



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLARDA ÇOKLU SİSTEMİK İNFLAMATUVAR
SENDROM (MIS-C) TANI VE TAKİBİNDE ELASTİN
TÜREVİ PEPTİDLERİN KULLANIMI VE TAYİNİ İÇİN
YENİ BİR YARIŞMALI İNDİREKT ELISA
PROTOKOLÜ GELİŞTİRİLMESİ**

Dr. Osman Oğuz DEMİR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2024



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLARDA ÇOKLU SİSTEMİK İNFLAMATUVAR
SENDROM (MIS-C) TANI VE TAKİBİNDE ELASTİN
TÜREVİ PEPTİDLERİN KULLANIMI VE TAYİNİ İÇİN
YENİ BİR YARIŞMALI İNDİREKT ELISA
PROTOKOLÜ GELİŞTİRİLMESİ**

Dr. Osman Oğuz DEMİR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. YASEMİN ÖZSÜREKÇİ**

ANKARA

2024

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki tüm bilgi ve belgeleri; görsel ve yazılı tüm sonuçları bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, faydalandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı ve onlara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç.Dr. Yasemin zsrekci danışmanlığında tarafımca üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Dr. Osman Oğuz DEMİR

TEŞEKKÜR

Türk diline, ‘şükr’ fiilinden türetilerek kazandırılan ‘teşekkür’den teşekkür bir yazıyla giriş yapmak isterim. Kendimi yükseklerde hissettiğim zaman içinde, kendimi düşmüş kabul ettiğim zaman içinde, aynı sükûnet ve aynı sarsılmazlık içinde, bendeki temel bilgiye atıfta bulunarak, bilgece, bana nasihatle ‘bu da geçer’ diyebilen, zor zamanlarımda bana ilham veren, önümü görmemi sağlayan, cesaretlendiren, her şeye rağmen destek veren, kendime örnek aldığım tez danışmanım Dr. Yasemin Özsürekci’ye; ayrıca bu minvalde beni destekleyen ve önümü açan, benim yetişmemde ve tezimin oluşmasında ilk elden katkılarını her zaman minnetle hatırlayacağım, akademik aklı öğrendiğim Dr. Seza Özen’e; yaşadığım olaylara bakışımın farklı bir penceresini kendimin keşfetmesini sağlayarak ufkumu açan, cesaretlendiren ve her daim yanımda olan Dr. Elif Özmert’e; kendisinden çocuk doktorluğundaki disiplini öğrendiğim, duruşuyla örnek olan Dr. Ayşegül Tokatlı’ya; özeleştirinin inceliklerini öğrendiğim, her daim ufkumu açan Dr. Göknur Haliloğlu’na ve azminden çok etkilendiğim, her koşulda desteğini gösteren Dr. Uğur Özçelik’e çok teşekkür ederim.

İngiliz dilinde ‘*bench to bedside*’ diye tabir edilen kapsamdaki tıpta uzmanlık tezime konu olan bu çalışmamda, hastaların kabulünden tanı konulmasına, tedavinin gerçekleştirilmesinden örneklerin toplanmasına, ELISA’nın geliştirilmesi ve örneklerin çalışılmasından verilerin analizine kadar her bir aşamasında emeğimin olmasından dolayı gururluyum ve her ne kadar meşakkatini tarif etmek mümkün olmasa da tüm bu emeğimi tez olarak yazabilme imkânı için şükrediyorum.

Genelde; beraber çalışma fırsatı bulduğum Hacettepe Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalının tüm öğretim üyelerine, yandal araştırma görevlilerine, araştırma görevlilerine ve H.Ü. İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesinde çalışan tüm sağlık personeline teşekkür ederim. Özelde ise isimlerini anarken her birinin hayatımdaki yerini idrak etmeye çalışarak; Dr. Ali Bülent Cengiz, Dr. Yelda Bilginer, Dr. Tezer Kutluk, Dr. Alev Özön, Dr. Nazlı Gönç, Dr. Hüseyin Demirbilek, Dr. Doğuş Vurallı Karaoğlu, Dr. Selman Kesici ve Pediatri Başasistanlığına teşekkürü bir borç bilirim.

Toronto’da laboratuvarda zaman kavramını yitirdiğim günlerdeki yardımlarıyla başta Hocam Dr. Rae Yeung olmak üzere Dr. Trang Duong ve Dr. Mohammad Massumi’ye; dostluklarının yanı sıra bilgelikleriyle hep yanımda olan Dr. Mehmet Oğuz Yenidünya, Dr. Göksel Güven, Dr. Kübra Aykaç, Dr. Kübra Cebeci, Dr. M. Nevzat Çizmeci ve Dr. Elif Çizmeci’ye, ayrıca maddi desteğiyle de TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığına minnettarım.

Fakat en başta, benim ‘ben’ olmamın mimarı, beni bu günlere getiren, her koşulda destekleyen anneme, babama ve kardeşlerime karşılığı olmasa da bu çalışmam vesilesiyle bir kez daha teşekkür ederim.

Darda kalana yardımcı olması temennisiyle...

Dr. Osman Oğuz DEMİR

ÖZET

DEMİR, O.O., Çocuklarda Çoklu Sistemik İnflamatuvar Sendrom (MIS-C) Tanı ve Takibinde Elastin Türevi Peptidlerin Kullanımı ve Tayini İçin Yeni Bir Yarışmalı İndirekt ELISA Protokolü Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Tezi, 2024 Ankara. Çocuklarda çoklu sistemik inflamatuvar sendrom (MIS-C), SARS-CoV-2 enfeksiyonundan sonra yüksek ateş ve cilt bulgularının yanı sıra birden fazla organ tutulumuyla karakterize hiperinflamatuvar bir sendromdur. MIS-C tanısı kliniğe dayanmakta olup literatürde henüz hastalığa özgü tanımlanmış bir biyobelirteç yoktur. Kardiyovasküler dokunun en önemli bileşenlerinden birinin elastin olması nedeniyle kardiyovasküler tutulumla öne çıkan MIS-C'de elastin türevi peptidlerin (EDP) olası bir biyobelirteç adayı olma ihtimalleri vardır. Buradan hareketle MIS-C tanı ve prognozunda biyobelirteç olarak kullanmak üzere; pratik, hızlı ve yüksek duyarlılıkta sonuç verebilen yeni bir ELISA protokolü oluşturmayı hedefledik. Öncelikle serumda EDP molekülünün düzeyini ölçmek ve MIS-C tanı ve tedavisindeki yerini belirlemek için yeni bir yarışmalı indirekt ELISA protokolünün optimizasyonu ve validasyonu yapıldı. MIS-C tanısıyla takipli 90 MIS-C'li çocuğun hasta grubu; 9 SARS-CoV-2'ye bağlı ağır pnömoni ve 56 sağlıklı çocuğun da kontrol grubunu oluşturduğu kohortta, katılımcıların klinik özellikleri, laboratuvar değerleri ile geliştirilen yeni yarışmalı ELISA protokolü ile ölçülen EDP'nin klinik ilişkisi ve MIS-C'de kullanılabilirliği araştırıldı. Hasta grubundaki 90 MIS-C'li olgunun 36'sı (%40) şok, 32'si (%36) Kawasaki hastalığı benzeri ve 21'i de (%23) ateş ve inflamasyon fenotipi ile olarak değerlendirildi. Hastaların 71'inde (%79) elektrokardiyografi veya ekokardiyografi bulguları veya laboratuvar bulguları ışığında kardiyak tutulum olduğu görüldü. Ferritin, CRP ve prokalsitonin düzeyleri şok fenotipindeki hastalarda anlamlı düzeyde diğer fenotiplere kıyasla yüksekti. Optimizasyonu tamamlanan ve tekrarlanabilirliği ölçülen yeni yarışmalı ELISA protokolünde intra-assay CV %1,96 ve inter-assay CV %7,64 oranındaki kesinlikle EDP tespiti ve ölçümü yapacak yeterlilikteydi. MIS-C'li hastaların tedavi öncesinde alınan serum örneklerinde yeni ELISA protokolü ile ölçülen EDP'ler tedavi sonrasında, SARS-CoV-2 pnömonili çocuklara ve sağlıklı çocuklara göre anlamlı düzeyde düşüktü. Receiver operating characteristic (ROC) analizi ile eğri altında kalan alan (AUC) %87 olarak tespit edildi. Bu çalışma ile yeni, özgün ve yüksek duyarlılıkta çalışan yarışmalı bir ELISA protokolü tanımlanmış olup geliştirilen bu ELISA protokolü ile EDP'nin MIS-C'nin tanı ve prognozunda yeri olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelime: MIS-C, ELISA, elastin, EDP, çocuk

ABSTRACT

DEMİR, O.O., Development of a Novel Competitive Indirect ELISA for Detecting Elastin Derived Peptides in Diagnosing and Monitoring Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C), Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Ankara, 2024. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) is a hyperinflammatory syndrome involving multiple organs, particularly striking cardiac involvement following SARS-CoV-2 infection. Diagnosis of MIS-C relies on clinical assessment, as there is no disease-specific biomarker defined in the literature. Given that elastin is a crucial component of cardiovascular tissue, elastin-derived peptides (EDP) hold promises as a potential biomarker for the diagnosis and prognosis of MIS-C, which is marked by cardiovascular involvement. Therefore, our first objective was to develop a novel ELISA protocol that is practical, rapid, and highly sensitive for the detection of EDP. A novel competitive ELISA protocol was optimized and validated to measure the level of EDP. Secondly, we investigated the role of EDP as a biomarker not only for the diagnosis but also for the prognosis of the cases with MIS-C. A total of 90 children diagnosed with MIS-C included in the patient group, while 65 children included in the control group that is divided two subgroups such as 9 children with severe pneumonia due to SARS-CoV-2 and 56 healthy children. The clinical relevance and usage of EDP as a biomarker candidate, measured by the new competitive ELISA protocol, were investigated in conjunction with the clinical characteristics and laboratory values of the participants. Of the 90 patients with MIS-C, 36 (40%) were characterized by shock, 32 (36%) by a Kawasaki disease-like phenotype and 21 (23%) by a fever & inflammation phenotype. Cardiac involvement was observed in 71 (79%) patients as evidenced by electrocardiographic or echocardiographic or lab findings. Ferritin, CRP, and procalcitonin levels were significantly higher in patients with the shock phenotype compared to those with others. The newly developed competitive ELISA protocol, optimized and evaluated for reproducibility, demonstrated sufficient precision in detecting and quantifying EDP, with an intra-assay coefficient of variation (CV) of 1.96% and an inter-assay CV of 7.64%. EDP levels measured using this novel ELISA protocol in pre-treatment serum samples of patients with MIS-C were significantly lower compared to post-treatment samples, as well as compared to children with SARS-CoV-2 pneumonia and healthy controls. Receiver operating characteristic (ROC) analysis revealed an area under the curve (AUC) of 87%. This study introduces a new and highly sensitive competitive ELISA protocol, paving the way for the utilization of EDP as a novel biomarker in the diagnosis and prognosis of MIS-C.

Keywords: MIS-C, ELISA, elastin, EDP, pediatric

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	x
TABLO DİZİNİ.....	xii
ŞEKİL DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Virüsün İmmünopatolojisi.....	2
2.2. Kawasaki hastalığı (KH).....	6
2.3. Çocuklarda Çoklu Sistemik İnflamatuvar Sendrom (MIS-C).....	8
2.3.1. MIS-C Patofizyolojisi.....	8
2.3.2. MIS-C Kliniği.....	10
2.3.2.1. Kardiyak Tutulum.....	10
2.3.2.2. Gastrointestinal Sistem Tutulumu.....	10
2.3.2.3. Böbrek Tutulumu.....	11
2.3.2.4. Akciğer Tutulumu.....	11
2.3.2.5. Santral Sinir Sistemi (SSS)Tutulumu.....	11
2.3.2.6. Hematopoetik Sistem Tutulumu.....	12
2.3.2.7. Cilt Tutulumu.....	12
2.3.3. Laboratuvar Bulguları.....	12
2.3.4. Görüntüleme.....	13
2.3.5. Ayırıcı Tanı.....	13
2.3.6. Tanı.....	14
2.3.7. Tedavi.....	17
2.4. Elastin Türevi Peptitler (EDP).....	19
2.4.1. EDP'lerin Kardiyovasküler Hastalıklardaki Yeri.....	22
2.5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve Optimizasyonu.....	23

2.5.1. Katı Faz.....	25
2.5.2. Antikor Çiftleri.....	26
2.5.3. Yarışmalı ELISA	27
2.5.3.1. Validasyon (Doğrulama)	28
2.5.4. Elastin Düzeyini Ölçen Ticari ELISA Kitleri.....	30
2.5.5. Araştırmanın Gerçekleştirildiği Laboratuvarın Önceki Çalışmaları	31
2.6. Çalışmanın Gerekçesi (Rationale).....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	34
3.1. Çalışmanın Genel Özellikleri	34
3.2. Çalışmada Dahil Edilen Hasta ve Kontrol Grubu	34
3.2.1. Klinik Fenotipler	36
3.3. Numunelerin Hazırlanması ve Saklanması.....	37
3.3.1. Hasta grubu serumları	37
3.3.2. Kontrol Grubu Serumları	38
3.4. Yarışmalı ELISA Protokolünde Kullanılan Kimyasallar	38
3.4.1. Yarışmalı ELISA Protokolünde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	39
3.5. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1. Yarışmalı ELISA Protokolünün Optimizasyonu.....	41
4.1.1. Kaplama Çözeltisi Optimizasyonu	42
4.1.1.1. Kaplama Çözeltisinin İçerdiği HAE Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	42
4.1.1.2. HAE İçeren Çözeltinin İnkübasyonunun Optimizasyonu.....	43
4.1.1.3. Kaplama Çözeltisinin Hacminin Optimizasyonu	44
4.1.2. Bloklamının Optimizasyonu	45
4.1.2.1. Bloklama Çözeltisi ve İnkübasyonu.....	45
4.1.3. Standart Bileşenlerinin Optimizasyonu	45
4.1.3.1. Dilüsyon Faktörünün Optimizasyonu.....	45

4.1.3.2.	Standardı Temsil Eden Konsantrasyonlardan En Üst ve En Alt Konsantrasyonların Belirlenmesi.....	47
4.1.3.3.	Standart Eğrisini Oluşturan Nokta Sayısının Belirlenmesi.....	47
4.1.4.	Plazma ve Serumun Deney İçi Dilüsyon Oranının Optimizasyonu	48
4.1.5.	Deney Tamponunun Optimizasyonu	51
4.1.6.	Birincil Antikor/Yakalama Antikoru/ <i>Capture Antibody</i> (Pab).....	53
4.1.6.1.	Birincil Antikoru Konsantrasyonunun Optimizasyonu	54
4.1.6.2.	Birincil Antikoru Tüp İnkübasyonunun Optimizasyonu.....	54
4.1.6.3.	Birincil Antikoru Plaka İnkübasyonunun Optimizasyonu.....	56
4.1.6.4.	Tüp İnkübasyonuna Giren Pab Solüsyonunun Hacminin Optimizasyonu.....	58
4.1.7.	İkincil Antikor/Saptama Antikoru/ <i>Detection Antibody</i> (sAb)'nin Optimizasyonu.....	59
4.1.7.1.	İkincil Antikoru Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	59
4.1.7.2.	İkincil Antikoru Tüp İnkübasyonunun Optimizasyonu.....	60
4.1.8.	Konjugat Reaksiyonunun Optimizasyonu	61
4.1.8.1.	Substrat Seçimi.....	61
4.1.8.2.	Substrat Hacminin Optimizasyonu.....	61
4.1.8.3.	Reaksiyonun Durdurulma Zamanının Optimizasyonu.....	62
4.1.9.	Kolorimetrik Ölçüm.....	63
4.1.10.	Deneyin Validasyonu.....	64
4.1.11.	Deney Protokolünün Özeti.....	65
4.2.	Klinik Özellikler	66
4.2.1.	MIS-C'li hastaların klinik özellikleri.....	67
4.2.2.	MIS-C'nin Laboratuvar Özellikleri	69
4.2.3.	MIS-C'de Kalp Tutulumu.....	72
4.2.4.	EDP'nin MIS-C'de Yeri	73

5. TARTIŞMA	87
5.1. MIS-C	87
5.2. EDP.....	90
6. SONUÇLAR	94
7. KAYNAKÇA.....	97

KISALTMALAR

ABH	: akut böbrek hasarı
ABTS	: 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)
ACE	: anjiyotensin dönüştürücü enzim
AHA	: Amerikan Kalp Derneği
ALT	: alanin transaminaz
APC	: antijen sunan hücreler
ARDS	: akut respiratuvar distres sendromu
ASA	: asetilsalisilik asit
AST	: aspartat transaminaz
%B/B₀	: bağlanma yüzdesi
BSA	: sığır serum albümini
BT	: bilgisayarlı tomografi
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
CRP	: C-reaktif protein
dER	: düz endoplazmik retikulum
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EBP	: elastin bağlayan protein
ECMO	: ekstrakorporeal membran oksijenasyonu
EDP	: elastin türevi peptid
EF	: ejeksiyon fraksiyonu
EKO	: ekokardiyografi
ESM	: ekstraselüler matriks
GN	: gerçek negatif
GP	: gerçek pozitif
GWAS	: genom boyu ilişkilendirme çalışması
HAE	: human aortik elastin
IFN	: interferon
Ig	: immünglobulin
IL	: interlökin
IP-10	: interferon gama kaynaklı protein 10

IVIG	: intravenöz immünglobülin
KAA	: koroner arter anormallikleri
KH	: Kawasaki hastalığı
KHŞS	: Kawasaki hastalığı şok sendromu
LDH	: laktat dehidrogenaz
LV	: sol ventrikül
MDA -5	: melanom farklılaşması ile ilişkili protein 5
MHC	: majör histokompatibilite kompleksi
MIP-3β	: makrofaj inflamatuvar protein - 3 β
MIS-C	: çocuklarda çoklu sistemik inflamatuvar sendrom
MMP	: metalloproteinaz
MPV	: ortalama trombosit hacmi
MR	: manyetik rezonans
NF-κB	: nükleer faktör-kappa beta
OD	: optik dansite
PAMP	: patojenle ilişkili moleküler modeller
PBST	: fosfat tamponlu salin solüsyonu
PCPCH	: Pediatri ve Çocuk Sağlığı Kraliyet Koleji
PDW	: trombosit dağılım aralığı
PRR	: patern tanıma reseptörleri
RIG-I	: retinoik aside bağlı gen I
RV	: sağ ventrikül
TCR	: T hücre Reseptörü
TE	: tropoelastin
TLR	: toll benzeri reseptör
TMA	: trombotik mikroanjyopati
TMB	: tetrametilbenzidin
TMPRSS2	: transmembran serin proteaz 2
TNF	: tümör nekrozis faktör
TPE	: terapötik plazma değişimi
YN	: yanlış negatif
YP	: yanlış pozitif

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1.	Amerikan Kalp Birliği'nin (AHA) 2017'de önerdiği KH tanısında kullanılan kriterler.....	7
Tablo 2.2.	MIS-C ve KH'nin demografik ve klinik özellikleri [59].....	14
Tablo 2.3.	MIS-C vaka tanımlamaları.....	15
Tablo 2.4.	Amerika Birleşik Devletleri'nin Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) güncel rehberine göre MIS-C'de tavsiye edilen tedaviler [66].....	18
Tablo 2.5.	Literatürdeki elastin tespiti için tanımlanmış yarışmalı ELISA protokolleri.....	31
Tablo 3.1.	Yarışmalı ELISA protokolünde kullanılan kimyasallar ve laboratuvar ekipmanları	39
Tablo 3.2.	Yarışmalı ELISA protokolünde kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması	40
Tablo 4.1.	Yarışmanın gerçekleştiği analit ve pAb arasındaki bağlanma yüzdelerinin standart eğrisinin en üst, en alt noktasında negatif kontrol baz alınarak belirlenmesi.....	43
Tablo 4.2.	HAE içeren kaplama çözeltisinin katı fazda inkübasyon koşullarının belirlenmesi.....	44
Tablo 4.3.	Farklı kaplama solüsyonu konsantrasyonları ile standart ve plazmaların antikor derişimleri korunarak oluşturulan farklı hacimdeki tüp inkübasyon solüsyonlarının <i>intrassay CV</i> ile değerlendirilmesi	50
Tablo 4.4.	Bir plakada %2,5, %5 ve %7,5 BSA ile hazırlanan tamponlarla yapılan deneylerdeki dilüsyonel linearitede elde edilen geri kazanım yüzdeleri ve karşılaştırılması.....	52
Tablo 4.5.	Eş zamanlı iki farklı plakada pAb inkübasyonunun durağan ve çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirilmesi.....	55
Tablo 4.6.	Tüp inkübasyonlarının 2 saatlik ve 1,5 saatlik sürelerdeki bağlanma yüzdelerinin karşılaştırılması ve <i>intra-assay CV</i> yüzdelerine etkisi	56

Tablo 4.7. pAb'nin 1:9000 ve 1:12000 derişimleri plakaya aktarıldıktan sonra gecelik 4°C inkübasyon ve 1 saatlik oda sıcaklığındaki inkübasyonla kıyaslanması	57
Tablo 4.8. Optimize deneyde validasyon için tekrarlanan deney sayısı ve serum için elde edilen <i>intra-assay</i> ve <i>inter-assay CV</i> değerleri	64
Tablo 4.9. EDP tespitinde optimize ve valide edilen yarışmalı indirekt ELISA protokolünde kullanılanların derişimleri ve inkübasyon şartlarının özeti	66
Tablo 4.10. MIS-C hastalarının klinik özellikleri	68
Tablo 4.11. MIS-C hastalarının laboratuvar özellikleri	70
Tablo 4.12. MIS-C tanılı hastalarda kalp tutulumu.....	72
Tablo 4.13. Farklı MIS-C fenotiplerindeki hastalarda EDP düzeylerinin farklı zamanlarda alınan serum örneklerindeki ortanca ve IQR değerleri.....	73
Tablo 4.14. Çok değişkenli lojistik regresyonla şok fenotipindeki hastaları tanı anındaki verileriyle öngörülmesi	82
Tablo 4.15. Kesim değerinin hesaplanmasında kullanılan parametreler	84

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1.	Doğal immün sistem sinyalizasyonunda SARS-CoV-2 virüsünün tanınması.....	4
Şekil 2.2.	Elastogenezis ve vücutta bioaktivitesinin özeti.....	20
Şekil 2.3.	Yarışmalı ELISA'nın basit şeması	25
Şekil 4.1.	Kullanılması amaçlanan deney protokolünün optimize edilmemiş halinin 2020 ve 2021 yılındaki iki standart eğrisi	41
Şekil 4.2.	Standart eğrisini oluşturmak üzere kullanılan HAE konsantrasyonlarının seri dilüsyonla hazırlanması.....	46
Şekil 4.3.	Uygun tampon solüsyonunun ve standart eğrisini oluşturan konsantrasyon sayısının belirlenmesi	46
Şekil 4.4.	Dört parametrelili lojistik regresyon (4PL) kullanılarak oluşturulan x eksenindeki HAE konsantrasyonuna karşılık gelen 405 nm'deki optik dansite (OD) ve bağlanma yüzdesi ($B_0/\%B$) temsil eden çift eğrili standart eğrisi	48
Şekil 4.5.	HAE ile pAb arasındaki plakadaki yarışma öncesi, standart ve serum/plazma örneklerinin eppendorf tüpte inkübe edilmesi için hazırlanan solüsyonun farklı dilüsyon oranlarında farklı volümlerin karşılaştırılması için hazırlanan bir deney hesaplama modeli	49
Şekil 4.6.	Tampon içeriğinin farklı BSA konsantrasyonlarında plazma ve serum için dilüsyonel linearite ölçütünün değerlendirilmesi.....	53
Şekil 4.7.	Gece boyu 4°C'de ve oda sıcaklığında ve 37°C'de iki saatlik tüp inkübasyonlarının ardından eş zamanlı aynı plakaya transferiyle tüp inkübasyonlarının karşılaştırılması.....	55
Şekil 4.8.	pAb'nin tüpteki inkübasyonunun ardından plakalara transfer işlemi....	58
Şekil 4.9.	Farklı pAb ve sAb dilüsyonlarında bağlanma yüzdelilerinin substrat eklenmesinden reaksiyonun durma süresine kadar zaman içerisindeki değişimi.....	60
Şekil 4.10.	Optimizasyonun erken safhalarında yapılan deneyde ABTS ve TMB'nin karşılaştırılması	61

- Şekil 4.11.** Farklı pAb dilüsyonlarında, 1:15000 dilüsyondaki sAb'nin bağlanma yüzdelерinin substrat eklenmesinden reaksiyonun durma süresine kadar geçen zaman içerisindeki değişimi..... 63
- Şekil 4.12.** Optimize edilmiş ve tekrarlanabilirliği sınanmış EDP için yarışmalı ELISA protokolünün şematik özeti (biorender.com'da hazırlanmıştır)..... 65
- Şekil 4.13.** Hastaların tanı anındaki laboratuvar değerleri ve kategorik olmayan değişkenleri arasındaki spearman korelasyon matrisi. Yalnızca istatistiksel olarak anlamlı olanların korelasyon katsayısı verilmiştir 71
- Şekil 4.14.** Tedavi öncesi dönemde EDP düzeyinin farklı klinik fenotiplerdeki ve sağlıklı çocuklardaki ortanca değerleri. Kruskal Wallis testi ile modele alınan gruplar arasındaki p değeri<0,0001'dir..... 74
- Şekil 4.15.** MIS-C'de EDP'nin doğal seyrini görmek için ateş başlangıç zamanına göre EDP düzeylerinin zaman içindeki değişimi 76
- Şekil 4.16.** MIS-C'li hastaların serum örneklerinin klinik takiplerinde alınma zamanlarına göre EDP düzeyleri ve kontrol grubunun EDP düzeyi 77
- Şekil 4.17.** MIS-C hastalarının tedavi öncesi serumlarıyla kontrol gruplarının karşılaştırılması..... 78
- Şekil 4.18.** Poliklinik takibe giren MIS-C'ler ile kontrol gruplarının karşılaştırılması..... 79
- Şekil 4.19.** KH kriterlerindeki semptomlara göre tedavi öncesi alınan serumlardaki EDP düzeyleri..... 80
- Şekil 4.20.** Organ tutulumlarına göre tedavi öncesi alınan serumlardaki EDP düzeyleri. 80
- Şekil 4.21.** ROC analizi. Sağlıklı çocuklar ve MIS-C'li hastalardaki CRP, Ferritin ve EDP için ayrı ROC analizleri birleştirilerek oluşturulmuştur 83
- Şekil 4.22.** Sağlıklı çocuklarda cinsiyete göre 0-2, 3-5, 6-10, 11-18 yaş gruplarında ortanca EDP düzeyleri 84

- Şekil 4.23.** MIS-C tanısıyla izlenen hastaların tedavi öncesi, tedavi esnası ve poliklinik takibinde alınan serum örneklerindeki EDP düzeyinin yaş ekseninde değerlendirilmesi ve sağlıklı çocuklardan farkı 85
- Şekil 4.24.** EDP'nin yaş ekseninde sağlıklı ve MIS-C'li hastaların farklı fenotiplerindeki tedavi öncesi ve sonrası düzeyleri..... 86

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Çocuklarda Çoklu Sistemik İnflamatuvar Sendrom (MIS-C), genellikle geçirilen SARS-CoV-2 enfeksiyonundan 2-6 hafta sonra ortaya çıkmaktadır ve yüksek ateş, halsizlik, cilt bulguları ve mukokutanöz değişiklikler ile bir kısmı Kawasaki hastalığına (KH) benzeyen bir klinikle kendini gösterse de sıklıkla şok ve gastrointestinal sistem bulgularının ön planda olduğu birden fazla organı tutan, hayatı tehdit eden hiperinflamatuvar bir sendromdur. Tanısı klinik ve geçirilmiş SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile epidemiyolojik bağlantı kurularak konulmaktadır. Yaygın organ tutulumuyla giden MIS-C, Kawasaki hastalığı şok sendromu, toksik şok sendromu, sepsis gibi hastalıklara benzerliği ile dikkat çekmekte ve bu nedenle ayırıcı tanısını yapmak güçleşmektedir. Hastalığa özgü biyobelirteçlerin bulunması hastalık tanısını koymak ve hastalığın seyrini öngörmeye önem arz etmektedir. MIS-C’de organ tutulumlarının en önemlisi ve prognozu belirleyen kardiyovasküler tutulumdur. Damar duvarının en önemli bileşeni olan elastisiteyi ve tonusu sağlayan elastinler ve elastin türevi peptidler (EDP), kardiyovasküler ve endotelial hasarın göstergesi olarak önemli bir biyobelirteç vazifesi görebilme kapasitesi taşımaktadır. Klinikteki bu eksiklikten hareketle, EDP’leri tayin etmek üzere, biyobelirteç araştırmalarında sıklıkla kullanılan ucuz, pratik, hızlı ve yüksek özgünlükte sonuç verebilen *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) protokolü oluşturmayı ve MIS-C’nin tanısında ve prognozunu belirlemede bu protokolün ve EDP’nin yerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Çin'in Wuhan şehrinde 2019 yılının Aralık ayında görülmeye başlanan pnömoni vakaları sonrası etkenin koronavirüs ailesinin yeni bir üyesi olduğu tespit edildi [1]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 2019 yeni koronavirüs (2019-nCoV) olarak adlandırılan virüsün neden olduğu hastalık daha sonra yeni koronavirüs hastalığı [2] olarak adlandırıldıktan kısa bir süre sonra, 30 Ocak 2020'de, DSÖ COVID-19'u uluslararası endişe verici bir halk sağlığı acil durumu olarak ilan etti. Ardından, 11 Mart 2020'de DSÖ, SARS-CoV-2 virüsüne bağlı enfeksiyonun küresel çapta salgın haline geldiğini bu nedenle de pandemi ilan edildiğini duyurdu [3].

Dünya'da ilk COVID-19 hastalığı tanısı konulan çocuk vaka 20 Ocak 2020'de Çin'de bildirilmiştir [4]. SARS-CoV-2 enfeksiyonu, çocuklarda genellikle hafif üst solunum yolu enfeksiyonu bulguları ile kendini belli eder. İnkübasyon süresi 1 ile 14 gün arasında değişmekle beraber genellikle 3-7 gündür. İlk başvuru şikayetleri genellikle ateş, öksürük, burun akıntısı, boğaz ağrısı, baş ağrısı, halsizlik ve ishaldir. Çocuklarda ağır klinik tablo nadiren görülse de altta yatan hastalığı ve/veya immüsupresyonu olan çocuklarda ve daha küçük pediatrik yaş grubunda ciddi klinik tablo olasılığı daha yüksektir [5]. Bildirilen ağır vakalar arasında solunum yetmezliği, akut solunum sıkıntısı sendromu [5], şok, çoklu organ yetmezliği ve ensefalopati vardır [6]. Salgının çocuklarla ilgili ilk verilerinde çocuk hasta sayısının oranının erişkinlere göre düşüklüğü göze çarpmakta idi. Fakat ilerleyen aylarda çocuk verileri incelendiğinde çocuklardaki enfeksiyon sayısının da giderek arttığı tespit edildi. Amerika Birleşik Devletleri'nde Ekim 2020 itibari ile tüm vakaların 8.7%'sini çocuk hastaların oluşturduğu raporlandı ve çocuklarda COVID-19'un sıklığındaki artış vurgulandı (CDC,2020).

2.1. Virüsün İmmünopatolojisi

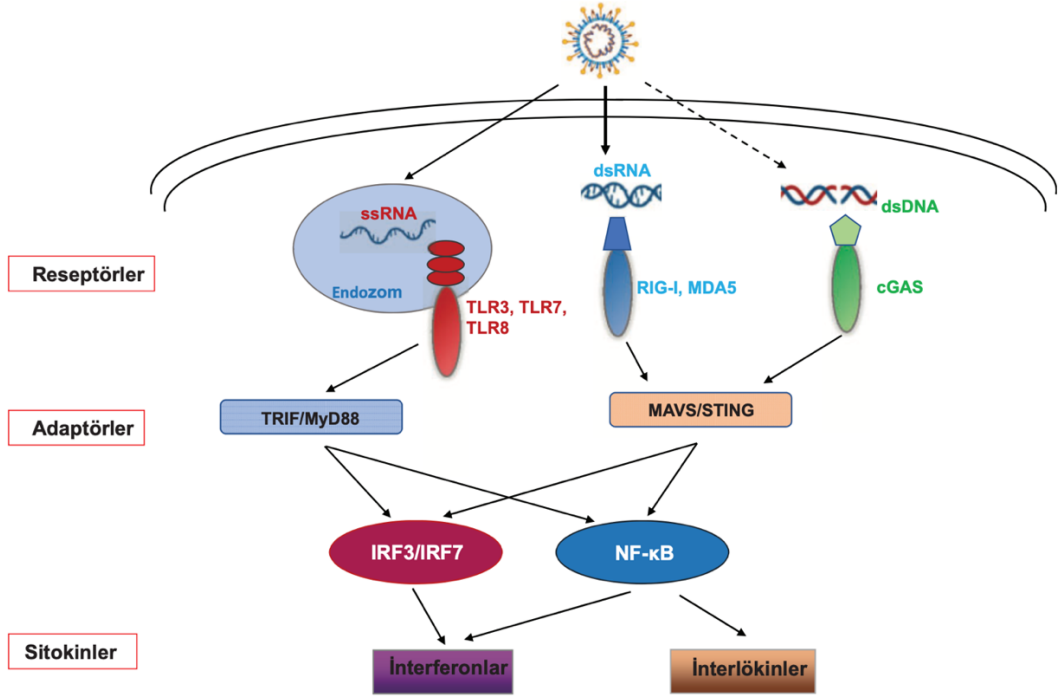
SARS-CoV-2, zarflı bir RNA virüsü olup, spike (S), membran (M), zarf (E), nükleokapsid (N) proteinleri olma üzere dört temel proteini vardır. SARS-CoV-2'nin S proteininin akciğer, kalp, ileum, böbrek, vasküler hücreler ve mesane hücrelerinde bulunan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'ye (ACE2) bağlanmasını

takiben, SARS-CoV-2 hücreye endositoz yoluyla girebilir ve endozomdan katepsin L'ye bağımlı viral kaçıışı – bu transmembran serin proteaz 2 (TMPRSS2) ile olur– gösterir veya viral zarfın hücre zarı ile TMPRSS2'ye bağlı doğrudan füzyonu ile girebilir. Virüsün S proteinin sivri ucunun hücrenel membran lipid çift katmanlarına yerleştirmek üzere gizli füzyon peptidini açığa çıkarması için uygun konformasyona izin veren ve proteinin bölünmesini sağlayan sorumlu hücre yüzeyi serin proteazı olan TMPRSS2'dir [7]. Ayrıca SARS-CoV'den farklı olarak, SARS-CoV-2'nin hücre girişi furin ve nöropilin-1 tarafından da kolaylaştırılabilir. Viral nükleokapsid ise endositik vezikül yoluyla sitoplazmaya iletilir. Geç endozomun asidifikasyonu sonrası, katepsinin etkisi, genomik RNA'nın ve onun replikasyonu için gerekli enzimlerin kaplamasının açılmasını sağlamaktadır. Ayrıca virüsün monosit, makrofaj, lenfosit ve dentritik hücrelerde de çoğaldığı gösterilmiştir [8].

SARS-CoV-2 ilk olarak doğuştan bağışıklık yanıtını uyarır sonra da kazanılmış bağışıklık yanıtı ile savunma devam eder. Viral patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP), Toll benzeri reseptörler (TLR) gibi endozomal patern tanıma reseptörleri (PRR) tarafından algılanır. Patern tanıyan reseptörler (PRR), virüsü tanıyarak inflamatuvar faktörlerin salınımını artırıp dendritik hücrelerin [9] uyarılmasına ve olgunlaşmasına sebep olur. Bu nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ve interferon düzenleyici faktörler [10] gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu içeren hücre içi sinyalizasyon basamaklarıyla sonuçlanır [8]. Ayrıca antijenik peptidler majör histokompatibilite kompleksi (MHC veya insanda human lökosit antijeni) aracılığı ile sunulurlar ve ardından CD4+ T hücreleri, immünglobulin (Ig) G ve IgM dahil olmak üzere virüse özgü antikolar üretmek için B hücrelerini uyarırlar. CD8+ T hücreleri, virüsle enfekte olmuş hücreleri doğrudan öldürebilme yetisine sahiptir. T yardımcı hücreleri, diğer bağışıklık hücrelerine yardımcı olmak için proinflamatuvar sitokinler ve araçlar üretir. Vücutta viral yayılımın sınırlandırılmasında önemli olan tip I interferonların (IFN-I) sentezinin arttırılması da bir savunma mekanizmasıdır ve daha başka C3a ve C5a gibi kompleman faktörlerinin ve antikoların üretimi, viral enfeksiyonla mücadelede kritik öneme sahiptir [11].

SARS-CoV-2 virüsüne karşı gelişen IgM ve IgG paterni diğer virüs enfeksiyonları ile benzerdir. Antijenik peptidler MHC aracılığı ile sunumunun

ardından virüs spesifik sitotoksik T lenfositler tarafından tanınır. Antijen sunumuyla virüs spesifik B ve T hücre aracılı humoral ve hücrel immünite uyarılır. SARS-CoV-2 spesifik IgM antikorunu enfeksiyonun 7-21. gününde tespit edilirken, IgG üretimi 14. günde başlar ve uzun süre devam eder [6].



Şekil 2.1. Doğal immün sistem sinyalizasyonunda SARS-CoV-2 virüsünün tanınması (Yang ve arkadaşlarının makalesinden Türkçeleştirilerek alıntılanmıştır) [12].

SARS-CoV, SARS-CoV-2 ve MERS-CoV gibi RNA virüsleri, RNA'ları aracılığıyla hücreler tarafından tanınırlar. Virüsler TLR 3 ve 7, retinoik aside bağlı gen I (RIG-I) ve melanom farklılaşması ile ilişkili protein 5 (MDA5) olarak bilinen virüslerin sitoplazmik RNA sensörleri olan endozomal RNA reseptörleri ile saptanır. TLR3/7'nin aktive olmasıyla nükleer faktör-kappa B (NF-κB) ve IRF3 uyarılır. RIG-I ve MDA5'in aktivasyonu ise yalnızca MAVS/STING yolağını aktive eder. Bu sinyaller sonucunda IRF3/IRF7 aracılığıyla Tip 1 IFN; NF-κB aracılığıyla da IL-1, IL-6 ve TNF-α, gibi proinflatuar sitokinlerin ekspresyonları artar (Şekil 1). Ayrıca SARS-CoV-2 gibi sitopatik virüsler, enfekte ettikleri hücrelerin piroptozuna (programlanmış hücre ölümünün inflamatuvar hastalıklardaki şekli) neden olur. Bu da inflamatuvar yanıt için olası bir tetikleyicidir. Piroptoz sırasında salınan önemli bir sitokin olan IL-1β, SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında yükselir.

IL-6, IFN- γ , MCP-1 ve IP-10'un artışı ile etkilenen hastaların kanında bir inflamasyon dalgası oluşur [13].

Sitokin fırtınası bağışıklık sisteminin kendi kontrolünü kaybetmesinin bir sonucudur. Bu durum da, bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesindeki kusur nedeniyle organ yetmezliklerine ve ölüme yol açabilen inflamatuvar proteinlerin üretiminin artmasına neden olur. İmmün efektör hücreler tarafından salınan bu inflamatuvar araçlar arasında IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- α ve TGF- β gibi sitokinler ve CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9 ve CXCL10 gibi kemokinlerin arttığı gösterilmiş ve akut respiratuvar distress sendromu (ARDS) gibi organ yetmezliklerine ilerlemede yeri olduğu rapor edilmiştir.. Ağır COVID-19 vakalarında gösterilen hiperferritinemi, lenfopeni, uzamış protrombin zamanı, yüksek laktat dehidrogenaz [14] [14], yüksek IL-6, yüksek C-reaktif protein (CRP), yüksek CD25 düzeyi sitokin fırtınasının laboratuvar destekleyicileri niteliğindedir [9, 15]. COVID-19 geçiren erişkin ve pediatrik popülasyonun karşılaştırıldığı bölümümüzden yapılan bir çalışmada IFN- γ kaynaklı protein 10 (IP-10) ve makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-3 β seviyeleri, sağlıklı insanlara göre COVID-19'lu çocuk ve yetişkin hastalarda daha yüksek bulunmuş olup şiddetli hastalık seyri olan hem pediatrik hem de erişkin olgularda IP-10 düzeylerinin anlamlı derecede yüksek; sağlıklı kontrollerde MIP-3 β düzeyinin daha düşük olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, IP-10'nin özellikle çocuklarda hastalık şiddeti için bağımsız bir prediktör olduğu IL-6'nın ise yetişkinlerde hastalık şiddeti için nispeten iyi bir prediktör olduğu gösterilmiştir [16].

SARS-CoV-2 ile enfekte hastaların periferik kanında CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin anlamlı derecede azaldığı, fakat aşırı derecede aktive olduğu bildirilmiştir [9] Lenfopenik durum, otoimmün potansiyeli olan efektör T hücrelerinin aktivasyonuna yol açan periferik toleransın azalmasına neden olabilir. Bu self-tolerans kaybı mekanizması, lenfopeni ve otoimmünite arasındaki paradoksal ilişkiyi açıklayabilir [17]. COVID-19 ile ilişkili olan Guillain-Barré sendromu ve varyantları, immün trombositopenik purpura, antifosfolipid sendromu ve trombotik trombositopenik purpura gibi otoimmün durumlar da sıklıkla bildirilmektedir [8].

Solunum hücrelerinin transkriptomik analizleriyle, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun son derece düşük IFN seviyeleri ortaya çıkardığı ve güçlü bir pro-inflamatuvar sitokin tepkisini indüklediği gösterilmiştir. Hatta öyle ki TLR7 genindeki genetik bir varyant tanımlanmış ve bozulmuş IFN-I ve IFN-II yanıtlarıyla ilişkilendirilmiştir. Ağır COVID-19 pnömonisi olan 987 hastanın %10,2'sinde IFN-I'e karşı nötralize edici otoantikolarlar gösterilmiştir [8].

İnterlökin-6 gibi proinflamatuvar sitokin seviyeleri ile hastalık ciddiyetinin ilişkilendirildiği çalışmalardan sonra IL-6 seviyelerinin COVID-19 hastalarının proteomu üzerindeki etkisine dair yapılan bir proteomiks çalışmasında, IL-6 seviyelerinin bir fonksiyonu olarak, çeşitli serin proteaz inhibitörleri (SERPIN'ler) dahil olmak üzere artan fibrinolitik kaskadın antifibrinolitik komponent seviyeleri ile birlikte çeşitli koagülasyon faktörlerinin serum seviyelerinde değişiklikler gösterilmiştir. Özellikle en yüksek IL-6 seviyesindekilerin serumlarında; SERPINA1, SERPINA3, SERPINF2 dahil olmak üzere koagülasyon/fibrinolitik yolağının SERPIN ve karboksipeptidazların (CPB2/TAFI) seviyelerinde önemli artışlar raporlanmıştır [18].

Genetik olarak aynı aileden gelen MERS-CoV enfeksiyonunda, HLA-DRB1*11:01 ve HLA-DQB1*02:02 gibi MHC II molekülleri, MERS-CoV enfeksiyonuna yakınlıkla ilişkili bulunmuştur. COVID-19 için bakıldığında ise Çin popülasyonunda yapılan küçük bir çalışmada HLA-C*07:29 ve B*15:27 allellerinin COVID-19 ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Bir Avrupa popülasyonunda ön rapor olarak yayınlanan ilk genom boyu ilişkilendirme çalışması (GWAS) ise ABO kan grubunda A-pozitiflerin solunum yetmezliği riskinin %45 oranında arttığını, O kan grubuna sahip bireylerin ise %35 oranında solunum yetmezliği riskinde azalma olduğu gösterilmiştir.

2.2. Kawasaki hastalığı (KH)

İlk olarak 1967 yılında tanımlanan KH genellikle beş yaş altı çocuklarda görülen çocukluk çağının en sık ikinci vaskülitidir. Akut gelişen ve orta çaplı damarları tutan KH gelişmiş ülkelerde çocukluk çağındaki edinsel kalp hastalığının en önemli nedenidir. Japonlarda ve uzak Asya ülkelerinin halklarında sık görülür ve mevsimseldir; bu yüzden genetik yakınlık ve enfeksiyonlar hastalık etiolojisinde

suçlanmıştır. Etiyopatogenezi henüz aydınlatılamamıştır. Esas olarak beş günden fazla süren ateş, konjonktival hiperemi, servikal lenfadenopati, mukokutanöz cilt tutulumu, ekstremitelerde ödem ile karakterizedir [19, 20].

Tablo 2.1. Amerikan Kalp Birliği'nin (AHA) 2017'de önerdiği KH tanısında kullanılan kriterler

KH tanı kriterleri:	KH'yi destekleyici laboratuvar bulguları	Sıklıkla görülen kan tablosu
<p>Aşağıdaki 5 semptomdan en az 4'ü ile birlikte 5 gün boyunca devam eden ateş:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bilateral konjonktival hiperemi • Dudaklarda ve ağız mukozasında değişiklikler • Polimorf ekzantem • Servikal lenfadenopati, genellikle tek taraflı • Ellerde ve ayaklarda değişiklikler: eritem, ödem ve deskuamasyon. 	<p>Yüksek eritrosit sedimentasyon hızı (ESH)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Yüksek C reaktif proteini (CRP) • Nötrofili ile lökositoz • Hiponatremi • Hipoalbuminemi • Anemi 	<p>Beyaz küre >15.000/mm³ (nötrofilik)</p> <p>Hemeoglobin: Anemik</p> <p>Trombosit: >450.000/mm³</p> <p>ESH:> 40 mm/sa</p> <p>CRP:> 3 g/dl</p> <p>Albumin:< 3 g/dl</p> <p>Ferritin: normal sınırından yüksek</p> <p>ALT: normal sınırından yüksek</p> <p>GGT: normal sınırından yüksek</p> <p>Piyüri: >10 lökosit (büyük büyütmede her sahada)</p> <p>BOS: Glukoz düşüklüğü olmadan mononükleer pleositoz ve/veya yüksek protein</p>

(McCrinkle, Rowley et al. 2017) ve sıklıkla görülen laboratuvar değerleri (Rife and Gedalia 2020)

Kawasaki hastalığı için tanı kriterli tam sağlanamadığında hastalık inkomplet Kawasaki olarak değerlendirilmektedir. KH için spesifik bir biyobelirteç olmaması ve ateş ve gözlerde kızarıklık gibi çok yaygın başvuru şikayetleri ile kendini belli etmesi nedeniyle KH tanısını koymak zor olabilir ve tanı konulamadığında koroner arter anevrizması gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilir. Erken tanı ve tedavi ile koroner arter anevrizması riski %25'ten %3'e kadar düşürülmektedir [20].

Laboratuvar bulguları olarak KH'ye spesifik bir biyobelirteç yoktur. Akut faz reaktanlarında eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), C-reaktif protein (CRP), prokalsitoninde yükselme görülür. Tam kan sayımında nötrofili, lökositoz ve trombositoz görülür. Ortalama trombosit hacminde (MPV) ve trombosit dağılım aralığında (PDW) düşüş görülebilir [21].

KH kriterleri tam olan ve inkomplet KH için algoritma kriterlerini karşılayan hastalara mümkün olan en kısa sürede yüksek doz intravenöz immünglobülin (IVIG)

2 g/kg tek seferde en az 12 saatlik infüzyonla ve orta doz (30-50 mg/kg/gün) veya yüksek doz (80-100 mg/kg/gün) asetilsalisilik asit (ASA) oral yoldan verilir. Adjuvan tedavide ise kortikosteroidler, IL-1 reseptör antagonistleri, TNF inhibitörleri, kalsinörin inhibitörleri verilebilir. Dirençli vakalarda terapötik plazma değişimi (TPE), siklofosamid, metotreksat, ritüksimab gibi diğer immünsupresif tedavilerin etkili olduğunu gösteren çalışmalar da vardır [22].

2.3. Çocuklarda Çoklu Sistemik İnflamatuvar Sendrom (MIS-C)

İngiltere’de Nisan 2020’de önceden sağlıklı olduğu bilinen sekiz pediatrik hasta atipik Kawasaki ve toksik şok sendromuna benzer özellikler gösteren kliniğiyle, COVID-19 hastalığından sonra SARS-CoV-2 virüsü ile ilişkilendirilen ikinci klinik durum olma özelliğini gösteriyordu. Bu hastaların ortak özellikleri, başvuru anında ateş, döküntü, konjonktival hiperemi, ekstremitte ödemi ve gastrointestinal semptomlarının olmasıydı. Nisan 2020'nin sonuna kadar, Avrupa ülkelerinden yaklaşık 100 Kawasaki benzeri vaka bildirilmiştir. Mayıs ayının başında, Londra’da çok sayıda organ tutulumu ve şiddetli hiperinflamasyonu olan pediatrik vakalar yayımlanmış [23], daha sonra dünya genelinde KH’ye benzeyen vakaların bildirilmesi ve bu klinik tablonun COVID-19 ile zamansal ilişkisi olan çocuklarda gerçekleşmesi, çocuklarda çoklu sistemik inflamatuvar sendrom (MIS-C) olarak adlandırılan yeni bir klinik tablonun tanımlanmasına neden olmuştur [24, 25]. Her ne kadar KH ile örtüşen klinik benzerlikleri olsa da MIS-C’de organ tutulumları KH’ye göre daha ön plandadır. KH ortalama 5 yaş civarında görülürken, MIS-C çocuklarda ve adolesanlarda 8-11 yaş arasında sıklıkla görülmektedir (Santos et al., 2022). MIS-C’nin tahmini kaba prevalansı %35,42, havuzlanmış prevalansı %29 olup erkeklerde daha sık görülmektedir [26].

2.3.1. MIS-C Patofizyolojisi

MIS-C'nin patofizyolojisinin ayrıntıları aydınlatılamamış olsa da üzerinde çalışılan hipotezler mevcuttur. Bugüne kadar, sendromun gelişimiyle ilişkili olabilecek en önemli iki hipotez vurgulanmıştır: Bunlar SARS-CoV-2’nin spike protein süperantijenik profili ve viral enfeksiyona yanıt olarak otoantikor üretimidir.

Süperantijenler (SAg), antijen sunan hücrelerin (APC'ler) yüzeyindeki majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II moleküllerini değişken alanlarındaki T hücre reseptörü (TCR) β zincirleri (V β) ile çapraz bağlanarak T hücrelerinin büyük bir kısmını spesifik olmayan bir şekilde aktive edebilen mikrobiyal proteinlerdir. T hücrelerinin SAg ile aşırı aktivasyonu kemokinlerin ve proinflamatuvar sitokinlerin kontrolsüz salınımına neden olur ve toksik şok sendromunun da (TSS) temelini oluşturur. KH ve SAg aracılı hastalıklarla ateş, döküntü gibi bazı klinik özellikler benzerdir ve SAg'lar potansiyel KH tetikleyicileri olarak kabul edilmiştir [27]. MIS-C'de endotelial hasarı açıklayan önemli immün profil çalışmalarında NK hücreleri ve CD8+ T hücrelerinin perforin, granzim A ve H ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [28]. TRBV11-2 (V β 21.3) tarafından kodlanan V β zincirindeki poliasidik kalıntıların SARS-CoV-2 spike glikoproteininin süperantijen benzeri motifiyle güçlü bir şekilde etkileşime girdiği gösterilmiştir; bu da işlenmemiş SARS-CoV-2 *spike*'nın doğrudan TRBV11-2 genişlemesine aracılık edebileceğini düşündürmektedir [29].

MIS-C tedavisinde IVIG'e verilen dramatik yanıt KH'de olduğu gibi MIS-C'de de otoantikör aracılı patofizyolojiyi akıllara getirmiştir. Özellikle MIS-C'li hastaların kalp ve gastrointestinal sistem gibi sık tutulan organlarında otoantikörlerin tespit edilmesi bu tezi kuvvetlendirmektedir. IL-18 ve IL-6'nın yükseldiği, lenfositik ve miyeloid kemotaksis ve aktivasyonunda (CCL3, CCL4 ve CDCP1) ve mukozal immün düzensizlikte (IL-17A, CCL20, CCL28) önemli otoantikör imzaları tespit edilmiştir. Ayrıca immünofenotiplemede, mDC1 ve klasik olmayan monositlerin yanı sıra hem NK- hem de T- lenfositlerin azaldığı, bunun da etkilenen dokulara hücrelerin ekstrasvazasyonu sebebiyle olduğu düşünülmüştür [30]. Lenfosit aktivasyon süreçlerinde, immün hücre sinyalizasyonunda yer alan otoantijen peptidleri gösterilmiş [31] ve gastrointestinal ve kardiyovasküler sistemlerden, iskelet kasından ve beyin dokularından bir dizi IgG-hedef dokuya özgü antijen de tanımlanmıştır [32].

2.3.2. MIS-C Kliniği

2.3.2.1. Kardiyak Tutulum

SARS-CoV-2 virüsünün miyokard ve endotel hücrelerine tropizm göstermesi nedeniyle virüsün bu hücrelere invazyonu, bozulmuş immün cevaba neden olup, mikrovasküler disfonksiyon ve endotel hasarı ile sonlanabilir. Hipotansiyonun ön planda olduğu ve yoğun bakım ihtiyacı olan çocuklar vakaların neredeyse yarısını oluşturmaktadır [33, 34]. KH'ye göre kardiyak tutulum MIS-C'de daha belirgindir. Başlıca ventriküler disfonksiyon, perikardiyak efüzyon, kapak yetmezlikleri, aritmi, miyokardit, koroner arter anevrizması ve dilatasyonunun görüldüğü kardiyak tutulum, hastaların %67-80'inde kendini gösterir (Feldstein et al., 2020; Son et al., 2021)[35]. Hastane yatışı gereken vakaların %75-80 kadarı yoğun bakım ihtiyacı gösterirken; %40-60 inotropik ajan desteği, %10-20 kadarı invaziv mekanik ventilasyon desteği gerektirir [36, 37]. İnotropik ajan desteği gerektiren hipotansiyon nedeniyle yapılan ekokardiyografik görüntülerde kardiyak debinin düştüğü, sol ventrikül (LV) disfonksiyonu görüldüğü ve yeterli oksijenizasyon ve tansiyon oluşturulamaması nedeniyle ekstrakorporeal membran oksijenasyonuna (ECMO) ihtiyaç duyulan vakalar olduğu bildirilmiş olup tedavide ECMO kullanılmıştır [38].

2.3.2.2. Gastrointestinal Sistem Tutulumu

GİS semptomları hastalarda %71 - 89 oranında görülmekle beraber en sık GİS tutulumunun en sık belirtisi karın ağrısıdır [34]. Bulantı, kusma ve ishal diğer GİS tutulumu bulgularıdır. Karın ağrısı sıklıkla akut apandisit ile karışıp opere edilen ve MIS-C tanısı alan vakalar pandeminin başında raporlanmıştır [39, 40]. Abdomen görüntülemelerinde bildirilen bulgular: Hafif asit, safra kesesi duvarı kalınlaşması, safra kesesi çamuru, hepato(spleno)megali, ileus, bağırsak duvarı kalınlaşması, mezenterik lenfadenopati, mezenterik ödem veya inflamatuvar değişiklikler ve mesane duvarı kalınlaşmasıdır [41]. Transaminaz yüksekliği ile kendini belli eden akut hepatit tablosu da görülebilir.

2.3.2.3. Böbrek Tutulumu

Akut böbrek hasarı (ABH) yaklaşık olarak hastaların %25-33'ünde görülmekte ve kritik hastalarda kötü prognoz kriteri olarak ele alınmaktadır [42]. MIS-C'de kardiyak tutulumu bağlı düşen kardiyak debi böbrek perfüzyonunu bozarak ya da renin-anjiyotensin- aldosteron sistem aktivasyonuna bağlı glomerüler disfonksiyon ABH'ye neden olmakla beraber; sitokin fırtınası, SARS-CoV-2'nin renal tübüler hücrelerdeki sitopatik etkisi, renal vasküler sistemde iskemik glomerül ve fibrinoid nekroza neden olan endotelial disfonksiyon, kompleman ve koagülasyon aktivasyonu; trombotik mikroanjiyopatiye (TMA) benzer glomerüler kapillerlerin obstrüksiyonu MIS-C'de böbrek tutulumunun birer nedeni olabilir [43-45].

2.3.2.4. Akciğer Tutulumu

Takipne, retraksiyon ve/veya solunum iş yükünde artış hastaların %70'inde görülmektedir [45]. Posteroanterior bir akciğer grafisinde tamamen normal bir görünüm olabileceği gibi, hastalığın şiddetine ve organ tutulumuna bağlı olarak bazallerde bilateral yaygın hava boşluğu opasiteleri, peribronşiyal kalınlaşma veya interstisyel opasiteler, bilateral plevral efüzyonlar ve kardiyomegali görülebilir [46]. Pulmoner opasite artışı bulut benzeri görünümde ve simetrik olma eğilimindedir. Kardiyak yetmezliğe, hastanın hiperinflamatuvar durumuna veya hipotansiyon nedeniyle uygulanan muhtemel agresif sıvı resüsitasyonuna sekonder pulmoner ödem ve ARDS görülebilir.

2.3.2.5. Santral Sinir Sistemi (SSS) Tutulumu

Halsizlik/güçsüzlük, konfüzyon/bilinç değişikliği, baş ağrısı, koku ve tat duyusu kaybı, nöbet ve yürümede/emeklemede zorluk MIS-C prezantasyonunda görülen yakınmalardır ve en sık halsizlik/güçsüzlük görülmektedir. MIS-C olguları ensefalopati, inme, santral sinir sistemi enfeksiyonu/demiyelinizasyonu, Guillain-Barre sendromu ve/veya varyantları ve akut fulminan serebral ödem gibi hayatı tehdit edici durumlarla başvurabilirler [47, 48]. Her ne kadar derin ven trombozu ve pulmoner emboli adolesanlarda %7 oranında bildirilse de [36] literatürdeki inmeler, ECMO, eşlik eden bakteriyel enfeksiyonlar ve inmeye yatkınlık oluşturabilecek orak hücreli anemi gibi durumlarla ilişkilendirilmiştir [38, 47].

2.3.2.6. Hematopoetik Sistem Tutulumu

Koagülopati COVID-19 hastalığında olduğu gibi MIS-C’de de önemli bir komplikasyondur. Endotel hücre hasarı ve akabinde gelişen inflamatuvar süreçler, trombositlerin aktivasyonu, koagülasyon faktörlerinin ve kompleman yolağındaki değişiklikler hepsi trombo-inflamasyon adı altında değerlendirilebilir. Daha özelde kompleman-aracılı trombotik mikroanjyopati (TMA), çözümlü c5b9 yüksekliğiyle beraber giden trombositopeni ve mikroanjyopatik hemolitik anemi MIS-C’de görülebilen komplikasyonlardır [49, 50]. MAS da %20 sıklıkla MIS-C ile beraber görülebilir [51, 52].

2.3.2.7. Cilt Tutulumu

MIS-C’de en önemli organ tutulumlarından biri de deridir. En sık görülen mukokutanöz manifestasyonlar konjunktival kızarıklık, diffüz spesifik olmayan erüpsiyon, kuru ve kırmızı bazen çatlak dudaklar ve/veya diğer mukozal değişiklikler, el ve ayaktaki eritem ve ödemdir [53]. Fakat morbiliform, ürtikeryal, veziküler, papüloskuamöz, livedoid ve nekrotik lezyonlar da tarif edilmiştir [54].

2.3.3. Laboratuvar Bulguları

MIS-C hastalarında tam kan sayımı hastalık şiddeti ve tanısında önemli ipuçları verir. Anamlı olarak lökositoz, lenfopeni, nötrofili, anemi görülür. Rutin kan biyokimyası incelemelerinde karaciğer transaminazları ALT ve AST’de artış, hipoalbuminemi, hiponatremi sıklıkla tanı anında eşlik eden laboratuvar parametreleridir [33, 36, 37].

İnflamatuvar durumu göstermek üzere bakılan CRP, prokalsitonin, ESH, ferritin ve IL-6 yüksekliği tanı kriterleri içinde de yer alan önemli belirteçlerdir [35].

Koagülasyonu belirteçlerinden fibrinojen ve D-dimer yüksekliğine zaman zaman INR değerindeki değişiklikler de eşlik eder [55]

Kardiyak tutulumu değerlendirmek için sıklıkla laboratuvarında BNP, pro-BNP, troponin ve AST kullanılmaktadır. Yüksek BNP değeri ağır ve hafif formların ayırımında bir gösterge olarak kullanılabilirken; troponin ve AST bu ayırımında yeterli duyarlılığa sahip değildir. MIS-C hastalarının en ağır komplikasyonlarından

biri olan koroner arter anevrizmasını görüntüleme dışında laboratuvarında tespit etmek için BNP ve troponin yüksekliğinin bir biyobelirteç olamayacağı meta-analiz çalışmalarıyla da gösterilmiştir [56].

2.3.4. Görüntüleme

Kardiyak tutulumu değerlendirmek üzere telekardiyografi, ekokardiyografi (EKO), kardiyak manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve bilgisayarlı tomografi (BT) kullanılabilir. EKO, BT ve MRG ile akciğer ve kardiyak tutulum hakkında bilgi alınabilir. Telekardiyografi ya da direkt akciğer grafisinde, kalpte kardiyomegali, akciğerde ise atelektaziler ve plevral efüzyon görülebilir. Kapak yetmezlikleri, ejeksiyon fraksiyonu (EF), perikardiyal efüzyonu göstermede EKO ve MRG'yi tanı ve takipte radyasyon maruziyeti olmadan kullanmak mümkündür [57]. Toraks BT rutin olarak önerilmemekle beraber pulmoner emboli şüphesinde tanıda düşünülmelidir. SSS tutulumu için BT, BT anjiyografi, MRG, MR anjiyografi kullanılabilir. SSS MR görüntülemesi ile beyin ödemi, inme ve ensefalopatik değişiklikler gösterilebilir. Gastrointestinal sistem komplikasyonlarını görüntülemek üzere abdominal ultrasonografi, abdomen BT'si, abdomen MRG'si kullanılabilir ve akut apandisit taklit eden klinik tablolarda özellikle terminal ileiti, mezenterik lenfoadenopatiyi, bağırsak ödemi ve karın içi sıvıyı gösterebilirler [58].

2.3.5. Ayırıcı Tanı

Kawasaki hastalığı şok sendromu (KHŞS), KH ile benzer kliniğe ek olarak hipotansiyon ve hemodinamik instabilite ile seyreden nadir bir sendromdur. Hispaniklerde görülen, ileri yaş ve daha ciddi hipotansiyon, deri döküntüsü, lökositoz, nötrofili ve hipoalbuminemi ile birlikte daha yüksek IVIG tedavisi direnci ile ilişkilidir. MIS-C'li hastalarda şok, miyokardit, tromboz ve gastrointestinal semptomlar daha sık görülür. Hem KHŞS hem de MIS-C'li hastalar inotropik ajanlar, ventilasyon desteği, antitrombotik tedavi ve ek antiinflamatuvar tedaviler gibi yoğun bakım desteklerine daha sık ihtiyaç duyarlar [59].

Tablo 2.2. MIS-C ve KH'nin demografik ve klinik özellikleri [59]

Özellikler	KH	KHŞS	Çocuklarda COVID-19	MIS-C
Deri/mukoza (%)	>90	>90	Az	50–60
KAA (%)	20	65	Nadir	29–80
Miyokardit(%)	5	20	Nadir	65
Şok (%)	7	100	Nadir	60
Yaş aralığı (yıl) (Medyan)	0,5–5,0 (2,0)	2–12 (3,5)	0–18	2–18 (8,3)
Cinsiyet	Erkek	Kız	Eşit	Eşit
İrk	Asyalı	Hispanik	Tüm ırklar	Afro-Karayip
IVIG direnci	15%	40%	–	80% (ek steroid)
Ölüm (%)	<0,1	0–6,8	<0,1	0–10
Patojen	Bilinmiyor	Bilinmiyor	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 ilişkili

KHŞS, Kawasaki hastalığı şok senromu; COVID-19, koronavirus hastalığı-19; KAA, koroner arter anevrizması; IVIG, intravenöz immünglobülin; SARS-CoV-2, şiddetli akut respiratuvar sendrom koronavirus-2.

KH ile MIS-C'nin farklarına bakıldığında bu iki sendromun yaş dağılımı, etnik farklılıklar, klinik belirtilerdeki öne çıkan organ tutulumları, kardiyak tutulum çeşidi, inflamatuvar belirteçlerdeki yükseklikler, tedavi ve sonuç gibi bazı farklılıkları olduğu görülmektedir (Tablo 2.2).

2.3.6. Tanı

Birleşik Krallık Pediatri ve Çocuk Sağlığı Kraliyet Koleji (PCPCH) [60], Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) [25] ve Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri'nin (CDC) [24] ve Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığının [61] MIS-C tanımlamalarına bakıldığında, (Tablo 2.3) her üç tanım da ateşin varlığını, inflamasyonun laboratuvar kanıtı olduğunu, alternatif tanımlar olmaksızın çoklu sistem organ tutulumunu ve ayrıca COVID-19 enfeksiyonu veya yakın zamanda bir COVID-19 vakasına maruz kalma bilgisini içermektedir. Ateşin süresi,

organ tutulumu kriterleri ve SARS-CoV-2 enfeksiyonunun ispatına duyulan ihtiyaç dört kurumun tanımlarında farklılık arz eder.

Tablo 2.3. MIS-C vaka tanımlamaları

Pediatri ve Çocuk Sağlık Kraliyet Koleji (Birleşik Krallık)	Dünya Sağlık Örgütü[25]	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri[24]	Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı [61]
<p>İnatçı ateş, inflamasyon (nötrofil, yüksek CRP ve lenfopeni) ve tek veya çoklu organ disfonksiyonu (şok, kardiyak, pulmoner, renal, gastrointestinal veya nörolojik bozukluk) kanıtı ile başvuran bir çocuk.</p> <p>Bu, Kawasaki hastalığı için tam veya kısmi kriterleri karşılayan durumları içerebilir.</p> <p>Bakteriyel sepsis, stafilokoksik veya streptokoksik şok sendromları, enterovirüs gibi miyokardit ile ilişkili enfeksiyonlar dahil olmak üzere diğer herhangi bir mikrobiyal nedenin dışlanması (bu araştırmaların sonuçlarını beklemek, uzman tavsiyesi almayı geciktirmemelidir)</p> <p>SARS-CoV-2 PCR test sonuçları pozitif veya negatif olabilir.</p>	<p>0-19 yaş arası ve 3 günden uzun süren ateşi olan çocuklar ile aşağıdakilerden 2 tanesinin bulunması;</p> <p>1.Döküntü ya da nonpurulan konjonktivit ya da mukokutanöz inflamasyon bulguları (ağızda, ellerde ya da ayaklarda)</p> <p>2.Hipotansiyon ya da şok</p> <p>3.Miyokard disfonksiyon bulguları, perikardit, valvulit ya da koroner arter anomalisi (EKO bulguları ya da yüksek troponin/BNP</p> <p>4. Koagulopati kanıtı (PT, aPTT ve yüksek D-dimer)</p> <p>5.Akut gastrointestinal problemler (ishal, kusma ya da karın ağrısı)</p> <p>VE</p> <p>İnflamasyon belirteçlerinde yükselme; ESH, CRP ya da prokalsitonin</p> <p>VE</p> <p>Diğer mikrobiyal nedenlerin bakteriyel sepsis, stafilokoksik ya da streptokoksik şok sendromu kanıtı olmayışı</p> <p>VE</p> <p>COVID-19 kanıtı (RT-PCR, antijen testi ya da seroloji pozitif) ya da COVID-19 pozitif biriyle temas</p>	<p>21 yaş altı ateş, laboratuvar inflamasyon kanıtı ve hastane yatışı gerektirecek kadar ağır hastalık bulguları, >2 organ tutulumu (kalp, böbrek, solunum, hematolojik, gastrointestinal, dermatolojik ya da nörolojik)</p> <p>24 saatten uzun süre >38°C ateş ya da subjektif ateş bildirilmesi</p> <p>≥1 laboratuvar bulguları: artmış CRP, ESH, fibrinojen, prokalsitonin, D-dimer, ferritin, LDH ya da IL-6, artmış nötrofil, azalmış lenfosit, düşük albumin</p> <p>VE</p> <p>Başka makul tanı olmaması</p> <p>VE</p> <p>Yakınmalar başlamadan önce COVID-19 kanıtı (RT-PCR, antijen testi ya da seroloji pozitif)</p>	<p>1. 21 yaş altı ve</p> <p>2. 2Vücut sıcaklığı4 saatten uzun süren, >38.0°C ölçülmüş veya ailenin ateş varlığı bildirimi, ve</p> <p>3. Laboratuvar tetkiklerinde inflamasyon kanıtı (En az 2 veya daha fazla kanıt varlığı)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Yüksek CRP, ESH, fibrinojen, prokalsitonin, D-dimer, ferritin, LDH, IL-6 • Artmış nötrofil sayısı • Lenfopeni • Hipoalbuminemi ve <p>4. Hastaneye yatış gerektirecek ağır hastalık tablosu ve</p> <p>5. Çoklu organ sistem tutulumu (En az 2 veya daha fazlasının varlığı) Kardiyovasküler (Şok, yüksek troponin, yüksek BNP, anormal EKO bulguları, aritmi) Solunum (Pnömoni, ARDS, pulmoner emboli) Böbrek (Böbrek yetmezliği) Nörolojik (Konvülsiyon, inme, aseptik menenjit) Hematolojik (Koagulopati, yüksek D-dimer düzeyi) Gastrointestinal (Yüksek karaciğer enzimleri, diyare, ileus) Dermatolojik (Eritrodermi, mukozit, diğer döküntü)</p> <p>6. Alternatif başka tanı olmaması (bakteriyel sepsis, enterovirüs enfeksiyonu gibi miyokardit ile ilişkili enfeksiyonlar, stafilokoksik veya streptokoksik toksik şok sendromları gibi)</p> <p>7. Geçirilmiş veya yeni geçirilmekte olan SARS-CoV-2 enfeksiyon kanıtı (Aşağıdakilerden en az birisinin varlığı)</p> <ul style="list-style-type: none"> • SARS-CoV-2 RT-PCR veya seroloji veya antijen pozitifliği • Semptomların başlamasından önceki 4 hafta içerisinde SARS-CoV-2 pozitif olgu teması

Erişkinlerdeki ağır COVID-19 tablosunda ortaya çıkan sitokin fırtınasının MIS-C deki ile benzerlik gösterdiği düşünülmektedir. Kawasaki hastalığı ve ağır COVID-19 tanımlı erişkin vakaları ile MIS-C tanımlı çocuk hastaların immünolojik yanıtlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada naif (*naïve*) CD4⁺ T hücre ve T_{FH} düzeylerinin MIS-C hastalarında Kawasaki hastalarına oranla daha düşük olduğu, efektör ve hafıza alt popülasyonların sayısında ise MIS-C grubunda artış olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada tümör nekrozis faktör- β (TNF- β), ITGA11 ve CCL25 gibi sitokin ve kemokin düzeylerinin tedaviye yanıt olarak düştüğü, ancak HEXIM1, PSP1 ve CXCL10 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Bu da MIS-C'de Kawasaki hastalığından farklı bir sitokin yanıtı olduğunu ve bu durumun farklı bir antite olduğunu destekler niteliktedir. Ayrıca bu çalışmada Kawasaki hastalığı, MIS-C ve akut COVID-19 geçiren bireylerdeki proteomiks analizinin gen ontolojiye (*Gene Ontology, GO*) başvurularak yorumlanmasında miyokardit ve bozulmuş kalp fonksiyonunun MIS-C klinik sunumunun ayırt edici özellikleri olduğu gösterilmiş olup otoantikor hedefleri üzerinden gidilerek endotel hücreleri tarafından eksprese edilen ve arterlerin yapısal bütünlüğünün farklı şekilde düzenlenmesi için gerekli olan bir glikoprotein olan endoglin tespit edilmiştir. Hepsinde olmasa da sağlıklı kontrollerde görülen ortalama seviyelerin üzerinde endoglini hedefleyen yüksek otoantikor seviyeleri gösterildiği gibi Kawasaki hastalarının bir kısmında da endogline karşı yüksek otoantikor seviyeleri tespit edilmiştir. Sağlıklı çocuklara kıyasla Kawasaki ve MIS-C hastalarında plazma endoglin düzeylerinin ölçüldüğünde yüksek gelmesinden hareketle, bunun muhtemelen endogline karşı oluşan otoantikorların doku hasarının nedeni değil, sonucu olduğu şeklinde yorumlanmıştır [31].

MIS-C sendromunda yardımcı T hücre 1 (Th1) ve Th17 lenfositlerinin proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olduğu ve bunun da sitokin fırtınasının daha da abartılı yanıtına katkıda bulunacak şekilde makrofaj, nötrofil ve monosit artışını beraberinde getirerek progresif doku zedelenmesine neden olduğu düşünülmektedir [62].

Ayrıca, MIS-C'nin belirgin gastrointestinal semptomları, lökopeni, lenfopeni ve yüksek BNP, troponin, ferritin ve C-reaktif protein vardır ve şok tablosunda hastalar sağlık merkezlerine başvurabilir. Akut MIS-C ayrıca IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-

10, IL-17 ve IFN- γ gibi yüksek sistemik inflamatuvar sitokinler ile karakterizedir. Ayrıca, NK, T hücresi, monosit ve nötrofil toplanması, mukozal immünite göstergesi olan bir sitokin profili gösterilmiştir [16]. Sitokin profili oluşturma, artmış inflamasyon göstergeleri (IL-18 ve IL-6), lenfositik ve miyeloid kemotaksi ve aktivasyonu (CCL3, CCL4 ve CDCP1) ve mukozal immün düzensizlik (IL-17A, CCL20 ve CCL28) de gösterilmiştir [63].

Endotelyal hücre hasarı ağır COVID-19 ile ilişkilendirilen hatta MIS-C hastalarındaki hipotansiyona katkı sağlayan antitelere biridir. Bu hastalarda artmış proinflamatuvar sitokin seviyeleri endotel hücrelerinin normal antitrombotik ve anti-inflamatuvar fonksiyonlarının kaybını indüklemeye önemli bir rol oynar. COVID-19 ile ilişkili koagülopatide vWF antijeni, faktör VIII ve P-selektin seviyelerinin arttığı, yani endotel hücrelerinin ve trombositlerin aktive olduğunu gösterir [64]. MIS-C vakalarında da arterit ve koroner arter hastalığı ile ilişkili moleküllerde yükselme olduğu tespit edilmiş ve kalp ve kan damarlarındaki yapısal proteinleri hedefleyen antikordarda da artış gösterilmiştir [31].

MIS-C'li vakaların şiddetli / kritik hastalık seyri olan COVID-19 vakalarına kıyasla daha sık plevral, perikardiyal ve pelvik efüzyonla seyretmeleri ve ciddi gastrointestinal sistem tutulumu ile birlikte albümin replasman tedavisine rağmen dirençli hipoalbüminemilerinin olması plevra, perikard ve periton boşlukları ve hatta mezenterik yatağa belirgin plazma sızıntısı olduğunu desteklemektedir. Ayrıca belirgin gastrointestinal bulgular nedeniyle ki özellikle vakalarda appendiks tutulumu olmaksızın sağ alt kadranda ağrısının belirgin olması MIS-C'de önemli bir ayırıcı bulgudur [40].

2.3.7. Tedavi

MIS-C'de tedavide amaçlanan, şok ve diğer yaşamı tehdit eden durum esnasında hastaları stabilize etmek ve koroner arter anevrizması, miyokardiyal fibroz/skarlaşma ve kardiyak iletim anormalliklerini içerebilecek uzun dönem sekelleri önlemektir. KH'de elde edilen tecrübe ve MIS-C'de yapılan çalışmalarla, hastalara belli bir nosyon dahilinde antiinflamatuvar ve immünmodülatör tedavi uygulamalarında başarı elde edilmiştir; fakat henüz standardize edilmiş bir tedavi protokolü yoktur [65].

Amerika Birleşik Devletleri'nin Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) rehberine göre tavsiye edilen tedaviler (*Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines*, n.d.) Tablo 2.4'te özetlenmiştir [66].

Tablo 2.4. Amerika Birleşik Devletleri'nin Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) güncel rehberine göre MIS-C'de tavsiye edilen tedaviler [66]

<p><i>Başlangıç immünmodülatör tedavi</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • IVIG 2 g/kg intravenöz (IV) (toplam doz maksimum 100 gr.) ile düşük veya orta doz metilprednizolon (1-2 mg/kg/gün) IV^a veya eşdeğer dozda başka bir glukokortikoid. • Glukokortikoid tekli tedavi, (IVIG kontrendike olduğunda ya da ulaşılmadığında) • IVIG tekli tedavi, (glukokortikoid kontrendike olduğunda).
<p><i>Yoğunlaştıran immünmodülatör tedavi</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • İlk immünmodülatör tedaviyi aldıktan sonra 24 saat içinde iyileşme görülmeyen refrakter MIS-C'li çocuklar için yoğunlaştırma tedavisi önerilir. Aşağıdakilerden herhangi biri kullanılabilir (alfabetik sıraya göre listelenmiştir): <ul style="list-style-type: none"> ○ Yüksek doz anakinra 5-10 mg/kg IV veya günde bir kez subkütan ○ Yüksek doz glukokortikoid^b (örn. metilprednizolon 10-30 mg/kg/gün IV veya eşdeğer glukokortikoid) ○ İnfliksimab^c 1 doz için 5-10 mg/kg IV
<p><i>Antitrombotik tedavi</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Düşük doz aspirin (3-5 mg/kg/gün, maksimum 81 mg/gün doza kadar) PO, Kanama için risk faktörü olmayan tüm hastalarda • Aşağıdaki klinik senaryolardan 1'ine giren hastalar için antikoagülasyon: <ul style="list-style-type: none"> ○ AHA'nın KH kılavuzlarına göre büyük KAA'ları olan hastalar için terapötik antikoagülasyon. ○ Kanama için risk faktörü olmayan orta ila şiddetli LV disfonksiyonu olan hastalar için terapötik antikoagülasyon. ○ Büyük KAA'ları veya orta ila şiddetli LV disfonksiyonu olmayan MIS-C hastaları için tromboz ve kanama için risk faktörlerini göz önünde bulundurarak profilaktik veya terapötik antikoagülasyonu hasta bazında değerlendirin.
<p>^a Tedavi süresi değişebilir.</p> <p>^b Şiddetli hastalığı olan bazı hastalarda, yoğunlaştıran immünmodülatör tedavi daha yüksek doz glukokortikoidler ve infliksimab veya anakinra ile ikili tedaviyi içerebilir. Anakinra ve infliksimab birlikte verilmemelidir.</p> <p>^c İnfliksimab makrofaj aktivasyon sendromu olan hastalarda kullanılmamalıdır.</p>

Tablo 2.4'te özetlenen tedavi rehberinden de anlaşılacağı üzere çoğu hasta, otoantikorların etkinliğini azaltmak ve inhibitör Fc-reseptörlerini uyarmak için intravenöz immünglobulinler (IVIG) ile kombinasyon halinde yüksek doz steroidlerle (metilprednizolon) tedavi edilmektedir. Bazı çocuklara ayrıca IL-1 α / β

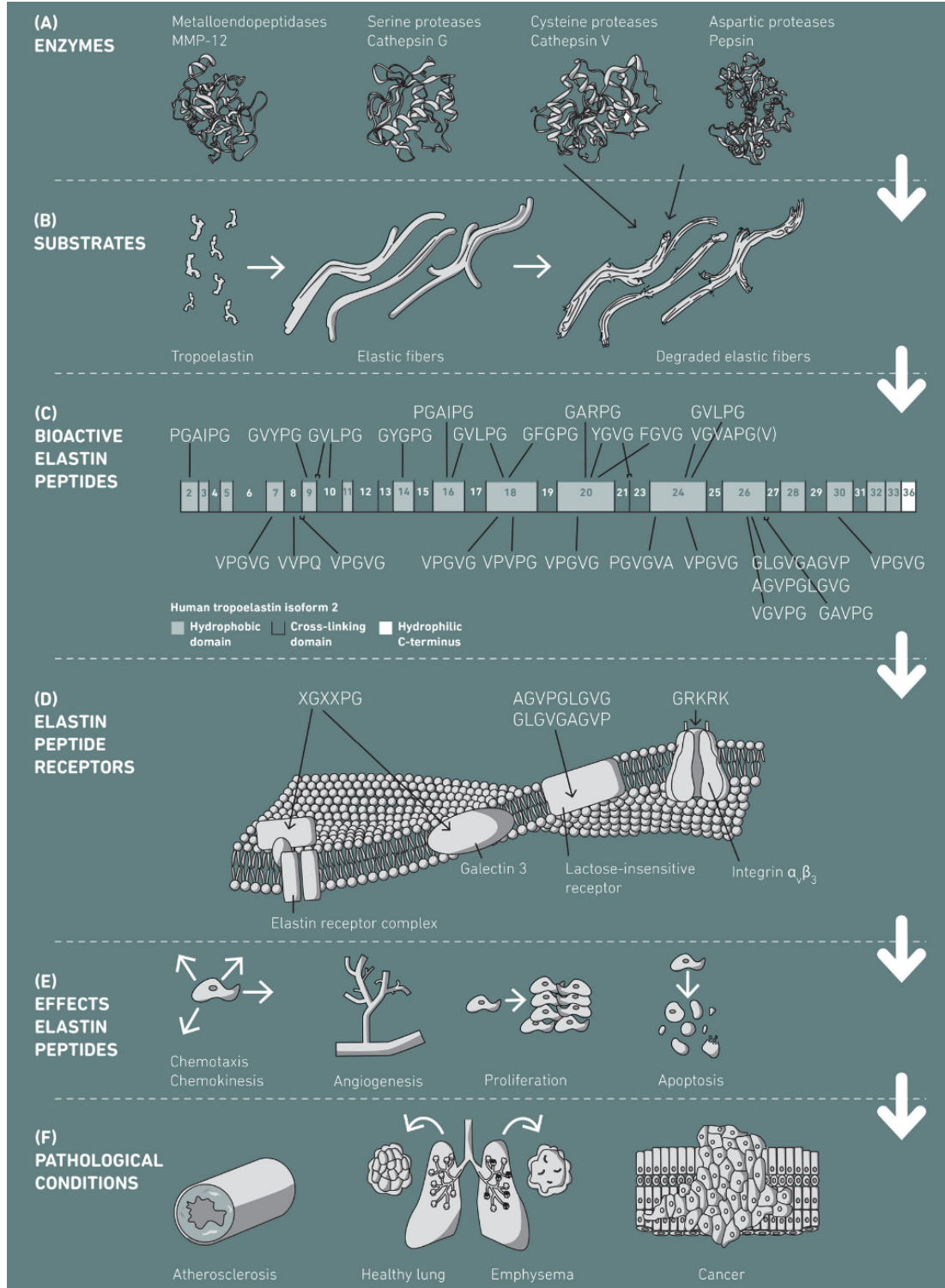
aracılı inflamasyon yanıtını bloke etmek için rekombinant IL-1RA (anakinra) verilmektedir. COVID-19 tedavisine benzer şekilde komplikasyonlardan korunmak için antiplatelet ve antikoagülan tedaviler de önerilmektedir [65].

2.4. Elastin Türevi Peptitler (EDP)

Ekstraselüler matriks (ESM), çeşitli proteinler, heparan sülfat ve polimerik oligosakkaridler gibi proteoglikanlar ve sudan oluşur. Çok çeşitli proteinlerin yanı sıra en önemli yapı bileşeni olarak kollajenler ve elastin öne çıkar. Kollajen ESM'ye direnç (mukamevet) kazandırırken; elastin elastikiyet sağlar. Elastin akciğerde, damarda ve deride çok miktarda bulunur. Endotel hücreler ve fibroblastlar elastin sentezini gerçekleştirir [67]. Elastin biyosentezi fetal dönemde başlar ve doğuma kadar en yüksek sentez hızına ulaşır, doğumdan sonra yavaş yavaş azalarak puberte ile sonlanır. D-aspartat birikimi ile ölçülen metabolik stabilitesine göre elastinin yarılanma ömrü yaklaşık 70 yıl kadardır [68].

Elastin sentezi yedinci kromozomdaki ELN geninin translasyonu ile prokürsörü olan tropoelastinin sentezlenmesiyle başlar. Sentez kodonunu taşıyan mRNA'lar düz endoplazmik retikulum (dER) translasyonu gerçekleştirilerek sentezlenir. Elastin glisin, alanin, valin ve prolin gibi dört hidrofobik aminoasitten çok zengindir. dER'deki transferi esnasında 26 aminoasitten oluşan N-terminal sinyal sekansı tropoelastinden ayrılır. Beta-galaktozidazın birleşme yeri (*splice*) varyantı olan elastin bağlayan protein (EBP) ve tropoelastin (TE) beraber golgi aygıtından hücre zarına gelerek oradan ekstraselüler alana sentez edilir. EBP tropoelastin için şaperon görevi görür ve koaservasyondan ve degrades olmasından korur [69]. Tropoelastinin hizalanması ve ardından çapraz bağlanması lizil oksidaz (LOX) aracılığıyla iskele yapısı oluşturur ve oluşanlar mikrofibril olarak adlandırılır. Tropoelastin ile ekstraselüler Ca^{++} bağımlı amin oksidaz LOX arasındaki ilişkiye aracılık eden fibulin-4 ve fibulin-5'dir [70]. Elastinin çözünmez ve amorf yapısı fibrillinden zengin mikrofibrillerle çevrilidir ve elastik fiberler olarak adlandırılır.

Elastinler hücrede ERC, galektin 3, integrin, $\alpha_v\beta_3$, laktoz-duyarsız reseptör gibi reseptörlere hücre zarında bağlanır. EBP ile etkileşime girebildiğinden (X)GXXPG motifi içeren EDP'ler biyolojik olarak aktif olup elastokin olarak da adlandırılırlar [70, 71] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Elastogenesis ve vücutta bioaktivitesinin özeti [70]

LOX ve LOX-benzeri proteinler, TE'nin ve kollajen fibrillerin çapraz bağlanmasını başlatır ve olgun elastik fiberlerin oluşmasını sağlar [72]. Büyümede,

doku tamirinde ve yeniden yapılanmada (*remodelling*) düzeyleri değişir [67]. ECM proteinleri, inhibitörler ve prostoglandinler tarafından kontrol edilebilirler [73].

Elastin reseptör kompleksi (ERC), lizozomal β -galaktozidaz kompleksinden elde edilmiştir ve 67kDa'lık EBP, 55 kDa'lık koruyucu protein katepsin A (PPCA) ve transmembran sialidaz yapıda 61 kDa'lık Nörominidaz-1 (Neu-1)'den oluşur [67, 69]. EBP iki tane fonksiyonel bağlanma bölgesine sahiptir ki ilki elastinin bağlandığı bölgedir ve intraselüler sinyalizasyonu tetikler. İkincisiyse galaktolektin bölgesi olup elastokin bağlanmasının antagonistidir; yani bir başka deyişle galaktoz içeren şekerlerin bağlanması ile yapıyı inaktive eder [74]. Ekstraselüler alanda EBP-TE kompleksi elastin reseptör kompleksine (ERC) bağlanarak PPCA ve Neu-1 ile ERC yapısı tamamlanır ve Neu-1'in transmembran sialidaz aktivitesi artarak mikrofibrillerin de-sialilasyonuna neden olur. Bu süreç, EBP'yi galaktolektin bölgesine bağlayan galakto-şekerlerin galaktozil kısmını açığa çıkararak tropoelastinin salınmasına ve ERC'nin de dağılmasına neden olur [68, 69, 74]

Elastik fiberler degradasyona hayli dirençli olsa da yaşlanmayla ya da amfizem, ateroskleroz ve anevrizma gibi hastalık durumlarında matriks metalloproteinazlar, serin proteazlar ve sistein proteazlar elastik fiberlerin aktive olmasıyla yıkılırlar ve EDP'ler oluşur. ERC'ler hem elastogenezis de hem de degradasyon sonucu oluşan EDP'ler için reseptör görevi görür [75].

EDP'nin EBP'ye bağlanması ile hücre içi sinyal yolları devreye girer. Bu uyarı ile GM3 [N-asetilnöraminik-a-(2-3)-galaktozil-b-(1-4)-glukozil-(1-10)-seramid] gangliosid I'in ERC sinyal yollarının ikinci habercisi olan laktozilseramide lokal dönüşümünü katalize eden Neu-1 aktivasyonu indüklenir ve fibroblastlarda MEK1/2/ERK1/2 yolu, endotel hücrelerinde MAPK sinyalinin ERK1/2 aktivasyonunda yer alan bir PI3K- γ /Akt/endotelial nitrik oksit (NO) sentaz/NO/protein kinaz G modülü, düz kas hücrelerinde ise kalsiyum L-Tipi kanallarının açılmasıyla eşzamanlı olarak Gi proteinlerinin aktivasyonu sağlar [75].

Yaşlanma ve bazı patolojik durumlarda ekstraselüler matriksin yeniden yapılanma sürecinde, bileşenlerini oluşturan proteinlerin fragmentasyonlarından oluşan kısa peptid sekanslarına matrikin denir. Matrikinler doğal ve kriptomatik olmak üzere ikiye ayrılırlar. "Doğal" matrikinler, ECM'nin proteolitik aktiviteye

uğramadan önceki halini ifade ederken; "kriptik" matrikinler (matrikriptinler) ise pasif yapıdaki ECM proteinlerinin proteolitik enzimlere maruziyetiyle yapısal ve konformasyonel değişikliklere uğrayarak ana proteinden ayrılan ve biyolojik etkileri olan ligandlardır. Matrikinler, hücrel sinyalizasyonda haberci moleküller olarak rol oynarlar. Elastokin denilince matriks proteinlerinin sitokin benzeri özellik gösteren fragmanları anlaşılır ve matrikin ailesinden kabul edilir [76, 77].

2.4.1. EDP'lerin Kardiyovasküler Hastalıklardaki Yeri

Elastokinler kemotaksis, proliferasyon, proteaz sentezi, iyon hareketleri, migrasyon ve invazyon gibi hücrel aktivitelerde rol almaktadırlar. Bu yüzden de inflamatuvar yanıt oluşmasında önemli bir yeri vardır ve kanser, diyabet, ateroskleroz, anevrizma, tromboz, karaciğer yağlanması gibi hastalık durumlarının patogeneğinde yeri gösterilmiştir [78].

EBP'nin kapa-elastin ve VGVAPG motifli EDP'lerin vasküler endotel hücreler üzerindeki etkisiyle, pro-MT1-MMP ve pro-MMP-2 yukarı (*up*) regülasyonu ile ilişkilendirilen ve aterosklerotik abdominal aort anevrizmasının ilerlemesinde rol oynayabilecek neoanjiyogenezi tetiklediğini göstermiştir. Robinet ve arkadaşları, EBP aracılı NO üretimi yoluyla MT1-MMP ekspresyonunu indükleyen VGVAPG heksapeptidi kullanılarak EDP'lerin anjiyogenik etkilerini doğrulamıştır [79].

Fare deneyleri de göstermiştir ki; EDP'lerin en sık tekrar motifi olan VGVAPG heksapeptidlerin veya doğrudan elastazın uygulaması elastik fiberlerdeki yeniden yapılanmaya öncülük etmekte ve adventisyal anjiyogenezi de indüklemektedir [80]. Ayrıca EDP'ler, kandaki düzeyleri artınca insan umbilikal venöz endotel hücrelerinde (HUVEC) düşük özgüllüklü kalsiyum kanallarını aktive ederek Ca^{++} konsantrasyonunun artmasına neden olur. Ca^{++} 'daki bu değişiklik endotel ilişkili vazodilatasyona neden olur [81].

Ateroskleroz, büyük ve orta çaplı arterlerde lipidden oluşan kalsifiye bölgeler barındıran ve endotel hücrelerini ve vasküler düz kas hücrelerinin de inflamatuvar sürece dahil olduğu plaklarla karakterize bir hastalıktır. ECM'nin yapısını oluşturan proteinlerdeki sentez ve yıkım süreçleri arasındaki bozulan denge, ateroskleroz gelişiminin bir parçasıdır. Hasarlı ve dejenere elastik fiberler onarılamazlar ve

ECM'deki kollajen ve proteoglikanların yerini alarak damar sertliğine katkıda bulunur. Fiberlerin yıkımında görev alan elastinolizisten sorumlu metalloproteinazlar (MMP-1, 2, 3, 7, 9, 12, 13 ve 14) fibröz plakların bozunmasında rol oynayarak plak rüptürüne ve iskemik olaylara yol açar. MMP'lerden 2 ve 9 ayrıca düz kas hücrelerinin migrasyonu ve çoğalmasını indüklerken endotel hücrelerine tutunan monositler ve T-lenfositler, MMP-9 ve MMP-2 üretimini yeniden spesifik olarak artırır. Monosit ve T hücrelerin endotel hücrelerinden içeri girebilmesi, endotellerin bazal membranının bozulması ve geçirgenliğinin artması ile ilişkilidir. Bazal membranın geçirgenliğinin artması lipoproteinlerin de içerisinde olduğu plazma içeriğinin tunika mediaya kadar ilerlemesine sebep olur ve plak formasyonu inflamatuvar hücrelerin ve yağ hücrelerinin biriktiği bir hale bürünür. Düz kas hücresi, elastin metabolizması büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından düzenlenir. Örneğin TGF- β ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1 elastin sentezini indüklerken epidermal büyüme faktörü (EGF) inhibe etmektedir [82]. MMP'lerin bir yandan da elastin yıkımını gerçekleştirdiği ve aterom oluşumu sırasında işlevsiz elastogenezin meydana geldiği ve fonksiyonel elastik liflere çapraz bağlanamayan TE plakların da oluştuğu, bu TE'lerin degrade olmasıyla da ortaya çıkan EDP'lerin ateroskleroz oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir [83].

Elastin yıkımında görevli olan enzimlerin aktivasyonundaki artış aorta gibi en kalın tabakası tunika medianın zengin bir elastik fiber ağından oluşması nedeniyle, damar duvarında zayıflamaya ve elastik özelliğini yitirmeye neden olur [84]. Bu aterosklerozun yanında KH'de görülen anevrizmaların patofizyolojisinde de raporlanmıştır [85]. Elastik fiberlerin hasarından sonra vasküler ECM'nin yeniden yapılanmasında, organize olmayan kollajen liflerin ve proteoglikanların birikmesi esnekliğini kaybeden arteriyel duvarın sertleşmesine neden olarak hipertansiyon ile sonuçlanmaktadır.. Sonrasında meydana gelen aortik dilatasyon ve rüptür, elastin yıkımının hipertansiyonla şiddetlendiği en ağır komplikasyondur [86].

2.5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve Optimizasyonu

ELISA tıpta antijen ya da antikorların tayininde sıklıkla kullanılan duyarlı bir yöntemdir. Herhangi bir antijen ya da antikoru (analit) bir vücut sıvısında varlığını göstermek (kalitatif) ya da miktarını özgül olarak belirlemek (kantitatif) için

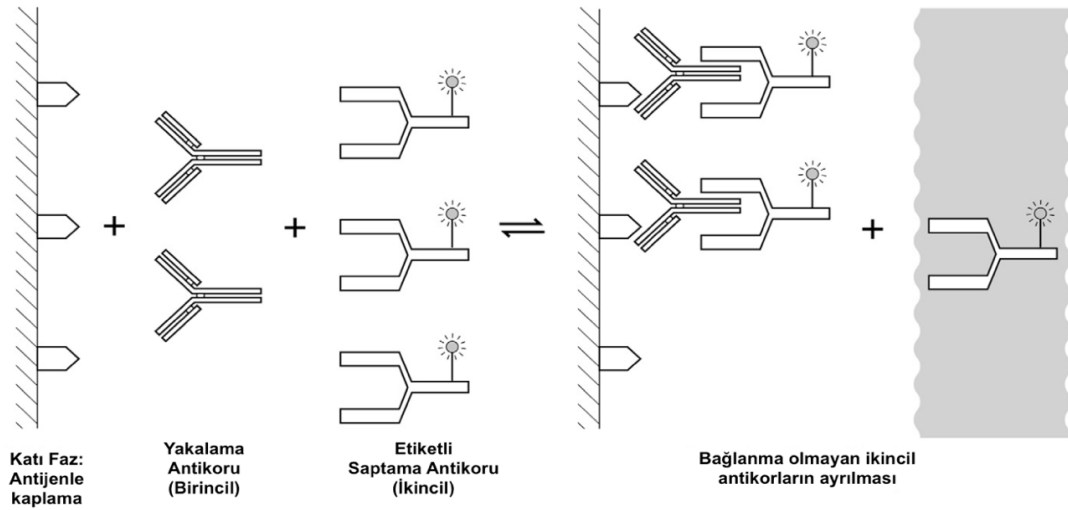
enzimlerden faydalanılarak 1971 yılında Engvall ve Perlmann tarafından geliştirilmiştir [87].ELISA'nın temel olarak dört çeşidi vardır: direkt, indirekt, sandviç ve yarışmalı ELISA. Genellikle analiti tespit etmek için özel geliştirilmiş antikora bağlı enzimlerin çalışmasıyla oluşan renk değişikliğinin spektrofotometre ile ölçülmesi (kolorometrik) esasına dayanır.

Direkt ELISA: antijen kuyucuğa tutturulduktan sonra bir enzim işaretli antikor ile muamele edilerek antijenlerin tespit edilmesi sağlanır.

İndirekt ELISA: Bu reaksiyonda birincil ve ikincil iki antikor kullanılır. Birincil antikor antijene özgül olup, ikincil antikor birincile özgüldür, bu sayede birincil antikor antijene bağlandıktan sonra eklenen ikincil antikor birincile bağlanır. İkincil antikorlar genellikle biotinle işaretlidir.

Sandviç ELISA: Kuyucuklara antikor tutturulup antijenler eklenerek bu antikora bağlanması beklenir; sonrasında bu antijene özgü enzim ile işaretli enzim eklenerek tespit edilmesi sağlanır. Antijen iki antikor arasında kaldığı için sandviç ELISA denilir. Sandviç ELISA direkt ve indirekt olabilir. Genellikle yüksek duyarlılık sağladığı için ticari kitler sandviç ELISA yöntemiyle hazırlanır.

Yarışmalı ELISA: ELISA'da her zaman belli bir antijene özgül bağlanabilen bir antikor olmalıdır. Analiti doğrudan tanıyacak ya da analite bağlanmış bir antikoru dolaylı tanıyacak belirleyici enzimler kullanılır. En sık kullanılan enzimler yabancu peroksidazı (*horseradish peroxidase*) ve alkalin fosfat, P-galaktozidaz, asetilkolin esteraz ve katalazdır. Enzime uygun kullanılan substratlarla enzimin aktivasyonu gerçekleşir ve genellikle substrattaki renk değişimini tespit edebilen bir okuyucu cihazla nanometre bazında ölçüm yapılır. Her bir basamaktan sonra deterjan içeren bir yıkama solüsyonu ile kuyucuklar yıkanır (Şekil 2.3) [88, 89].



Şekil 2.3. Yarışmalı ELISA'nın basit şeması (The Immunoassay Handbook,2013 kitabından Türkçeleştirilerek alıntılanmıştır). [89]

2.5.1. Kıta Faz

ELISA kapları genellikle 96 ya da 384 kuyucuktan oluşur ve bu kuyucuklar polisitren yapıda olup kıta fazda antijenler ya da antikorlar bu kuyucuklara belirli bir inkübasyon periyodunda tutturularak kaplanır. Polisitren malzeme ucuz, transparan ve hidrofilik yapıda olup proteinlerin bağlanması için uygun bir zemin oluşturur. Genel bir kural olarak, antikor kaplamalarında yaklaşık $0,5-1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ IgG bağlanmasını sağlayacak konsantrasyonların optimizasyonu yapılmalıdır. Kaplanacak antijenin veya antikorun yüksek saflıkta (*purity*) olması, kaplama verimliliğinin yanı sıra deneyin özgüllüğünü de artıracaktır. Kaplama sırasında bağlanan moleküllerin difüzyon katsayısı, adsorbsiyonu sağlayacak çözeltinin pH'sı, sıcaklığı ve kaplama zamanı ve kaplanan yüzey alanının antikorun hacmine oranına dikkat edilir. Kaplama için protein konsantrasyonu aralığı genellikle $1-10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ve $50-100\ \mu\text{L}$ hacim (kuyucağına göre değişebilir) arasındadır. Kaplama sıcaklığı genellikle ya $1-3$ saat boyunca $37\ ^\circ\text{C}$ ya da oda sıcaklığında ya da gece boyunca $4\ ^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon ile gerçekleştirilir. Sıcaklığın artırılması inkübasyon süresini kısaltabilir, ancak bazı antijenler daha yüksek sıcaklıklarda kararsızdır [89].

Kaplama çözeltisi olarak sıklıkla 50 mM karbonat, pH 9,6, 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 veya 10 mM fosfat tamponlu salin, pH 7,2 tampon olarak kullanılmaktadır[90].

Hedef biyomoleküller: Antikor, DNA'lar, RNA'lar, hormonlar, tümör biyobelirteçleri, enfeksiyöz ajanlar, allerjenler tespit edilebilir [88].

Yıkama solüsyonu (tamponu): Kurulması istenen antijen antikor arasındaki istenen non-kovalent bağların haricindeki diğer bağlanmalardan analiti kurtarmak üzere hemen her basamaktan sonra yıkama işlemi gerçekleştirilir. Bunun için de yıkama solüsyonunda biyomolekülleri denatüre etmeyecek kadar deterjan kullanımı önemlidir. Sıklıkla fosfat tamponlu salin (PBS) ve Twinn-20 içeren deterjanlı yıkama solüsyonları kullanılır [90].

Bloklama Ajanı: Duyarlı ve özgül olmayan bağlanmaların önüne geçmek için katı fazdan sonra bloklama yapmak gerekir. Genellikle sığır serum albümini [91], kazein, yağsız süt, balık jelatini gibi ajanlar kullanılır [92].

2.5.2. Antikor Çiftleri

Dolaylı/İndirekt ELISA'da iki tip antikor kullanılır. Yakalama antikoru (*capture antibody*) yani birincil antikorlar (pAb) tespit edilmesi arzu edilen antijene özgül olup, ikisi arasındaki afinite genellikle ELISA hassasiyetini belirleyen ilişkidir. *Tespit antikoru (detection antibody)* yani ikincil antikorlar (sAb) ise antijene özgül olmayan ama yapısal herhangi bir potansiyel çapraz reaksiyona sebebiyet vermeyecek derecede birincil antikor ile birbirlerine bağlanabilen antikorlardır [88, 89].

Sandviç ELISA sistemlerinde katı fazda kaplama işlemi için yakalama antikoru sonra da saptama antikorları olarak monoklonal veya poliklonal kullanılabilir. Birincil antikorlar genellikle daha fazla epitopu olduğu için antijeninin mümkün olduğunca çoğunu yakalayabilme yeteneği sergileyebileceğinden yakalama antikoru olarak kullanılır. Fakat bu özelliği özgül olmayan bağlanmalara da neden olacağı için ELISA hesaplamalarında bu dikkate alınmalıdır. Ardından, özgüllük sağlamak için de tespit antikoru olarak bir monoklonal antikor kullanılır. Doğru

antikor çiftini bulmak ve her bir antikorun rolünü seçmek, ELISA geliştirmede kritik bir erken adımdır [89].

Antikor çiftinin seçimi, tespit edilecek antijene ve antijen üzerindeki farklı epitoplara yönelik antikorlara bağlı olmalıdır. Bu amaçla çok sayıda monoklonal antikor ve poliklonal antikor ticari olarak mevcuttur. Birçok etiketli ikincil antikor da ticari olarak mevcuttur. Hassasiyeti artıran bir diğer unsur da, etiketli ikincil antikorlara bağlanması için seçilen birincil antikorların birden fazla epitop taşımasıdır [88].

En sık kullanılan enzimler yabancu peroksidazı ve alkalin fosfatase olmakla beraber P-galaktozidaz, asetilkolin esterase ve katalaz da kullanılabilir. ELISA'yı bir enzim konjugatı ile gerçekleştirmek için çok çeşitli substratlar mevcuttur. Substrat seçimi, gerekli hassasiyet seviyesine ve tespit için laboratuvarında mevcut olan ekipmana bağlıdır. Etiketleme ise, analiti substrat varlığında tespit için sinyal üretebilen bir enzime ve yakalanan analiti ölçmek için ilgili sisteme konjuge edilmesi işlemidir [88].

HRP, ELISA'da antikorlara konjuge edilen en yaygın kullanılan enzimdir. Hedef moleküle konjugasyon için dört lizin kalıntısı içeren 44 kDa'lık bir glikoproteindir. Uygun substrat ile inkübe edildiğinde renkli, florimetrik veya lüminesan bir türev üretebilir. HRP için tetrametilbenzidin (TMB), 3,3'-diaminobenzidine (DAB), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) en sık kullanılan substratlardır [89, 92]

2.5.3. Yarışmalı ELISA

Bu teknikte antikor önce antijen içeren bir numune ile çözelti içinde inkübe edilir. Antijen-antikor karışımı daha sonra hedef antijenle önceden kaplanmış bir plakanın kuyucuklarına eklenir. İlk çözelti fazındaki numunede ne kadar çok antijen varsa antijen kaplı kuyucuğa bağlanmak için o kadar az serbest antikor bulunacaktır. Bağlanmamış birincil antikorlar yıkandıktan sonra kuyucuğun duvarlarına tutturulan antijenlere bağlanan birincil antikor miktarını belirlemek için birincil antikorun izotipine özgü enzimle konjuge edilmiş bir ikincil antikor eklenir. Yarışmalı testte, orijinal numunedeki antijen konsantrasyonu ne kadar yüksekse, kolorimetrik olarak alınacak sinyal o kadar düşük olur. Bu tahlil diğerlerine nazaran uzundur; bununla

birlikte, ham veya saf olmayan örneklerdeki antijenleri yakalamada yüksek derecede özgüllük imkânı sunar [93].

2.5.3.1. Validasyon (Doğrulama)

Analitleri ölçmeden önce her biyoanalitik yöntem için bir doğrulama prosedürü uygulamak önemlidir. Ölçümlerin tutarlı ve yeterli doğruluk düzeyinde olmasını sağlamak için, yöntem bütünlüğü ve güvenilirliğinin değerlendirilmesine olanak tanıyan çeşitli kılavuzlar ve kriterler mevcuttur.

- Duyarlılık (*sensitivity*) ve özgüllük (*specificity*)

İki tür duyarlılık ve özgüllük vardır: analitik ve klinik duyarlılık ve özgüllük. Analitik değerlendirme esas olarak yeni bir tahlil veya protokol geliştirilirken uygulanabilir. Yeni bir yöntemin hastanelerde ve kliniklerde güvenilir bir teknik olarak uygulanma olasılığını değerlendirir [94].

Analitik duyarlılığı değerlendirmek için hedeflenen bir analitin en düşük miktarını temsil eden tespit limiti [95], formüle göre LOD'ye yaklaşan seviyelerde eğrinin yanıtının standart sapmasına (S_y) ve kalibrasyon eğrisinin eğimine (S) dayalı olarak hesaplanabilir: $LOD = 3.3 (S_y/S)$ [96].

Klinik duyarlılık, bir tanı testi tarafından doğru şekilde tanımlanan gerçek pozitiflerin (GP) oranının bir ölçüsüdür ve hastalığı veya durumu tespit etmedeki yeterliliğini gösterir.

Duyarlılık = $GP/(GP + YN)$ = (Gerçek pozitif değerlendirme sayısı)/(Tüm pozitif değerlendirme sayısı)

Tespit edilmesi hedeflenen molekül, kalite kontrol numunelerinde ölçülebilmelidir. Analitik özgüllüğü değerlendirmek için *Spiking/Recovery* analizlerinde, bir numuneye önceden belirlenmiş miktarda rekombinant protein eklenir (veya "*spike*" edilir) ve daha sonra ELISA kullanılarak konsantrasyonu ölçülür. Analizden elde edilen ve "geri kazanım [97]" olarak bilinen spike edilmiş materyalin konsantrasyonu, beklenen değer doğru bir şekilde ölçülüp ölçülemeyeceğini gösterir. Kalite kontrol numuneleri ile elde edilen sonuçların kabul edilmesindeki kriter ölçülen değer nominal değerden %20'den fazla sapma göstermemesidir.

Öte yandan klinik özgüllük, bir tanı testi tarafından doğru şekilde tanımlanan gerçek negatiflerin (TN) oranının bir ölçüsüdür. Test ile gerçekte hasta olmayan bireylerin ne kadar doğru oranda tespit edilebildiği, böylece testin normal (negatif) durumları ne kadar iyi tanımlayabildiği ortaya konulur. Yüksek bir özgüllük değeri, testin hastalığı olmayan bireylerde hastalığı doğru bir şekilde ekarte etmede iyi olduğunu gösterir [98].

Özgüllük = $GN/(GN + YP) = (\text{Gerçek negatif değerlendirme sayısı})/(\text{Tüm negatif değerlendirme sayısı})$

- Doğrusallık (*Linearity/parallelism*)

Bir ELISA'nın doğrusallığı dilüe edilen saf numunenin (*neat*) dilüsyonlarında aynı oranda konsantrasyonun azalması ile ölçülür. Doğrusallık spiking ile değerlendiriliyorsa; dilüsyonel doğrusallık, tespit üst limitinden daha fazla tespit analiti ile spike edilmiş numune matrislerinin, standart eğri aralıkları içinde dilüsyondan sonra hala güvenilir miktar tayini sağlayıp sağlayamayacağını belirleyen bir ölçüdür. Numunelerden elde edilen değerler %20 eşik değerinin içinde kalan kabul aralığı (geri kazanımın %80-120 aralığında) olması dahilinde güvenilir kabul edilebilir [98].

- Kesinlik

Tekrarlanabilirliği tanımlamak üzere en yaygın olarak yüzde cinsinden tahlil içi değişkenlik katsayısı (*Intra-Assay CV*) ve tahliller arası (*Inter-Assay CV*) olarak adlandırılan iki hesaplama kullanılır. CV değeri bir plakanın tek bir çalışmasında kuyular arasında hesaplandığında, tahlil içi değişkenliği gösterir. Tersine, CV değeri çalışmalar/denemeler arasında veya plakadan plakaya belirlendiğinde, testler arası değişkenliği temsil eder. Genellikle *intra-assay CV* %10'un altında ve *inter-assay CV* 'nin %15'in altında olması yeterli kabul edilir. Bu değerler kabul edilebilir değişkenlik seviyelerini gösterir ve farklı deneysel çalışmalar arasında tutarlı sonuçları ortaya koyar [94, 98].

2.5.4. Elastin Düzeyini Ölçen Ticari ELISA Kitleri

ELISA ile elastin düzeyini ölçmek için biyoteknoloji firmaları tarafından üretilmiş ticari kitler ve laboratuvarlarda belli materyalleri sağladıktan sonra ölçüm yapabilecek manuel yöntemler mevcuttur. Ticari elastin kitleri genel olarak sandviç ELISA yöntemini kullanır. Bu kitlerin değerlendirme aralığı dar, düşük linearite ve özgülüğe sahiptirler. Ayrıca ticari kitlerin önceden kaplanmış plakalarla *pre-coated* olarak satışı yapılmakta ve kataloglarında katı fazda kaplama için kullandıkları elastinin türü ve yakalama antikoru olarak kullanılan antikorun hangi elastin fragmentasyonunu yakaladığı bilgisi yoktur. Ayrıca elastin kitlerinde genellikle çapraz bağlanma testlerinin verisi de bulunmamaktadır. Elastinin deride, akciğerde ve arterlerde üretildiği göz önüne alınırsa, elastin kitlerinin KH ve MIS-C gibi birden fazla sistemi tutan hastalıklarda arzulanan kardiyak etkilenmenin elastin derecesini belirlemede yetersiz kalabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Literatürde de henüz MIS-C ve KH'li hastalarda bu kitlerle yapılmış bir çalışma yoktur. Bu yüzden hipotezimizdeki hedefleri karşılayabilen yeterince duyarlı bir yöntem ve çalışma örneği bulunmamaktadır.

Bettina Camara (MsC) tarafından daha önce The Hospital For Sick Children Yeung Lab'da bu ticari elastin kitlerinin etkinliği değerlendirilmiştir. LSBio (LS-F34606), Biomatik (EKU03852), AVIVA Biosciences (OKCD07333), Abcam (ab239433) ve Elabscience (E- EL-H1163) karşılaştırmasında kitlerin ölçtüğü değerler farklılık göstermiş ve kullanılan dört hasta örneğinin EDP düzeyleri her kit kendi içinde değerlendirildiğinde dahi farklı olduğu görülmüştür. Ayrıca Abcam (ab239433) dışında diğer kitlerde linearite oldukça zayıftır (*yayınlanmamış veri*).

Literatürde elastini tespit eden üç tane yarışmalı ELISA protokolü tanımlanmıştır. Birbirine çok benzeyen bu yarışmalı ELISA protokollerinin özeti Tablo 5'de verilmiştir [99-101].

Tablo 2.5. Literatürdeki elastin tespiti için tanımlanmış yarışmalı ELISA protokolleri

Deneylerde kullanılanlar ve basamakları	Hong VJ, 2012[99]	Petersen E, 2001 [100]	Sivaprasad S,2005[101]
Kaplama solüsyonu	150 µL α-elastin (1 µg/mL)	100 ml α-elastin (1.25 mg/ml)	150 µL α-elastin (1.25 µg/mL)
Kaplama inkübasyonu	Oda sıcaklığında 120 dk	4°C'de 12 saat	4°C'de 12 saat
Bloklama	Kullanılmamış	Kullanılmamış	Kullanılmamış
Deney tamponu	PBST TW %0.05- BSA %3	PBST TW %0,05- BSA %7	PBST TW %0,05- BSA %7
Standardın seri dilüsyon faktörü ve alt-üst sınırı	Bilgi yok (0-1000 ng/mL)	Bilgi yok (0-120 ng/ml)	Bilgi yok (0-100 ng/ mL)
Numune/standart dilüsyonu ve hacmi	Bilgi yok / Bilgi yok	Bilgi yok / 200ul	Bilgi yok / 150ul
Yarışma inkübasyonu (Tüpte)	37°C'de 90 dakika	4°C'de 36 saat	4°C'de gece boyu
Birincil antikor dilüsyonu	Anti-α-elastin antikor (1:3,000)	Anti-α-elastin antikor (2 mg/ml)	Anti-α-elastin antikor (1:1,000)
Yarışma inkübasyonu (plakada)	37°C'de 60 dk	Oda sıcaklığında 60 dk	Oda sıcaklığında 60 dk
İkincil antikor inkübasyonu	goat anti-rabbit HRP IgG	donkey-anti-rabbit HRP IgG (1:4000)	goat anti-rabbit HRP IgG (1:2000)
Saptama inkübasyonu	Oda sıcaklığında 20 dk	Oda sıcaklığında 60 dk	Oda sıcaklığında 60 dk
Substrat (konjugat reaksiyonu) ve okunması	ABTS (30 dk) 405nm	OPD (20 dk) 492nm	ABTS (60 dk) 495nm

2.5.5. Araştırmanın Gerçekleştirildiği Laboratuvarın Önceki Çalışmaları

Anevrizma oluşumunda rol oynayan ECM yıkımında görevli proteaz ailelerinden biri de MMP'lerdir. Özellikle MMP-2 ve MMP-9 elastolitik aktiviteye sahip proteazlardır ve ölümcül KH vakalarından koroner arter anevrizmalarında aktiviteleri gösterilmiştir. Elastolitik MMP'lerin sistemik ve lokal olarak koroner damarlarda üretimi ve aktivitesi arasındaki ilişki bilinmediğinden, Yeung Laboratuvarı'ndan Andrew Lau, dolaşımdaki MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri ile KH'li çocuklarda koroner arter anevrizmalarının gelişimi arasındaki ilişkiyi araştırmıştır.

Bu çalışmada, *Lactobasillus casei*'ye bağlı koroner arter anevrizması modelinde (LCWE) MMP-9 etkilenen koronerlerde yükselmiş olsa da, MMP-9'un dolaşımdaki seviyeleri ile etkilenen koronerlerdeki enzimatik aktivite arasında bir korelasyon bulunamamıştır (Lau et al., 2008). Dolaşımdaki periferik kan protein seviyeleri ve bunlara karşılık gelen enzimatik aktivitenin koroner arter hasarı ile ilişkisi gösterilemediğinden, daha sonra Alicia Fisch, ECM'de MMP-9 aktivitesinin up-regülasyonunun bir sonucu olan ve damar duvarının zayıflaması ve anevrizma oluşumuyla sonuçlanan elastin yıkımına odaklanmıştır. Dr. Fisch, EDP'lerin in vitro biyoaktif olduğunu ve hem bir fare (MOVAS) hem de insan aortik düz kas hücre hattında ERK fosforilasyonunu, M[102]MP-9 ekspresyonunu ve hücre göçünü indüklediğini göstermiştir. Ayrıca, EDP sinyalizasyonu ve hücre fonksiyonlar galaktoz varlığında engellendiği ve galaktozların in vivo olarak uygulanması hastalık şiddetini hafiflettiği, koroner arterit şiddetinin azalmasına ve LCWE KH modelinde EDP'lerin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bir yandan da Dr. Vahid Kloajje, koroner arter anevrizması olmayan 25 KH'li çocuğun ticari elastin Kitleri ile EDP düzeylerinde febril kontrollere göre akut dönemde 5 kattan daha fazla artış olduğunu ve anlamlı bir fark yarattığını ($p=0.0091$) göstermiştir (*yayınlanmamış veri*). Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar KH'nin immünopatogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamakta, EDP'leri hastalığın potansiyel bir biyobelirteci olarak tanımlamakta ve KH tedavisi için potansiyel terapötik yaklaşımlar ve hedefler hakkında fikir vermektedir.

2.6. Çalışmanın Gereçesi (Rationale)

Hedefler

1. EDP'nin güvenilir bir yeni ELISA protokolü ile tespiti ve serum ve plazmadaki düzeyinin ölçülebilmesi
2. MIS-C tanılı çocukların demografik ve klinik özelliklerinin belirlenmesi
3. MIS-C tanılı çocukların hastaneye yatışındaki tedavi öncesi, tedavi esnası ve ayaktan takiplerindeki EDP düzeyinin belirlenmesi
4. Sağlıklı çocuklarda yaşa göre serum EDP konsantrasyonunun belirlenmesi

5. Ağır SARS-CoV-2 pnömonili çocuklarda serum EDP konsantrasyonunun belirlenmesi
6. EDP düzeyinin MIS-C'nin kardiyovasküler tutulumunda ve hastalık ciddiyeti ile ilişkilendirilmesi
7. EDP'nin MIS-C tanı ve takibinde kullanımının duyarlılığının ve özgüllüğünün hesaplanması

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmanın Genel Özellikleri

Çalışma prospektif nitelikte olup çalışma iki basamakta gerçekleştirilmiştir İlk basamakta yarışmalı ELISA protokolünün optimizasyonu ve validasyonunun yapılarak deney protokolü hazırlanmış ikinci basamakta ise bu deney protokolü ile hasta ve kontrol grubunun örnekleri çalışılmıştır.

Çalışma TÜBİTAK 2214-A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programından destek kazandığından, proje dahilinde Hacettepe Üniversitesi'ndeki numuneler Kanada'nın Toronto şehrindeki The Hospital for Sick Children (SickKids) Research Institute'e transfer edildi ve araştırmanın iki basamağı da bu hastanede gerçekleştirildi.

Araştırmada klinik verileri ve numuneleri kullanılan hastalar Eylül 2020-Ağustos 2022 arasındaki zaman diliminde SARS-CoV-2 virüsüne bağlı pnömoni ve MIS-C tanısıyla Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nde yatarak tedavi almış hastalardır. Sağlıklı kontrol grubu olarak da aynı tarih aralığında aynı hastanenin Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniğine başvuran 56 gönüllü katılımcı alınmıştır. Çalışma için etik kurul onayı Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 15.02.2022 tarih, GO 22/172 Proje No ve 2022/03-49 karar numarasıyla verilmiştir.

3.2. Çalışmada Dahil Edilen Hasta ve Kontrol Grubu

Hasta grubu: MIS-C tanısıyla Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nde yatırılıp tedavi alan 90 hastadır.

a. Hasta grubuna dahil etme kriterleri:

- DSÖ'nün vaka tanımına göre MISC tanısı alan 18 yaş altı hastalar
- Çalışmaya katılmayı kabul eden ve aydınlatılmış onam formunu imzalayan hastalar
- Tedavi öncesinde ya da sonrasında alınan ve yeterli serum numunesi bulunan hastalar çalışmaya dahil edildi.

Hasta grubunda hariç tutma kriterleri:

- MISC tanısı dışlanan hastalar
- Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen ve aydınlatılmış onam formlarını imzalamayan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

b. Kontrol grubu: Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nde SARS-CoV-2'ye bağlı pnömoni dolayısıyla solunum desteği ihtiyacı olan 9 hasta ve Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniğine başvuran sağlıklı gönüllü 56 çocuktur.

Kontrol grubuna dahil etme kriterleri:

Pnömoni kontrol alt grubu için

- 18 yaş altı olmak
- SARS-CoV-2'ye bağlı pnömoni tanısıyla solunum desteği almak, viral ya da SARS-CoV-2 pnömonisinin radyolojik özelliklerini ve semptomlarını göstermek ve SARS-CoV-2 PCR pozitifliği olmak
- Tedavi öncesinde ya da sonrasında alınan ve yeterli serum numunesi bulunmak
- Çalışmaya katılmayı kabul etmek

Sağlıklı kontrol alt grubu için

- 18 yaş altı olmak
- Aktif enfeksiyonu ve kronik hastalığı olmamak
- Çalışmaya katılmayı kabul etmek

Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nde MIS-C tanısıyla yatırılarak tedavisi yürütülmüş, hastanenin kendi veri sisteminde klinik ve laboratuvar kayıtları bulunan ve dahil etme kriterlerini karşılayan hasta grubuna toplamda 90 hasta alınmıştır. Hastaların verilerini oluşturan klinik öyküleri ve izlemleri, laboratuvar değerleri ve radyolojik görüntülemeleri *Nucleus* veri sisteminden ve e-Nabız sisteminden taranarak elde edilmiştir. Bazı hastalar dış merkezlerde tedavisine başlanmış olarak sevk alındığından dolayı, hastaların e-Nabız sistemi üzerinden tedavi öncesi klinik özellikleri ve laboratuvar değerlerine ulaşılarak verileri analizlerde kullanılmıştır.

3.2.1. Klinik Fenotipler

MIS-C'nin fenotipik olarak ateş-inflamasyon, KH benzeri ve şok ile seyredebileceği Whittaker ve ark. tarafından bildirilmiştir [33]. *Şok fenotipi* MIS-C tanısı alan hastaların inotrop desteğine veya 20 mL/kg'dan daha fazla sıvı resüsitasyonuna ihtiyaç duyulması olarak tanımlanmıştır. *KH benzeri fenotip* için AHA'nın [20] klasik ve inkomplet KH kriterleri kullanılmıştır. Klasik KH'de tanı ölçütü inatçı ateş ve 5 özelliğten 4'üne sahip olmaktır: dudaklarda eritem ve çatlama, çilek dili ve/veya oral ve faringeal mukozada eritem; eksudasız bilateral bulber konjonktival kızarıklık, makülopapüler ya da yaygın eritrodermi şeklinde görünen döküntü; akut fazda el ve ayaklarda eritem ve ödem ve/veya subakut fazda periungual soyulma ve servikal lenfadenopati. Koroner arter anevrizmaları mevcutsa, 4'ten az özelliği olan hastalar Kawasaki hastalığı olarak sınıflandırılmıştır. Koroner arter değişikliklerinin olmadığı durumlarda, Kawasaki klinik kriterlerine göre sınıflandırma için beş özelliğten dördünün mevcut olması gerekmektedir. AHA'nın [20] KH rehberindeki inkomplet KH kriterleri de KH benzeri fenotipin belirlenmesinde kullanılmıştır. Klasik KH'nin <4 klinik özelliği ile birlikte ≥ 5 gün ateş ve CRP ≥ 30 mg/L, ESH ≥ 40 mm/saat iken pozitif ekokardiyografi bulguları olduğunda inkomplet KH açısından hasta değerlendirilmelidir. Aşağıdakilerden 3 veya daha fazlası:

1. Yaşa göre anemi
2. 7 günlük ateşten sonra trombosit sayısı $\geq 450 \times 10^9/L$
3. Albümin ≤ 30 g/L
4. Yüksek ALT seviyesi
5. Lökosit sayısı $\geq 15 \times 10^9/L$
6. İdrarda lökosit $\geq 10/ml$

ve aşağıdaki ekokardiyografik özelliklerden biri:

1. Sol ön inen koroner arter veya sağ koroner arter Z-skoru $\geq 2,5$;
2. koroner arter anevrizması gözlenmesi; veya
3. aşağıdaki özelliklerden ≥ 3 'ü:
 - (a) azalmış sol ventrikül fonksiyonu,
 - (b) mitral yetmezlik,

- c) perikardiyal efüzyon veya
- d) sol ön inen koroner arter veya sağ koroner arterde Z skorunun 2 ila 2,5 arasında olması

varsa inkomplet KH olarak KH benzeri fenotipinde MIS-C olarak kabul edildi.

Ateş-inflamasyon fenotipi ise yukarıda tanımlanan KH benzeri ve şok fenotipi kriterlerini karşılamayan MIS-C hastaları olarak tanımlanmıştır [33, 103].

Dahil edilen 90 MIS-C tanımlı hasta klinik fenotiplerine göre ayrıldığında 19'u (%23) ateş-inflamasyon, 34'ü (%36) KH benzeri klinik ve 37'si (%40) şok fenotipindeydi. Şok fenotipindeki hastalar çalışmadaki en ağır klinik durumu temsil etmekteydi.

Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nde SARS-CoV-2'ye bağlı pnömoni dolayısıyla solunum desteği ihtiyacı olup yatırılarak tedavi edilen 9 hasta ve 56 sağlıklı çocuk çalışmanın kontrol grubunu oluşturmuştur. Pnömonili hastaların ve sağlıklı çocukların verileri *Nucleus* sisteminden taranarak elde edilmiştir.

3.3. Numunelerin Hazırlanması ve Saklanması

3.3.1. Hasta grubu serumları

MIS-C tanısı konulan hastaların serum numuneleri üç ana başlıkta sınıflandırıldı:

1. *Tedavi öncesi*: MIS-C tanısı konulan ve metilprednizolon, IVIG, anakinra ya da TPE gibi immünmodülatör tedavilerden herhangi birini almadan önce biyokimya tüpündeki kan örneğinden (*serum separating tube*) 10 dakika 2000 rpm'de santrifüjle elde edilen serum örneği

2. *Tedavi esnası*: MIS-C tanısıyla metilprednizolon, IVIG, anakinra ya da TPE gibi immünmodülatör tedavilerden en az birini almış olan ve hastanede halen MIS-C nedeniyle yatmakta olan hastalardan veya taburculukta elde edilen serum örneği

3. *Poliklinik takip*: MIS-C tanısıyla metilprednizolon, IVIG, Anakinra ya da TPE gibi immünmodülatör tedavilerden en az birini almış olup taburcu edilen ve poliklinik kontrolde bakılan laboratuvar değerlerinde CRP düzeyi normale dönmüş ve aktif şikayeti olmayan hastalardan elde edilen serum örneği

3.3.2. Kontrol Grubu Serumları

1. *Pnömoni kontrol*: SARS-CoV-2'ye bağlı pnömoni tanısı konulan hastaların solunum desteği almış olduğu bir zaman diliminde elde edilen serum numuneleri

2. *Sağlıklı kontrol*: Herhangi bir nedenle Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniğine başvurmuş, tedavisi tamamlanmış ve aktif enfeksiyonu ve kronik hastalığı olmayan çocuklardan elde edilen serum örneği

Kan tetkikleri sırasında alınan 2-3 ml'lik kan örneklerinden elde edilen serumlar ailelerinin izniyle Hacettepe Üniversitesi Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarı'nda -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bu çalışma dolayısıyla bu numunelerin ~500 ul'lik aliquotları -80°C'de kuru buzla soğuk zincir korunarak The Hospital for Sick Children (SickKids) Research Institute'e transfer edilmiştir. Örneklerin bu merkeze transferi esnasında iki kurum arasında Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması imzalanmıştır. Optimizasyonu ve validasyonu tamamlanan yarışmalı ELISA protokolü ile deney tamponunda bire iki seyreltilerek hazırlanan 25 ul'lik serum örnekleri çalışılmıştır.

3.4. Yarışmalı ELISA Protokolünde Kullanılan Kimyasallar

Tablo 2.5'te özetlendiği üzere literatürde elastin tespiti ve ölçümü için geliştirilmiş üç tane (Hong et al., 2012; Petersen et al., 2002; Sivaprasad et al., 2005) yarışmalı indirekt ELISA protokolü vardır. Bu protokollerde yarışmanın gerçekleştiği iki komponent olan elastin ve pAb'lerde kullanılan dilüsyonların benzerliğinden de anlaşılacağı üzere inkübasyon koşulları dışında protokoller hemen hemen aynıdır. Analitler denatüre olan α -elastin ve pAb ise anti- α -elastindir. Farklı inkübasyon matrisindeki bu benzer protokollerin validasyonuna dair veriler yalnızca Petersen ve arkadaşları [104] tarafından paylaşılmıştır. Bu çalışmadaki intra-assay

CV değeri %11 ile %40 arasında değişmektedir. Bu haliyle doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek mümkün gözükmemektedir.

EDP'lerin kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisine dair yukarıda etraflıca tartışıldığı üzere MIS-C'nin kalp üzerindeki hasarı tanımlayabilmek için geliştirdiğimiz ELISA yönteminde insan aortasından elde edilmiş elastin (HAE) kullanılmıştır. Yarışmalı ELISA protokolü için seçilen kimyasallar ve laboratuvar ekipmanları Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Yarışmalı ELISA protokolünde kullanılan kimyasallar ve laboratuvar ekipmanları

Materyal	Ad	Firma	Katalog No
ELISA Plakası	Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates	Thermo Scientific	439454
Sodyum karbonat	Sodium Carbonate (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich	S7795-500G
5% sığır serum albümin [91]	Albumin, Bovine Serum	BioShop Canada Inc.	ALB001.500
Fosfat Tampon Salin	10X PBS	Grow Cells	MRGF-6236
Deterjan (Polietilen glikol sorbitan monolaurat)	Tween-20	Sigma-Aldrich	P1379-500G
Analit- Elastin	Human Aortic Elastin	Elastin Products Company, INC	HA587
Birincil Antikor (pAb)	Human tropoelastin poliklonal antiserum	Elastin Products Company, INC	PR398
İkincil Antikor (sAb)	Goat anti-rabbit IgG (HRP) 500ug (0,5mg/ml)	Abcam	ab97080
Substrat	Super AquaBlue ELISA Substrate	Invitrogen™	00-4203-56
Durdurma solüsyonu	Oxalic Acid	Sigma-Aldrich	75688-250G
Spektrofotometre	Visible Plate Reader	Molecular Devices	VersaMax190

3.4.1. Yarışmalı ELİSA Protokolünde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Yarışmalı ELISA protokolü için hazırlanan tampon ve çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 3.2'de özetlenmiştir.

Tablo 3.2. Yarışmalı ELISA protokolünde kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması

Tampon ve Çözeltiler	İçerik	Kullanım Amacı
0.1M Sodyum karbonat solüsyonu	5, 3 gr Na ₂ CO ₃ 500 mL dH ₂ O HCl kullanılarak pHmetre ile pH=9 olarak ayarlanmalı	Kuyucukları kaplama
PBST (%0,05) (fosfat tamponlu salin solüsyonu)	100 mL PBS (10x) 900 mL dH ₂ O içinde dilüe edilip 500 uL Tween-20 eklenerek %0,05 oranında PBST (1x) hazırlanır.	Yıkama ve deney tamponunun hazırlanması
PBST (%0,05) - BSA (%5)	2 g sığır serum albümini [91] [91] ve 40 mL yıkama tamponu ile oda sıcaklığında yavaşça karıştırarak PBST (%0,05)-BSA (%5) hazırlanır	Bloklama solüsyonu
PBST (%0,05) - BSA (%7,5)	3 g BSA [91] ve 40 mL yıkama tamponu ile oda sıcaklığında yavaşça karıştırarak PBST (%0,05)- BSA (%7,5) hazırlanır	Deney tamponu
0.625 M Oksalik Asit	5.627 g Okzalik Asit (Sigma-Aldrich, 194131) (Moleküler ağırlık: 90.03 g) 100 mL dH ₂ O	Durdurma çözeltisi

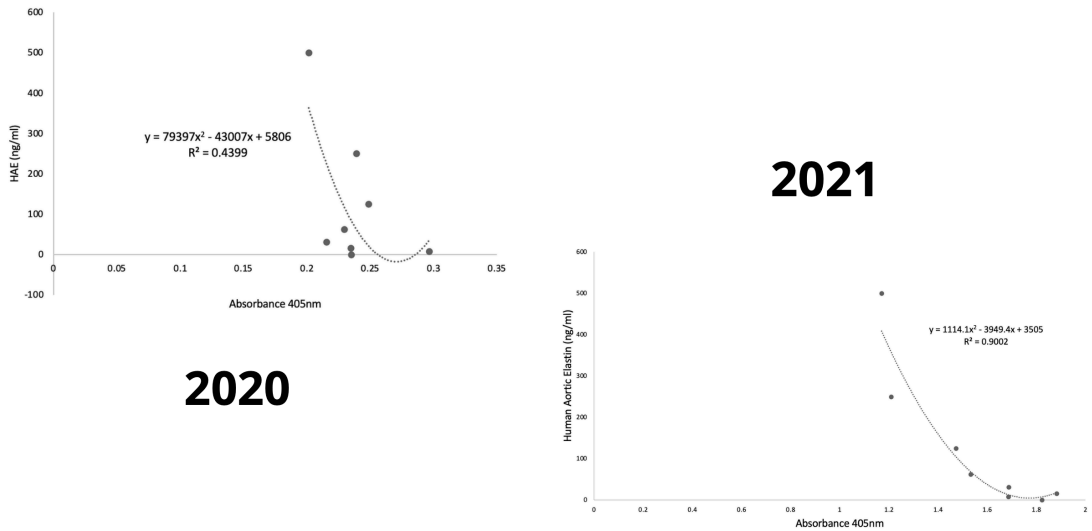
3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki istatistiksel analizler ve görselleştirme için R, version 4.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) ve GrahPad Prism version 9.5.1 kullanıldı. Kategorik değişkenler frekans ve yüzde ile sayısallaştırılırken, sürekli değişkenlerde ortanca ve çeyrekler arası aralık/genişlik (IQR) ifade edildi. Kolmogorov Smirnov testi ile yapılan normallik değerlendirilmesine göre devamlı değişkenler normal dağılmıyorsa karşılaştırılan grupların sayısına bağlı olarak Mann Whitney U testi veya Wilcoxon işaretli sıralar testi veya Kruskal-Wallis, normal dağılıyorsa bağımsız *t* testi veya bağımlı örneklem *t* testi veya tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerde ise ki-kare (χ^2) testi veya Fisher-exact testi kullanıldı. Laboratuvar değerlerinin birbiriyle ilişkisi spearman korelasyon analizi ile kontrol edildi. Klinik verilerin analizinde lojistik regresyon ile risk analizi yapıldı. ELISA için standart eğrisi dört parametrelili lojistik regresyon ile oluşturuldu. Duyarlılık ve özgüllük değerlendirmesi için de Receiver operating characteristic (ROC) eğrisinden faydalanıldı. Kesim noktasının belirlenmesinde Youden indeksi, Öklid mesafesi ve birleşim indeksinden yararlanıldı [105, 106]. İstatistiksel anlamlılık *p* değerinin 0,05'ten küçük olma ihtimali olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Yarışmalı ELISA Protokolünün Optimizasyonu

İlk olarak The Hospital For Sick Children (SickKids) Research Institute'deki Yeung Lab'da 2020'de temelleri atılan protokol sonraki yıllarda ufak modifikasyonlar yapılarak iyileştirilmeye çalışılmış fakat mevcut haliyle duyarlılık ve özgüllükten uzak olup tekrarlanabilir olmadığı görülmüştür (Şekil 4.1). Standart eğrisi bu protokollerde R^2 değeri ile değerlendirildiğinde en iyi 0,90 gibi regresyon değeri gösterdiği için optimizasyonu tamamlanmamış ve validasyon açısından da değerlendirilememiştir. Bu nedenle tekrarlanabilir bir ELISA protokolü için öncelikle deneyin tüm basamaklarıyla optimizasyonunun gerçekleştirilip ardından da geçerliliğinin tekrarlayan deneylerle tespit edilmesi gerekliliği doğmuştur. Optimize edilmiş, geçerli olduğu validasyon testlerince onaylanmış bir ELISA protokolü ile numunelerin çalışmaya başlanması, biyobelirteç araştırmalarının temelini oluşturmakta ve numunelerle çalışılarak elde edilen veriler belirtecin klinik öneminin belirlenmesinde ve yorumlanmasında öncelik teşkil etmektedir. Buradan hareketle, optimizasyon ve validasyonla, tekrarlanabilir ve kesinlik düzeyi yüksek bir protokolün oluşturulması; ardından da sağlıklı kontrol ve MIS-C'li hastalarda numunelerin çalışılarak EDP peptidinin klinik öneminin belirlenmesi planlanmıştır.



Şekil 4.1. Kullanılması amaçlanan deney protokolünün optimize edilmemiş halinin 2020 ve 2021 yılındaki iki standart eğrisi

Deney basamaklarının optimizasyonu da validasyonu da kompleks ve dinamik bir süreçtir. Optimizasyonu yapılan deney protokolünün standart eğrisinin R^2 değeri 0,99 değerine ulaştırıldıktan sonra devam eden optimizasyon basamakları genellikle uygun olan validasyon deneyleri ile iç içe geçirilerek her basamak optimize ve aynı zamanda valide edilerek deneyler tamamlanmıştır.

4.1.1. Kaplama Çözeltisi Optimizasyonu

Kaplama çözeltisi seçiminde plakalarda katı faz için sıklıkla kullanılan 0,1M sodyum karbonat solüsyonu (pH=9) kaplama çözeltisi olarak seçilip [89], yarışmalı ELISA'da yarışmalı alanının katı faz bileşeni olan analit için de kardiyovasküler tutulumu özgü EDP'leri yakalamak üzere insan aortasından elde edilen tropoelastin (HAE) (HA587, Elastin Products Company, INC) seçilmiştir.

4.1.1.1. Kaplama Çözeltisinin İçerdiği HAE Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Yarışmalı ELISA'da kuyucukların analitle doğru ve uygun konsantrasyonda kaplanması yarışmanın gerçekleşeceği alanı belirleyen önemli bir basamaktır. Kuyucukların kaplı olduğu en uygun analit konsantrasyonu ile yakalama antikoruna dengelerini sağlamak üzere satranç tahtası titrasyonu yapıldı. Optimizasyon ve validasyon sürecinin dinamizmi içerisinde, inkübasyon ve antikor konsantrasyonuna dair yapılan değişikliklerin ardından yeni bir satranç tahtası titrasyonu uygulanarak elde edilen yeni protokol optimize edilmeye çalışıldı. Son satranç tahtası titrasyonunda yarışmanın gerçekleştiği saptama antikoruna ve kaplanan antijenin farklı konsantrasyonlarda bağlanma yüzdeleri hesaplanarak uygun konsantrasyonlar seçilmeye çalışıldı (Tablo 4.1). Kuyucukların kaplandığı 1 µg/ml, 1,25 µg/ml, 1,5 µg/ml ve 1,75 µg/ml'in yakalama antikorunun 1:25.000, 1:20.000, 1:16.000 oranlarında oluşturduğu bağlanma yüzdeleri 2560 ng/ml için %10-22 aralığındayken, 10 ng/ml için bu yüzde %92-100 arasındaydı. Kaplama çözeltisinin konsantrasyonu 1,25 µg/ml ve yakalama antikorunun 1:25.000 dilüsyonu, daha düşük bir OD değeri (0,23 ve 1,38) sağlayıp %10 ile %20 arasında bir değere tekabül edip, sonraki deneylerde daha düşük intra-assay CV değeri sağladığı için bu kombinasyonun kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.1. Yarışmanın gerçekleştiği analit ve pAb arasındaki bağlanma yüzdelerinin standart eğrisinin en üst, en alt noktasında negatif kontrol baz alınarak belirlenmesi

<i>C-1 + pAb (1:25000)</i>		<i>C-1 + pAb (1:20000)</i>		<i>C-1 + pAb (1:15000)</i>	
Bağlanma yüzdesi	HAE (ng/ml)	Bağlanma yüzdesi	HAE (ng/ml)	Bağlanma yüzdesi	HAE (ng/ml)
10	2560	11	2560	11	2560
92	10	98	10	120	10
100	NK	100	NK	100	NK
<i>C-1,25 + pAb (1:25000)</i>		<i>C-1,25 + pAb (1:20000)</i>		<i>C-1,25 + pAb (1:15000)</i>	
17	2560	19	2560	19	2560
103	10	101	10	104	10
100	NK	100	NK	100	NK
<i>C-1,5 + pAb (1:25000)</i>		<i>C-1,5 + pAb (1:20000)</i>		<i>C-1,5 + pAb (1:15000)</i>	
20	2560	22	2560	21	2560
97	10	99	10	101	10
100	NK	100	NK	100	NK
<i>C-1,75 + pAb (1:25000)</i>		<i>C-1,75 + pAb (1:20000)</i>		<i>C-1,75 + pAb (1:15000)</i>	
19	2560	19	2560	17	2560
99	10	100	10	92	10
100	NK	100	NK	100	NK

(C'nin yanındaki sayı kaplama solüsyonun konsantrasyonu, pAb'nin yanındaki oran ise pAb'nin (yakalama antikorunun) final dilüsyonunu ifade etmektedir; NK: Negatif kontrol)

4.1.1.2. HAE İçeren Çözeltilerin İnkübasyonunun Optimizasyonu

Analitin kuyucaklara eklenmesinden sonra analitin tutunmasını sağlayan etkenler inkübe edilen zaman dilimi ve ortam sıcaklığıdır. Genel bir kural olarak 4°C'de gece boyu bir inkübasyon oda sıcaklığında daha kısa bir zaman diliminde gerçekleşir. Her ne kadar literatürdeki yarışmalı ELISA protokollerinde kullanılan birincil antikorlar anti- α -elastin olsa da, anti-tropoelastin ile HAE arasında benzer bir bağlanma olacağı düşünülerek; literatürdeki inkübasyon koşulları ile Dr. Fisch'in ilk belirlediği protokolde [102] kullanılan gece boyu 4°C'de gerçekleşen inkübasyonlar farklı plakalarda aynı protokollerle mini satranç tahtası titrasyonu yapılarak kıyaslandı (Tablo 4.2). Hemen hemen benzer bağlanma yüzdeleri ve NSB değeri (*non-specific binding*) ve $R^2 > 0,98$ değerine sahip benzer standart eğrisi oluşturdukları görüldü ve daha kısa bir zaman dilimi olması nedeniyle oda sıcaklığında 2 saatlik inkübasyonla deney süresinin kısaltılmasına karar verildi. Sonraki deneyde 37°C'de 90 dakikalık inkübasyonla, oda sıcaklığında 2 saatlik

kaplama inkübasyonu kıyaslanmış ve benzer sonuçların elde edilmesi üzerine deney kolaylığı açısından daha uygun olan 2 saatlik oda sıcaklığı inkübasyonu tercih edildi ve deneyler bu şekilde yapıldı.

Tablo 4.2. HAE içeren kaplama çözeltisinin katı fazda inkübasyon koşullarının belirlenmesi

Oda sıcaklığında 2 saat			4°C'de gece boyu		
<i>C1 + pAb (1:9000)</i>			<i>C1 + pAb (1:9000)</i>		
Ort. OD	HAE (ng/ml)	B0/%B	Ort. OD	HAE (ng/ml)	B0/%B
1,21	0	100	1,26	0	100
1,07	2,5	89	1,18	2,5	94
0,98	12,5	81	1,05	12,5	83
0,81	62,5	67	0,90	62,5	71
0,56	312,5	46	0,59	312,5	47
<i>C2 + pAb (1:9000)</i>			<i>C2 + pAb (1:9000)</i>		
1,27	0	100	1,36	0	100
1,22	2,5	96	1,24	2,5	91
1,18	12,5	93	1,19	12,5	88
1,05	62,5	82	1,07	62,5	78
0,80	312,5	63	0,82	312,5	61
<i>C3 + pAb (1:9000)</i>			<i>C3 + pAb (1:9000)</i>		
1,33	0	100	1,40	0	100
1,23	2,5	93	1,29	2,5	92
1,22	12,5	92	1,24	12,5	88
1,11	62,5	84	1,14	62,5	82
0,90	312,5	68	0,87	312,5	62
<i>C4 + pAb (1:9000)</i>			<i>C4 + pAb (1:9000)</i>		
1,40	0	100	1,46	0	100
1,33	2,5	95	1,38	2,5	95
1,27	12,5	91	1,26	12,5	87
1,18	62,5	84	1,22	62,5	84
0,95	312,5	68	0,97	312,5	66

4.1.1.3. Kaplama Çözeltisinin Hacminin Optimizasyonu

Kaplama çözeltisinin hacmi kuyucuklardaki analitin antikorla bağlanacak yüzey alanını ifade eder. Yapılan deneylerde 50 µL ile 75 µL aynı deney kaplarında aynı protokol uygulanarak aynı hacimlerle kaplanmış kuyucuklar için hazırlanmış birer standart ile kıyaslanmıştır. Fakat yüksek hacmin daha fazla yüzey alanı oluşturarak yakalama antikorlarının analitle bağlanmasını artırdığı görülmüştür. Yüksek optik dansiteye (OD) ve bağlanma yüzdesinde daha dar bir aralığa neden olmasından dolayı 50 µL ile deneylere devam edilmiştir.

4.1.2. Bloklamanın Optimizasyonu

4.1.2.1. Bloklama Çözeltisi ve İnkübasyonu

Bloklama solüsyonu olarak kullanılan %5 BSA içeren tamponun kuyucuklara 200 uL eklenip 1 saat 37°C inkübasyonu literatürde fazlaca kullanılan ve NSB'yi yeterince düşüren bir bloklama metodudur. Spesifik olmayan bağlanmalar üzerinden izlenen bloklama basamağı validasyon deneylerinde NSB kuyucuğunun optik dansitesi 0,75-0,78 (405 nm) aralığında izlenmiştir.

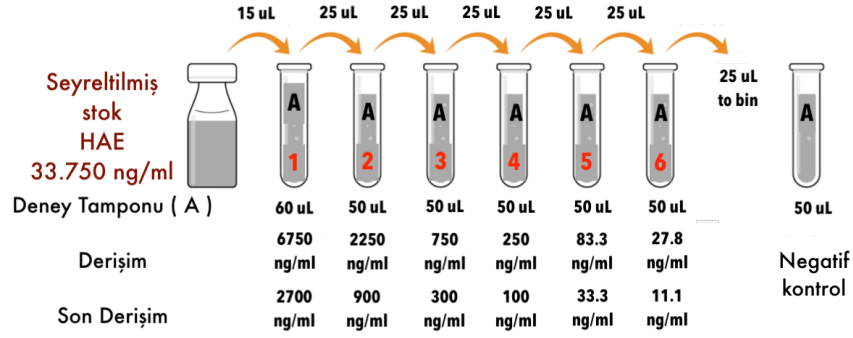
4.1.3. Standart Bileşenlerinin Optimizasyonu

Standart eğrisi bilhassa kaplama solüsyonunun içerdiği HAE konsantrasyonu, pAb dilüsyonu ve inkübasyonlardan doğrudan etkilenerek yapılan her optimizasyon aşamasında hedeflenen bağlanma yüzdesine göre üst-nokta, alt-nokta ve seri dilüsyon faktörü dikkat edilerek yeniden değerlendirilmiştir. Deney aşamasında değişiklikler tercihen agresif olmamalı ve her yeni deneyde sadece standart eğrisinin bir bileşeni test edilmelidir.

4.1.3.1. Dilüsyon Faktörünün Optimizasyonu

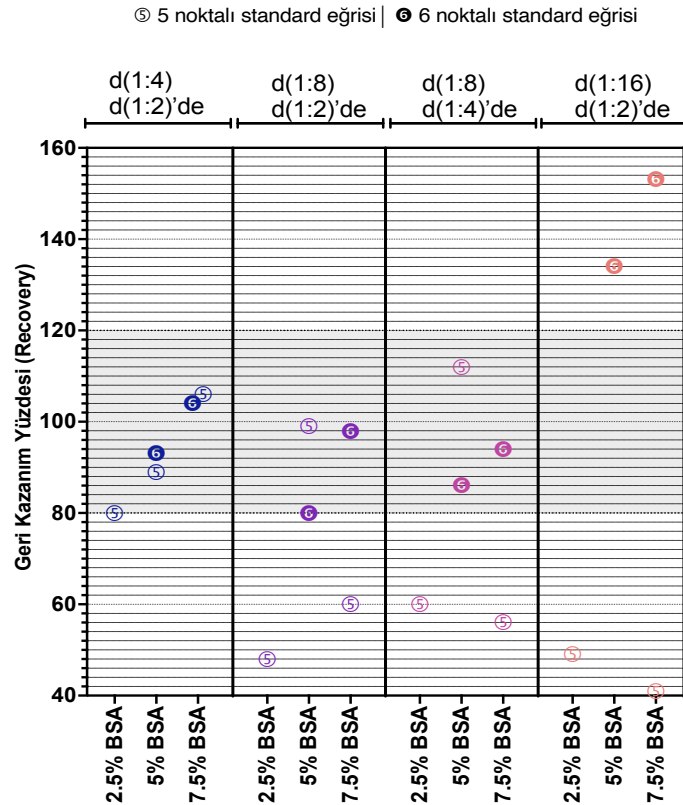
Dilüsyon faktörü, standart eğrisini oluşturan noktaların birbirine oranını temsil eder. Bağlanma yüzdesinin %10-90 arasında olmasını sağlayacak şekilde standardın tavanı ve tabanı belirlendikten sonra standardı oluşturacak analit konsantrasyonları ve onların bağlanma yüzdelерinin uygun dağılımını belirlemek gerekmektedir. Dilüsyon faktörü standardı oluşturan taban ve tavan arasındaki olması arzu edilen konsantrasyon sayısı ile orantılı olarak belirlenebilir.

Optimize edilen standart eğrisi örneğinden hareketle, eğriyi oluşturan üst-nokta 2700 ng/ml'dir. Üst-noktadan sonra sırayla 900 ng/ml, 300 ng/ml, 100 ng/ml, 33,3 ng/ml ve son nokta 11,1 ng/ml olarak standart eğrisi oluşturulmuştur. Bu konsantrasyonlar üçe bölünerek devam ettiği için dilüsyon faktörü üçtür. Şekil 4.1'e dikkat edilirse önceki optimize olmamış protokollerde dilüsyon faktörü olarak 2 kullanılmış ve dar bir aralıkta standart eğrisinin örneği vardır. Şekil 4.2'de standardın hazırlanışı özetlenmiştir.



Şekil 4.2. Standart eğrisini oluşturmak üzere kullanılan HAE konsantrasyonlarının seri dilüsyonla hazırlanması

Optimizasyon boyunca hedeflenen bağlanma yüzdesi aralığının içinde kalmak ve standardı oluşturan 5 ya da 6 noktanın içine eğriyi sığdırılabilmek adına farklı dilüsyon faktörleri denenmiştir. Şekil 6'da görüleceği üzere %7,5 oranındaki BSA ile hazırlanan deney tamponu altılı standart eğrisinden oluşan kombinasyonla dilüsyonel linearite bire sekize kadar güvenli bir geri kazanım yüzdesi sağlamıştır.



Şekil 4.3. Uygun tampon solüsyonunun ve standart eğrisini oluşturan konsantrasyon sayısının belirlenmesi

Dilüsyonel linearitede %80-120 oranında geri kazanım yüzdesinin sağlanması hedeflenmiştir.

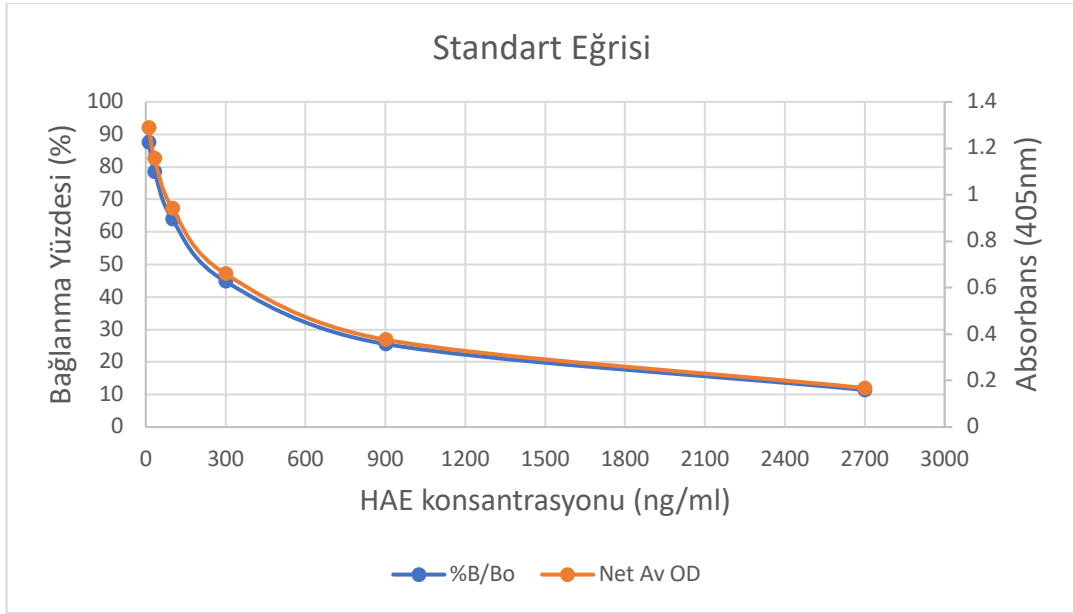
4.1.3.2. Standartı Temsil Eden Konsantrasyonlardan En Üst ve En Alt Konsantrasyonların Belirlenmesi

Yarışmalı ELISA'larda standart eğrisini oluşturan en üst konsantrasyonun %20 en alt konsantrasyonun ise %80 civarı bağlanma yüzdesinin olması tavsiye edilmekle beraber bu yüzdeler üstte %10 altta %90'a kadar esnetilebilir [98]. Optimize edilirken yüzdeleri belirleyen kaplama antijeni ve pAb'nin konsantrasyonları bu oranlar dikkate alınarak ayarlanmalıdır.

4.1.3.3. Standart Eğrisini Oluşturan Nokta Sayısının Belirlenmesi

Optimize edilen 6 noktalı standardın 2700 ng/ml (%15-20), 900 ng/ml (%40-45), 300 ng/ml (%60-65), 100 ng/ml (%70-75), 33,3 ng/ml (%80-85) ve son nokta 11,1 ng/ml (~%90) konsantrasyonları, parantez içinde ifade edildiği gibi bağlanma yüzdelere tekabül ettiği hali üzerinden validasyon testlerinde kullanılmıştır. İleride detaylarına değinilecek olan ve yine optimizasyon aşamasında 5 noktalı optimize edilen bir diğer standart eğrisi de validasyona alınmıştır. İkinci egrideki standartta ise dilüsyon faktörü 4 olup, konsantrasyonlar ve bağlanma yüzdeleri 2560 ng/ml (%15), 640 ng/ml (%15), 160 ng/ml (%15), 40 ng/ml (%15), ve son alt-nokta 10 ng/ml (%15) olarak görülmüştür. Bu iki farklı eğrinin farklı BSA konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan tampon çözeltilerinde plazma geri kazanım değerleri karşılaştırılmıştır. Geri kazanım yüzdesinde bire iki, bire dört, bire sekiz ve bire 16 oranlarında seyreltilen aynı anda alınmış, aynı sağlıklı insana ait en az üçer serum ve plazma örnekleriyle BSA konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Bu farklı deneylerin karşılaştırılmasında görüleceği üzere altı noktalı %5 ve %7,5 BSA oranlarının bire sekiz seyreltmeye kadar uygun geri kazanım yüzdeleri sağladığı, fakat beş noktalı standardın bu seyreltmelerle beraber standart eğrisinin son iki noktasına düşen konsantrasyon değerlerinde yeterli geri kazanım sağlayamadığı gösterilmiştir. Bire 16 dilüsyonda geri kazanım yüzdelерinin istenen aralıkta olmaması, sağlıklı insanlardaki plazma EDP konsantrasyonunun yaşa bağlı değişmekle beraber erişkin plazmasında 300-400 ng/ml, serumunda EDP konsantrasyonunun 250-300 ng/ml olmasından dolayı seyreltmeyle standart eğrisinin en alt noktasına yaklaştığından başarı düşmektedir.

Protokolün nihai haliyle, dört parametrelili lojistik regresyon (4PL) kullanılarak oluşturulan standart eğrisinde 2700-900-300-100-33,3-11,1 ng/ml'den oluşan standart eğrisinin her bir konsantrasyonu sırasıyla %11-26-45-64-78-88 bağlanma yüzdesine tekabül etmektedir. 4PL ile hesaplanan standart eğrisinde $R^2=1$ 'dir (Şekil 4.4).



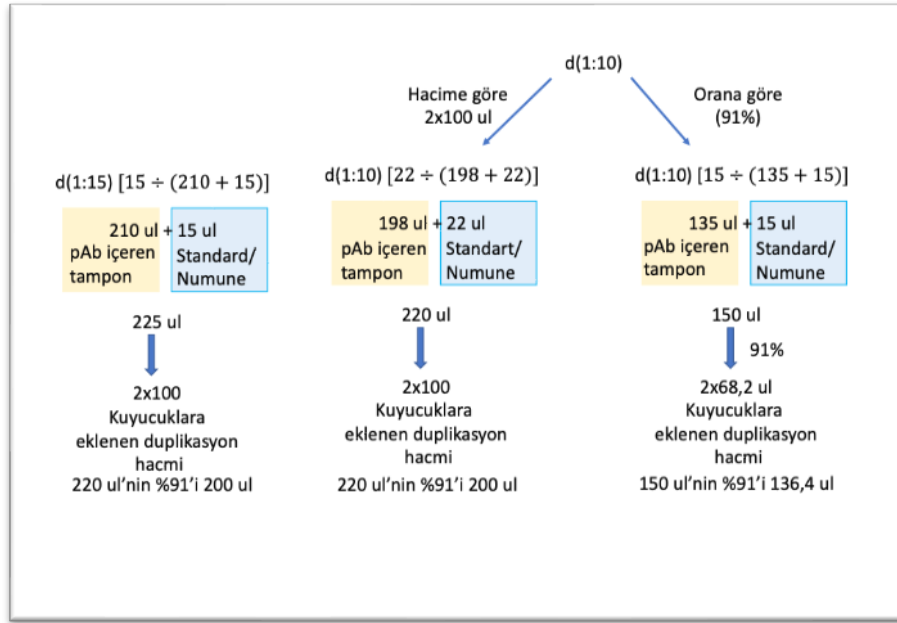
Şekil 4.4. Dört parametrelili lojistik regresyon (4PL) kullanılarak oluşturulan x eksenindeki HAE konsantrasyonuna karşılık gelen 405 nm'deki optik dansite (OD) ve bağlanma yüzdesi ($B_0/\%B$) temsil eden çift eğrili standart eğrisi

Optimizasyonu tamamlanan protokolde oluşturulan bu egride 2700-900-300-100-33,3-11,1 ng/ml'den oluşan standart eğrisinin her bir konsantrasyonu sırasıyla %11-26-45-64-78-88 bağlanma yüzdesine tekabül etmektedir. 4PL ile hesaplanan standart eğrisinde $R^2=1$ 'dir.

4.1.4. Plazma ve Serumun Deney İçi Dilüsyon Oranının Optimizasyonu

İlk protokolde standart için kullanılan HAE içeren tampona ve numuneye (plazma ya da serum) eklenen pAb içeren tampon çözeltisinin oranı 1/19 olup standart ve numunenin nihai dilüsyonu 1:20 idi. Bu oran öncelikle 1:15'e çekilip optimizasyonun bir kısmı bu dilüsyon oranı üzerinden gerçekleştirildi. Optimizasyon sonrası validasyonda yüksek CV değerlerinin nedenleri araştırılırken, 1:15 dilüsyonun matriks etkisi görülene kadar azaltılması planlandı. Fakat bu orandan dilüsyonu azaltmak suretiyle, daha konsantre bir halde tüp inkübasyonuna bırakılan numunenin %90'ının plakaya duplikasyon yapılarak transfer edilmesine dikkat

edildi. Plakaya transfer edilecek duplikasyon hacmini ya da tüp inkübasyona bırakılacak numune ve pAb'dan oluşan toplam hacmin koruması istendiğinde, dilüsyon oranı azaltılırken harcanacak numune miktarı da arttığı için öncelikle hedef olarak deneylerde 100 µL'lik alikotlardan fazla kullanmamak esas alındı. Şekil 4.5'te gerçekleştirilen deneylerin pAb'li solüsyonların tüp inkübasyonu için hazırlanan farklı dilüsyonları ve bunların plaka inkübasyonu için tüpten plakaya taşınması gereken duplikasyon hacimlerinin hesaplanmasına dair deney modellerinin bir örneği verilmiştir.



Şekil 4.5. HAE ile pAb arasındaki plakadaki yarışma öncesi, standart ve serum/plazma örneklerinin eppendorf tüpte inkübe edilmesi için hazırlanan solüsyonun farklı dilüsyon oranlarında farklı volümlerin karşılaştırılması için hazırlanan bir deney hesaplama modeli

Çok kanallı pipetleri kullanırken pipetlerin ucunun 1,5 mL hatta 2 mL'lik tüplerin dibine maksimum oranda ulaştığında bile minimum 10-11 µl solüsyonun tüp dibinde kaldığı gözlenmiştir. Bu yüzden de solüsyonun tüpten plakaya transferinde eppendorf tüpün dibinde 10-11 µl kalabilmesi için solüsyonun %91'nin transferi koşul kabul edilerek deneylere devam edilmiştir.

Buradan hareketle öncelikle ilk protokolde kullanılan 100 µL'lik duplikasyon hacmi kademe kademe azaltılarak daha konsantre tüp inkübasyonuna gidildi ve böylelikle deneyler için harcanacak numune miktarından tasarruf edildi. Bu dilüsyon değişikliği deneylerinde, standart eğrinin oluşumundaki antikor dilüsyonları sabit tutuldu. Fakat duplikasyon hacimleri azaltıldıkça standart eğrisinde kullanılan

konsantrasyonlara karşılık gelen bağlanma yüzdelerini korumak için kaplama konsantrasyonunda artışa gidildi. Böylelikle standart eğrisi ve bağlanma yüzdelerinde kayda değer bir değişiklik görülmedi. Bu yüzden de bu deneyler esnasında numunelerden elde edilen sonuçların tutarlılığı, bir başka deyişle *intra-assay CV* yüzdeleri takip edilerek optimizasyon yapılmış oldu. Farklı duplikasyon hacimlerinde farklı dilüsyonlar denenirken elde edilen *intra-assay CV* yüzdeleri Tablo 4.3'te özetlenmiştir. Burada farklı dilüsyon-eş antikor derişimli inkübasyon solüsyonları ve kuyucukların kaplandığı farklı HAE konsantrasyonları için bir sağlıklı kontrolün 6 örneği kullanılarak hesaplanan *intra-assay CV* yüzdeleri hesaplandı. Numunenin nihai dilüsyonunun 1:20'den 1:4'e düşülene kadar *intra-assay CV* değeri %10'un üzerinde olduğu için 1:2 ila 1:4 arasındaki dilüsyonlarda uygun tutarlılık görülebilmüş ve tabloya önceki 1:4 üzerindeki dilüsyonlar eklenmemiştir.

Tablo 4.3. Farklı kaplama solüsyonu konsantrasyonları ile standart ve plazmaların antikor derişimleri korunarak oluşturulan farklı hacimdeki tüp inkübasyon solüsyonlarının *intrassay CV* ile değerlendirilmesi

		Duplikasyon Hacmi (2x75ul)			
		d(1:2)	d(1:2,5)	d(1:3)	d(1:4)
Kaplama için [HAE]	0,75 ug/ml	6,2-6,6	5,3-5,7	4,8-5,1	
	1 ug/ml		4,1-11,1	2,9- 9,2	4,3-12,5
	1,25 ug/ml			5,2-13,3	
	1,5 ug/ml	Yüksek OD değerleri nedeniyle kullanılmadı.			

		Duplikasyon Hacmi (2x60ul)			
		d(1:2)	d(1:2,5)	d(1:3)	d(1:4)
Kaplama için [HAE]	0,75 ug/ml	Düşük OD değerleri nedeniyle kullanılmadı.			
	1 ug/ml	4,7-6,4		2,9- 9,2	4,3-12,5
	1,25 ug/ml	8,3-8,6			
	1,5 ug/ml		5,4-13,3	6,9-10,7	

(Gri hücrelerdeki d harfi standart/numune hacminin inkübasyona girecek olan pAb içeren solüsyonla karıştırıldıktan sonraki tüp inkübasyona girecek olan total hacime oranını ifade etmektedir.)

4.1.5. Deneysel Tamponun Optimizasyonu

Tampon çözeltisi, %0,05 *Tween20* içeren 1x PBS solüsyonu kullanılarak Bovine Serum Albumin ile hazırlanmaktadır. İlk protokolde %0,5 *Tween20*'nin literatüre göre yüksek bir oran olması ve deneyde çok fazla pipetleme hatasına neden olacak düzeyde baloncuk/köpük oluşturması nedenleriyle %0,5, %0,25, %0,1 ve %0,75 *Tween20* oranları kıyaslanarak en iyi sonuçların elde edildiği % 0,05 *Tween20*'ye düşürülerek deneylere devam edildi. Yıkama solüsyonu içine %2,5 ila %7,5 oranlarında BSA eklenerek tampon çözeltisi ile optimizasyon deneyleri yapıldı. Deneyler için kullanılan farklı tamponlarda bloklama tamponu olarak %5 BSA sabit tutuldu. Optimizasyon deneyleri yapılırken BSA konsantrasyonu ile değişen geri kazanım sonuçları elde edildiğinden, serum ve plazma numunelerinin seyreltilmesinde çeşitli BSA konsantrasyonlarının kullanıldığı linearite deneylerinin geri kazanımlarının da farklı olduğu gösterildi.

Geri kazanım yüzdesinde bire iki, bire dört, bire sekiz ve bire 16 oranlarında seyreltilen aynı anda alınmış, aynı sağlıklı insana ait en az üçer serum ve plazma örnekleriyle BSA konsantrasyonları karşılaştırıldı. Geri kazanım oranının %80-120 arasında kalması hedeflendiğinden %7,5 BSA oranlarının tampon için daha iyi sonuçlar alındığı ve sağlıklı insan numunelerinde bire sekiz dilüsyona kadar linearitede kayıp olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.6). Bire 16 dilüsyonda geri kazanım sonuçlarının istenen aralıkta olmaması, sağlıklı insanlardaki plazma EDP konsantrasyonunun yaşa bağlı değişmekle beraber, erişkin plazmasında 300-400 ng/ml ve serumunda EDP konsantrasyonunun 250-300 ng/ml dolaylarında olması, bize mevcut sonuçların standart eğrisinin en alt noktasına çok yakın olması ile ilişkili olabileceğini düşündürdü. EDP düzeyinin yüksek olduğu değerlerde daha doğru bir linearite elde edilmesi beklenmektedir.

Tampon çözeltisi ve bloklama için hazırlanan solüsyonun standart eğrisinin oluşumunda bağlanma yüzdesine etkisi linearitenin değerlendirilmesinde önem arz etmektedir. Bir plakada farklı BSA konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan iki ayrı standartta gözlemlendiği üzere standardın bağlanma yüzdesinde kayda değer bir fark olmadığı fakat linearite test edilirkenki geri kazanım yüzdesinde farklı değerlere neden olduğu gözlemlenmiştir. Serum ve plazma numuneleri için ayrı iki plakada aynı

sağlıklı kişinin plazma ve serumları ile en az üç alikotla yapılan deneylerle dilüsyonlar test edilmiştir (Tablo 4.4).

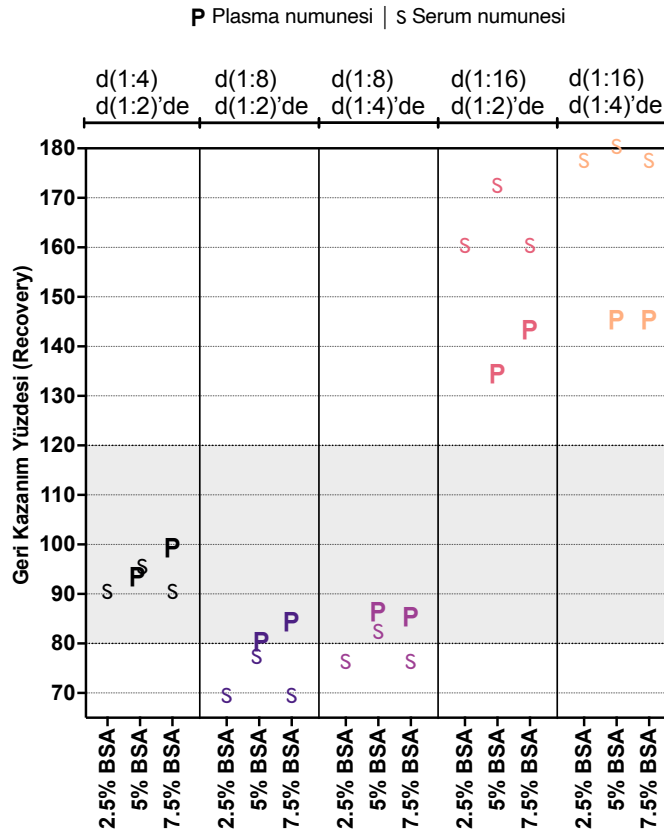
Deneylelerdeki %2,5 ila %7,5 arasındaki oranlarda hazırlanan BSA ile tamponlar iki farklı standart eğrisi ve plazma/serum örnekleri için de ayrı ayrı kullanıldı. BSA'nın %7,5 oranında kullanıldığı deneylerde dilüsyonel linearitede elde edilen geri kazanım yüzdeleri bire sekize kadar seyreltilen numunelerde %80-120 arasında izlenmiştir.

Tablo 4.4'te elde edilen güvenilir tekrarlanabilirliği ifade eden geri kazanım yüzdelerinin %7,5 BSA'da daha iyi olduğunun gözlenmesinden hareketle, 6 noktalı standart eğrisi kullanılarak farklı BSA konsantrasyonları serum ve plazma numuneleri için ayrı ayrı denendi (Şekil 4.6).

Tablo 4.4. Bir plakada %2,5, %5 ve %7,5 BSA ile hazırlanan tamponlarla yapılan deneylerdeki dilüsyonel linearitede elde edilen geri kazanım yüzdeleri ve karşılaştırılması

HAE (ng/ml)	%B/Bo	6 noktalı Standart ve %5 BSA tamponu	Tampon: %7,5 BSA ile hazırlandı.					6 noktalı Standart ve %7,5 BSA tamponu	HAE (ng/ml)	%B/Bo
2700	13,3		Neat	64	67	63	97		2700	12,2
900	26,8		63	1:2	104	98	153		900	25,3
300	49,5		58	93	1:4	94	146		300	46,3
100	69,3		50	80	86	1:8	155		100	65,4
33,3	84,7		84	134	145	168	1:16		33,3	79,3
11,1	93,0		Tampon: %5 BSA ile hazırlandı.						11,1	89,8
B0	100		Plazmada dilüsyonlar arası geri kazanım yüzdeleri						B0	100

HAE (ng/ml)	%B/Bo	6 noktalı Standart ve %5 BSA tamponu	Tampon: %2,5 BSA ile hazırlandı.					6 noktalı Standart ve %2,5 BSA tamponu	HAE (ng/ml)	%B/Bo
2700	18,9		Neat	88	79	60	140		2700	18,9
900	36,7		105	1:2	90	69	160		900	36,1
300	58,0		99	95	1:4	76	177		300	59,5
100	76,6		81	77	82	1:8	232		100	79,6
33,3	87,1		180	172	181	222	1:16		33,3	90,4
11,1	90,2		Tampon: %5 BSA ile hazırlandı.						11,1	95,0
B0	100		Serumda dilüsyonlar arası geri kazanım yüzdeleri						B0	100



Şekil 4.6. Tampon içeriğinin farklı BSA konsantrasyonlarında plazma ve serum için dilüsyonel linearite ölçütünün değerlendirilmesi

4.1.6. Birincil Antikor/Yakalama Antikoru/Capture Antibody (Pab)

Elastin, tropoelastinlerin çapraz bağlanması sonucu oluşur. İnsan, sığır, fare ve civciv tropoelastinlerinin cDNA dizilerinden çıkarılan tam amino asit dizileri, alanin ve lizin bakımından zengin çapraz bağlar ve hidrofobik alanlar taşıdıklarını göstermektedir. Tropoelastinde, birkaç hidrofobik sekans test edilen monoklonal ve poliklonal antikorlar tarafından baskın epitoplara olarak tanımlanmış ve alanin ve lizin kalıntıları içeren bazı diziler de epitop olarak rapor edilmiştir [107]. Bu yüzden elastin fiberlerini daha iyi yakalayabilmek için hem elastinin prekürsörü olan tropoelastine hem de degradasyon ürünü α -elastine bağlanabilen spesifik bir poliklonal antikor kullanılmasına karar verilmiş ve analit olarak insan aortasından elde edilen tropoelastinin (HA587, Elastin Products Company, INC) ve yarışma fazını yüksek özgüllükle bağlayabilmesi için pAb olarak poliklonal anti-tropoelastin

(PR398, Elastin Products Company, INC) antikorunun kullanıldığı deneyler dizayn edilmiştir.

4.1.6.1. Birincil Antikorun Konsantrasyonun Optimizasyonu

Optimizasyon deneylerine ilk olarak farklı pAB konsantrasyonunda/dilüsyonunda bağlanma yüzdeleri arasındaki farkın görülmesi ile başlandı. Tablo 4.2’de görüleceği üzere birincil antikorun kullanımında farklı konsantrasyonlar denenerek optimum bağlanma yüzdesine ulaşmak hedeflendi. Bu amaçla son satranç tahtası dilüsyonu ile 1:15000 hazırlanıp standart/numune ile karıştırıldıktan (Şekil 4.2) sonra 1:25000 final dilüsyona düşen pAb derişimi ile 1.25 µg/ml kuyucukla kaplanmış 6 standartlı ve dilüsyon faktörünün 3 olarak kullanıldığı bir deneyde %10 ila %90 arasında bağlanma yüzdeleri elde edilmiştir (Şekil 4.4).

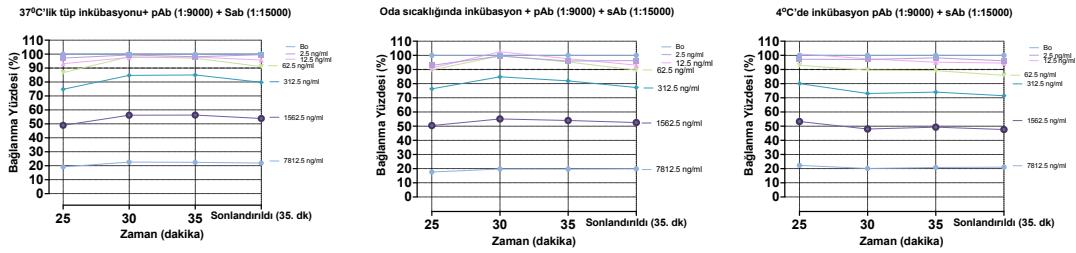
4.1.6.2. Birincil Antikorun Tüp İnkübasyonunun Optimizasyonu

Birincil antikorun inkübasyonunda zamanın yanında sıcaklık ve mobilizasyonun da etkisi farklı deneylerde değerlendirilmiştir. İlk protokolda 4°C’de gece boyu inkübasyon seçilmişti. Fakat bu sürenin afinitesi çok yüksek olan anti-tropoelastin için uzun bir süre olduğu düşünülerek deney süresini kısaltmak adına farklı inkübasyonlar denenmiştir. Hem birincil hem de ikincil antikorların (sAb) mini satranç tahtası dilüsyonu ile farklı dilüsyonları iki plakada aynı anda farklı inkübasyonlarda test edildi. Birincil antikorun 1:3000-1:6000 dilüsyonları ikincil antikorların 1:5000-1:10000-1:15000 dilüsyonlarında her plakada 6 farklı standart oluşturularak test edildi (Tablo 4.5). Deneyden elde edilen verilere göre, çalkalayıcıda gerçekleştirilen inkübasyon sıcaklığının 4°C de olsa yüksek OD değerlerine sebebiyet verdiği ve yüksek bağlanma yüzdelerinin deneyin duyarlılığını negatif etkilediği gösterildi. Bu yüzden de çalkalayıcı yerine sıcaklığın moleküler düzeyde oluşturacağı mobilizasyon etkisinden faydalanılmasına karar verildi. Uygulanabilirlik açısından da her laboratuvarında 4°C’de çalkalayıcı imkânı bulmak zor olduğu için çalkalayıcı ile deneylere devam edilmedi.

Tablo 4.5. Eş zamanlı iki farklı plakada pAb inkübasyonunun durağan ve çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirilmesi

Plaka-1 / Durağan inkübasyon (4°C)						Plaka-2 / Çalkalayıcıda inkübasyon (4°C)					
pAb (1:3000) + sAb (1:15000)			pAb (1:6000) + sAb (1:15000)			pAb (1:3000) + sAb (1:15000)			pAb (1:6000) + sAb (1:15000)		
Ort, OD	HAE	Bo/%B	Bo/%B	Ort, OD	HAE	Ort, OD	HAE	Bo/%B	Bo/%B	Ort, OD	HAE
1,59	0	100,0	100,0	1,27	0	2,60	0	100,0	100,0	2,23	0
1,49	0,5	93,4	101,0	1,29	0,5	2,48	0,5	95,6	100,6	2,25	0,5
1,45	2,5	91,0	100,5	1,28	2,5	2,47	2,5	95,1	100,3	2,24	2,5
1,43	12,5	89,8	100,5	1,28	12,5	2,41	12,5	92,7	99,6	2,23	12,5
1,32	62,5	83,0	95,0	1,21	62,5	2,34	62,5	89,9	94,5	2,11	62,5
1,21	312,5	75,7	85,8	1,09	312,5	2,13	312,5	81,7	83,7	1,87	312,5

Tasarlanan bir başka deneyde tüp inkübasyonunun farklı sıcaklık koşullarında bağlanma yüzdesine etkisi değerlendirilmiştir. Bu bağlamda 2 saatlik oda sıcaklığı ve 37°C inkübasyonu ve >12 saatlik 4°C'teki tüplerin inkübasyonları karşılaştırıldı (Şekil 4.7). Gece boyu 4°C'de inkübasyonun ilk deney protokolünde kullanılan inkübasyon olması nedeniyle deneyi kısaltmak üzere 2 saatlik moleküler mobilizasyonun sıcaklıkla artırılarak zamandan tasarruf edilmesi amaçlanmıştır. Her standardın $R^2 > 0,999$ olduğu bu deneyde bağlanma yüzdeleri hemen hemen aynı olduğu için oda sıcaklığında 2 saatlik inkübasyonla devam edilmiştir.



Şekil 4.7. Gece boyu 4°C'de ve oda sıcaklığında ve 37°C'de iki saatlik tüp inkübasyonlarının ardından eş zamanlı aynı plakaya transferiyle tüp inkübasyonlarının karşılaştırılması

Kaplama sonrası yıkama, 1 saatlik 37°C'de bloklama periyodu sonrası tekrar yıkama yapıldığı için, zaman tasarrufu sağlanmak istenmesi nedeniyle 1,5 saatlik inkübasyonun daha uygun olacağı düşünülerek iki ayrı plakada 1,5 saatlik ve 2 saatlik iki ayrı tüp inkübasyonu karşılaştırılmıştır. Bu deneyde de bir sağlıklı kontrol plazmasının 12 tüpte değerlendirildiği *intra-assay CV* yüzdeleri üzerinden

validasyon da değerlendirilmiştir (Tablo 4.6). Deneyde 0.75 µg/ml HAE ile kaplamanın yapıldığı pAb'in 1:9000 ve sAb'nin 1:15000 dilüsyonlarında aynı protokol ve aynı plazma örnekleri ile 1,5 saatlik ve 2 saatlik tüp inkübasyonlarda her ne kadar $R^2 > 0,996$ üzerinde hesaplanırsa da, *intra-assay CV* değerleri yüksek bulunmuştur. Yine de 1,5 saatlik inkübasyonun daha kısa olması ve daha düşük bağlanma yüzdesi sağlaması nedeniyle 1,5 saatlik tüp inkübasyonu ile deneylere devam edilmiştir.

Tablo 4.6. Tüp inkübasyonlarının 2 saatlik ve 1,5 saatlik sürelerdeki bağlanma yüzdelerinin karşılaştırılması ve *intra-assay CV* yüzdelere etkisi

	2 saat tüp inkübasyonu			1,5 saat tüp inkübasyonu		
	Net Ort OD	HAE (ng/ml)	%B/Bo	Net Ort OD	HAE (ng/ml)	%B/Bo
	0,19	1600	16,4	0,11	1600	10,9
	0,50	320	43,3	0,30	320	29,5
	0,96	64	82,4	0,78	64	76,8
	1,08	12,8	92,5	0,96	12,8	94,6
	1,18	2,56	101,5	0,99	2,56	97,7
	1,18	0,512	101,8	1,01	0,512	99,9
	1,16	Bo	100,0	1,01	Bo	100,0
	Ortalama	StD	CV (%)	Ortalama	StD	CV (%)
Plazma-1	53,3	21,2	39,7	48,3	12,3	25,5
Plazma-2	63,4	12,0	18,9	54,8	11,5	20,9
Plazma-3	66,1	16,2	24,5	51,1	13,9	27,3

(StD: standart sapma)

4.1.6.3. Birincil Antikorun Plaka İnkübasyonunun Optimizasyonu

Tüp inkübasyonunun ardından çözeltilerin tüpden plakalara aktarılması ve boşta kalan antikorların kuyucuklarda önceden tutturulmuş HAE'lere bağlanması deneyin en önemli basamaklarından biridir. Bu noktada literatürde genellikle tercih edilen 1 saatlik oda sıcaklığı inkübasyonu, önceki protokolda kullanılan gecelik 4°C'de inkübasyon ile kıyaslandı. Bu deneyde iki farklı pAb dilüsyonunda standart eğrisini oluşturan konsantrasyonlardan en düşüğün %90'lık eşğin altında kalması ve genel pAb doygunluğunun daha az olması gözetildi. Gecelik 4°C'deki inkübasyonun anlamlı olarak 62.5 ng/ml'in ayırımında kullanılabileceği ve gene bağlanma yüzdesinin daha düşük olduğu görüldü. Oda sıcaklığında 1 saatlik inkübasyonda

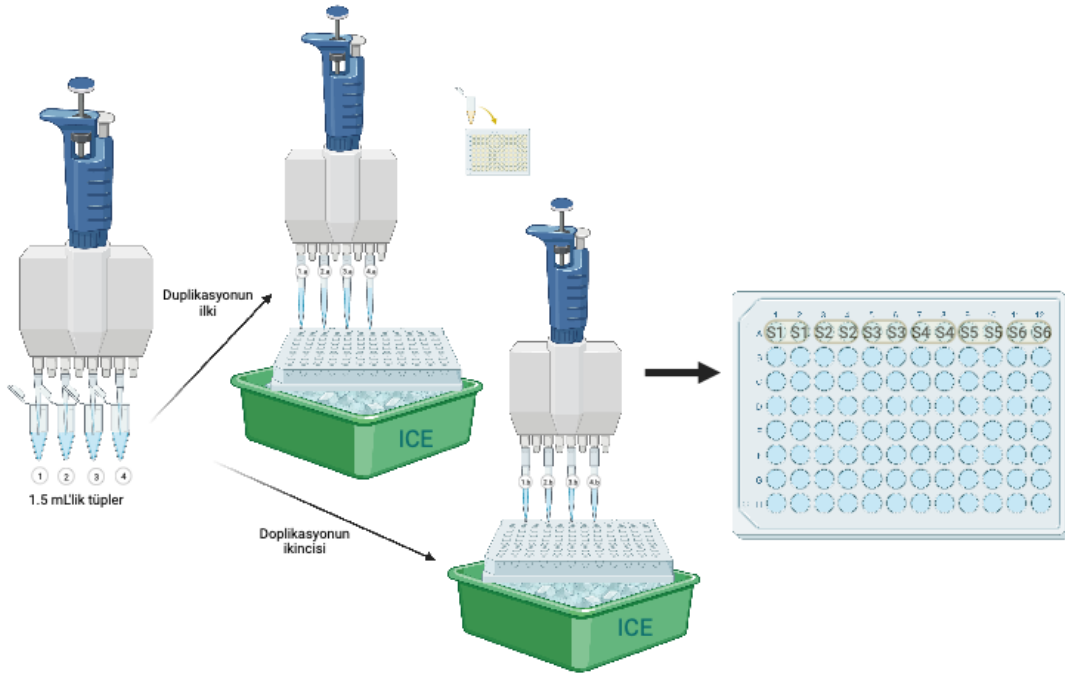
özgül olmayan bağlanmaların daha fazla olacağı da göz önüne alınarak gecelik 4°C’de inkübasyonla devam edildi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. pAb’nin 1:9000 ve 1:12000 derişimleri plakaya aktarıldıktan sonra gecelik 4°C inkübasyon ve 1 saatlik oda sıcaklığındaki inkübasyonla kıyaslanması

<i>pAb (1:9,000) + sAb (1:15,000)</i>					
1 saat, oda sıcaklığında			>12 saat, 4°C’de		
Ort. OD	HAE (ng/ml)	%B/Bo	Ort. OD	HAE (ng/ml)	%B/Bo
1,37	0	100,0	1,50	0	100
1,38	2,5	100,7	1,44	2,5	95,8
1,39	12,5	101,2	1,40	12,5	91,6
1,28	62,5	93,5	1,23	62,5	83,3
1,19	312,5	87,2	1,02	312,5	70,1
<i>pAb (1:12,000) + sAb (1:15000)</i>					
1 saat, oda sıcaklığında			>12 saat, 4°C’de		
Ort. OD	HAE (ng/ml)	%B/Bo	Ort. OD	HAE (ng/ml)	%B/Bo
1,2541	0	100,0	1,51	0	100,0
1,27745	2,5	101,9	1,50	2,5	99,3
1,2048	12,5	96,1	1,39	12,5	92,5
1,20935	62,5	96,4	1,25	62,5	83,3
1,0461	312,5	83,4	0,98	312,5	65,2

Tüm plakadaki kuyucukların kullanıldığı bir deneyde, numune ve pAb’nin beraber inkübe edildiği 48 tüpten örnekler inkübasyonu takiben duplikasyonla 96’lık plakadaki kuyucuklara aktarılmaktadır. Tecrübeli bir uygulayıcıda dahi bu aktarımı minimum 45 dakikada yapabilmektedir. Tüplerin 1,5 saatlik oda sıcaklığındaki inkübasyonunun aslında 90+45=135 dakikaya kadar uzayacağı ve bunun da Tablo 13’de görüleceği üzere farklı inkübasyon sürelerinde farklı bağlanma yüzdeleri oluşturacağı ve doğal olarak kolorimetrik sinyal alımında farklı ölçümlere sebebiyet vererek *intra-assay CV* değerlerini arttıracığı anlaşılmıştır. Bu nedenle plakaya pAb’lar eklendikten sonra 4°C’de inkübasyona karar verildikten sonra tüpten plakaya transfer işlemi buz üzerinde gerçekleştirilmeye başlandı. Şekil 4.8’de gösterildiği gibi, bu tüpten plakaya transfer sürecinde duplikasyon yapılarak ilerlendiği için işlem buz üzerinde gerçekleştirilmeye başlandı.

Bir diğ er önemli nokta da tüp de inkübasyonun başlangıcı olarak standart ve numunelerin pAb ile bulunduğu andır. Tüplerin mümkün merteye aynı anda inkübasyonlarını başlatıp aynı anda inkübasyonlarını sonlandırmak tüpler arasındaki eşit olmayan inkübasyon süresi kaynaklı farklı sonuç alma ihtimalini en aza indirmiştir. Bu amaçla çok kanallı pipetler plakaya ve tüpe uyarlanarak kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca transfer işlemini kısaltmak üzere deneyin bu kısmına da 1,5 mL'lik ependorf tüplere uygun olacak şekilde çok kanallı pipet kullanımıyla 48 tüpten 96 kuyucuklu plakaya aktarım işlemi 10 dakika altına çekilmiş oldu. Bu iki uygulama sonrası intra-assay CV yüzdeleri %30'lardan %10'un altına kadar indirilmiş oldu.



Şekil 4.8. pAb'nin tüpteki inkübasyonunun ardından plakalara transfer işlemi

4.1.6.4. Tüp İnkübasyonuna Giren Pab Solüsyonunun Hacminin Optimizasyonu

Numune ve pAb'nin beraber inkübe edildiği tüpten plakadaki kuyucuklara aktarılırken yapılan deneyler Şekil 4.5 ve Tablo 4.3'da özetlenmiştir. Buna göre tüpte inkübe edilen solüsyonun %91'lik kısmının plakaya duplike edilerek transferinde 2x60 l ile 2x57 µl arasında fark olmamasından ve son protokolde 125 µl hazırlanan

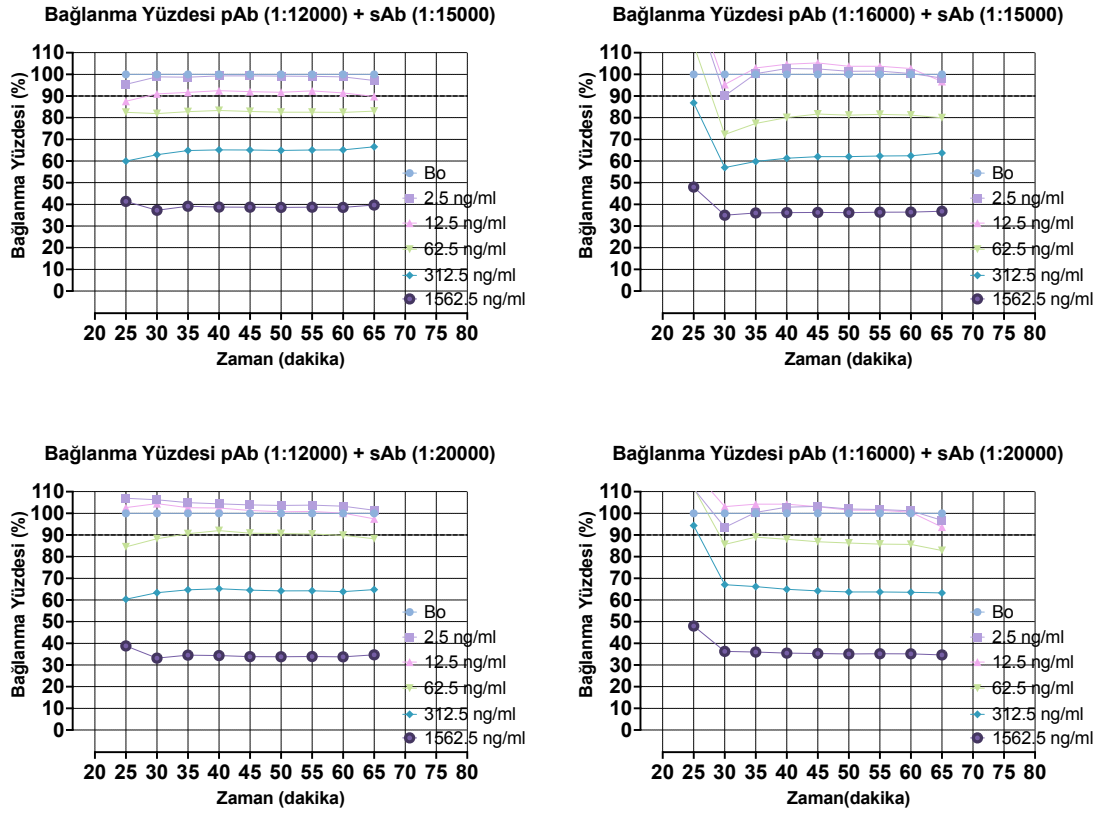
inkübasyon solüsyonunun hesaplama kolaylığından dolayı; 50 µl standart/numune, d(1:15000) dölüsyondaki 75 µl'lik pAb içeren solüsyonla karıştırılarak tüp inkübasyonuna alınarak optimizasyonu tamamlanmıştır.

4.1.7. İkincil Antikor/Saptama Antikoru/Detection Antibody (sAb)'nin Optimizasyonu

Keçilere tavşan antijeni verilerek üretilen poliklonal bir antikor olan ve HRP ile konjuge edilen Abcam (ab97080) ikincil antikor olarak seçildi. İmmünglobulinler dışında bir proteinle bağlanma göstermediğinden ve seçilen pAb'ye afinitesi de yeterli olduğundan optimizasyonda kullanıldı.

4.1.7.1. İkincil Antikorumun Konsantrasyonunun Optimizasyonu

İlk protokolde saptama antikorumun 1:5000 dilüsyonda kullanımının yüksek OD değerleri oluşturması ve Abcam'ın ELISA için önerilen dilüsyonlarından daha konsantre kullanımı dolayısıyla satranç tahtası dilüsyonu yöntemiyle karşılaştırmalar yapılmıştır. Kuyucuğa tutturulmuş birincil antikorlarla non-kovalent bağ kurulması farklı inkübasyon yöntemleri de denenerek test edildi. Şekil 4.9'dan anlaşılacağı üzere primer antikorumun 1:12000 ve 1:16000 dