistry*. 2005 Sep 19;11(19):5509–22.
 84. Tognarelli JM, Dawood M, Shariff MIF, Grover VPB, Crossey MME, Cox IJ, et al. Magnetic Resonance Spectroscopy: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. *J Clin Exp Hepatol*. 2015 Dec;5(4):320–8.
 85. Keeler JH. Understanding NMR Spectroscopy [Internet]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/267218200>
 86. Emwas AHM. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods Mol Biol*. 2015;1277:161–93.
 87. Dona AC, Jiménez B, Schäfer H, Humpfer E, Spraul M, Lewis MR, et al. Precision high-throughput proton NMR spectroscopy of human urine, serum, and plasma for large-scale metabolic phenotyping. *Anal Chem*. 2014 Oct 7;86(19):9887–94.

88. Emwas AH, Roy R, McKay RT, Tenori L, Saccenti E, Gowda GAN, et al. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*. 2019 Jun 27;9(7):123.
89. Nürnberg E, Vitacolonna M, Klicks J, von Molitor E, Cesetti T, Keller F, et al. Routine Optical Clearing of 3D-Cell Cultures: Simplicity Forward. *Front Mol Biosci*. 2020 Feb 21;7.
90. Wu D, Shu T, Yang X, Song JX, Zhang M, Yao C, et al. Plasma metabolomic and lipidomic alterations associated with COVID-19. *Nat Sci Rev*. 2020;7(7):1157–68.
91. Hurtado JI, López-Radcenco A, Izquierdo-García JL, Rodríguez F, Moyna G, Greif G, et al. A comparative NMR-based metabolomics study of lung parenchyma of severe COVID-19 patients. *Front Mol Biosci*. 2023;10.
92. Kimhofer T, Lodge S, Whiley L, Gray N, Loo RL, Lawler NG, et al. Integrative Modeling of Quantitative Plasma Lipoprotein, Metabolic, and Amino Acid Data Reveals a Multiorgan Pathological Signature of SARS-CoV-2 Infection. *J Proteome Res*. 2020 Nov 6;19(11):4442–54.
93. Mulchandani R, Lyngdoh T, Kakkar AK. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest*. 2021 Jan 2;51(1).
94. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc*. 2007;2(11):2692–703.
95. Loo RL, Lodge S, Kimhofer T, Bong SH, Begum S, Whiley L, et al. Quantitative In-Vitro Diagnostic NMR Spectroscopy for Lipoprotein and Metabolite Measurements in Plasma and Serum: Recommendations for Analytical Artifact Minimization with Special Reference to COVID-19/SARS-CoV-2 Samples. *J Proteome Res*. 2020 Nov 6;19(11):4428–41.

96. Crook AA, Powers R. Quantitative NMR-Based Biomedical Metabolomics: Current Status and Applications. Vol. 25, *Molecules*. MDPI; 2020.
97. Cloarec O, Dumas ME, Craig A, Barton RH, Trygg J, Hudson J, et al. Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ¹H NMR data sets. *Anal Chem*. 2005 Mar 1;77(5):1282–9.
98. Akoka S, Barantin L, Trierweiler M. Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Anal Chem*. 1999 Jul 1;71(13):2554–7.
99. Wider G, Dreier L. Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*. 2006 Mar 1;128(8):2571–6.
100. Smilde AK, Jansen JJ, Hoefsloot HCJ, Lamers RJAN, van der Greef J, Timmerman ME. ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): A new tool for analyzing designed metabolomics data. *Bioinformatics*. 2005 Jul 1;21(13):3043–8.
101. Siegel AF. Multiple Regression. In: *Practical Business Statistics*. Elsevier; 2012. p. 347–416.
102. Dai D, Gao Y, Chen J, Huang Y, Zhang Z, Xu F. Time-resolved metabolomics analysis of individual differences during the early stage of lipopolysaccharide-treated rats. *Sci Rep*. 2016 Oct 3;6.
103. Madssen TS, Giskeødegård GF, Smilde AK, Westerhuis JA. Repeated measures ASCA+ for analysis of longitudinal intervention studies with multivariate outcome data. *PLoS Comput Biol*. 2021 Nov 1;17(11).
104. Taleb S, Yassine HM, Benslimane FM, Smatti MK, Schuchardt S, Albagha O, et al. Predictive Biomarkers of Intensive Care Unit and Mechanical Ventilation Duration in Critically-Ill Coronavirus Disease 2019 Patients. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Aug 12;8.
105. Lonati C, Berezhnoy G, Lawler N, Masuda R, Kulkarni A, Sala S, et al. Urinary phenotyping of SARS-CoV-2 infection connects clinical diagnostics with metabolomics and uncovers impaired NAD⁺ pathway and SIRT1 activation. *Clin Chem Lab Med*. 2023;

106. Hurtado JI, López-Radcenco A, Izquierdo-García JL, Rodríguez F, Moyna G, Greif G, et al. A comparative NMR-based metabolomics study of lung parenchyma of severe COVID-19 patients. *Front Mol Biosci.* 2023;10.
107. Manrique S, Claverias L, Magret M, Masclans JR, Bodi M, Trefler S, et al. Timing of intubation and ICU mortality in COVID-19 patients: a retrospective analysis of 4198 critically ill patients during the first and second waves. *BMC Anesthesiol.* 2023 Dec 1;23(1).
108. Daria S, Katarzyna SA, Jerzy F, Ivan K. Muscle pain and muscle weakness in COVID19 patients: Cross-talk with statins – Preliminary results. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2022 Apr;148:112757.
109. Correia BSB, Ferreira VG, Piagge PMFD, Almeida MB, Assunção NA, Raimundo JRS, et al. ¹H qNMR-Based Metabolomics Discrimination of Covid-19 Severity. *J Proteome Res.* 2022 Jul 1;21(7):1640–53.
110. Pajuelo D, Dezortova M, Hajek M, Ibrahimova M, Ibrahim I. Metabolic changes assessed by ¹H MR spectroscopy in the corpus callosum of post-COVID patients. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine.* 2024;
111. Vollbracht C, Kraft K. Oxidative Stress and Hyper-Inflammation as Major Drivers of Severe COVID-19 and Long COVID: Implications for the Benefit of High-Dose Intravenous Vitamin C. Vol. 13, *Frontiers in Pharmacology.* Frontiers Media S.A.; 2022.
112. Abdallah AM, Doudin A, Sulaiman TO, Jamil O, Arif R, Sada F Al, et al. Metabolic predictors of COVID-19 mortality and severity: a survival analysis. *Front Immunol.* 2024;15.
113. Rees CA, Rostad CA, Mantus G, Anderson EJ, Chahrودي A, Jaggi P, et al. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2021 Jun 22;118(25).
114. Bruzzone C, Bizkarguenaga M, Gil-Redondo R, Diercks T, Arana E, García de Vicuña A, et al. SARS-CoV-2 Infection Dysregulates the

- Metabolomic and Lipidomic Profiles of Serum. *iScience*. 2020 Oct 23;23(10).
115. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. 2009 May 20;37(1):1–17.
 116. Masoodi M, Peschka M, Schmiedel S, Haddad M, Frye M, Maas C, et al. Disturbed lipid and amino acid metabolisms in COVID-19 patients. *J Mol Med*. 2022 Apr 22;100(4):555–68.
 117. Gietl M, Burkert F, Hofer S, Gostner JM, Sonnweber T, Tancevski I, et al. Laboratory parameters related to disease severity and physical performance after reconvalescence of acute COVID-19 infection. *Sci Rep*. 2024 Dec 1;14(1).
 118. Wang Y, Wang X, Luu LDW, Chen S, Jin F, Wang S, et al. Proteomic and Metabolomic Signatures Associated With the Immune Response in Healthy Individuals Immunized With an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine. *Front Immunol*. 2022 May 24;13.
 119. Lee CH, Banoei MM, Ansari M, Cheng MP, Lamontagne F, Griesdale D, et al. Using a targeted metabolomics approach to explore differences in ARDS associated with COVID-19 compared to ARDS caused by H1N1 influenza and bacterial pneumonia. *Crit Care*. 2024 Dec 1;28(1).
 120. Ansone L, Briviba M, Silamikelis I, Terentjeva A, Perkons I, Birzniece L, et al. Amino Acid Metabolism is Significantly Altered at the Time of Admission in Hospital for Severe COVID-19 Patients: Findings from Longitudinal Targeted Metabolomics Analysis [Internet]. 2021. Available from: <https://journals.asm.org/journal/spectrum>
 121. Geisler S, Gostner JM, Becker K, Ueberall F, Fuchs D. Immune activation and inflammation increase the plasma phenylalanine-to-tyrosine ratio. *Pteridines*. 2013 Jun 1;24(1):27–31.
 122. Piater T, Gietl M, Hofer S, Gostner JM, Sahanic S, Tancevski I, et al. Persistent Symptoms and IFN- γ -Mediated Pathways after COVID-19. *J Pers Med*. 2023 Jul 1;13(7).

123. Meoni G, Ghini V, Maggi L, Vignoli A, Mazzoni A, Salvati L, et al. Metabolomic/lipidomic profiling of COVID-19 and individual response to tocilizumab. *PLoS Pathog.* 2021 Feb 1;17(2).
124. Marhuenda-Egea FC, Narro-Serrano J, Shalabi-Benavent MJ, Álamo-Marzo JM, Amador-Prous C, Algado-Rabasa JT, et al. A metabolic readout of the urine metabolome of COVID-19 patients. *Metabolomics.* 2023 Feb 1;19(2).
125. Roux CG, Mason S, du Toit LDV, Nel JG, Rossouw TM, Steel HC. Comparative Effects of Efavirenz and Dolutegravir on Metabolomic and Inflammatory Profiles, and Platelet Activation of People Living with HIV: A Pilot Study. *Viruses.* 2024 Sep 1;16(9).
126. Pang Z, Zhou G, Chong J, Xia J. Comprehensive meta-analysis of covid-19 global metabolomics datasets. *Metabolites.* 2021 Jan 1;11(1):1–14.
127. Ripps H, Shen W. Review: taurine: a “very essential” amino acid. *Mol Vis.* 2012;18:2673–86.
128. Chen T, Dai Z, Mo P, Li X, Ma Z, Song S, et al. Clinical Characteristics and Outcomes of Older Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Wuhan, China: A Single-Centered, Retrospective Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2020 Sep 16;75(9):1788–95.
129. Marcinkiewicz J, Kontny E. Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids.* 2014 Jan;46(1):7–20.
130. Wang K, Khoramjoo M, Srinivasan K, Gordon PMK, Mandal R, Jackson D, et al. Sequential multi-omics analysis identifies clinical phenotypes and predictive biomarkers for long COVID. *Cell Rep Med.* 2023 Nov 21;4(11).
131. Holmes E, Wist J, Masuda R, Lodge S, Nitschke P, Kimhofer T, et al. Incomplete Systemic Recovery and Metabolic Phenoreversion in Post-Acute-Phase Nonhospitalized COVID-19 Patients: Implications for Assessment of Post-Acute COVID-19 Syndrome. *J Proteome Res.* 2021 Jun 4;20(6):3315–29.

132. de Fátima Cobre A, Alves AC, Gotine ARM, Domingues KZA, Lazo REL, Ferreira LM, et al. Novel COVID-19 biomarkers identified through multi-omics data analysis: N-acetyl-4-O-acetylneuraminic acid, N-acetyl-L-alanine, N-acetyltryptophan, palmitoylcarnitine, and glycerol 1-myristate. *Intern Emerg Med*. 2024 Aug 1;19(5):1439–58.
133. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem*. 2012;2012:1–40.
134. Liesivuori J, Savolainen AH. Methanol and Formic Acid Toxicity: Biochemical Mechanisms. *Pharmacol Toxicol*. 1991 Sep 25;69(3):157–63.
135. Safari H, Ajudani R, Savaie M, Babadi AJ, Alizadeh P. Intracerebral hemorrhage in methanol toxicity patients during COVID-19 pandemic: case report and review of literature. *Forensic Toxicol*. 2024 Jul 9;42(2):242–7.
136. Wang Y, Wang Y, Zhu J, Guan Y, Xie F, Cai X, et al. Systematic evaluation of urinary formic acid as a new potential biomarker for Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2022 Nov 30;14.
137. Propionyl-CoA carboxylase deficiency : case report, effect of low-protein diet and identification of 3-oxo-2-methylvaleric acid 3-hydroxy-2-methylvaleric acid, and maleic acid in urine.
138. Elgedawy GA, Samir M, Elabd NS, Elsaid HH, Enar M, Salem RH, et al. Metabolic profiling during COVID-19 infection in humans: Identification of potential biomarkers for occurrence, severity and outcomes using machine learning. *PLoS One*. 2024 May 30;19(5):e0302977.
139. Maciel-Fiuza MF, Muller GC, Campos DMS, do Socorro Silva Costa P, Peruzzo J, Bonamigo RR, et al. Role of gut microbiota in infectious and inflammatory diseases. *Front Microbiol*. 2023 Mar 27;14.
140. Liu FT, Stowell SR. The role of galectins in immunity and infection. Vol. 23, *Nature Reviews Immunology*. Nature Research; 2023. p. 479–94.

141. Torres-Ruiz J, Pérez-Fragoso A, Maravillas-Montero JL, Llorente L, Mejía-Domínguez NR, Páez-Franco JC, et al. Redefining COVID-19 Severity and Prognosis: The Role of Clinical and Immunobiotypes. *Front Immunol.* 2021 Sep 8;12.



9 EKLER

9.1 Etik Kurul Onayı



10 ÖZGEÇMİŞ



Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları

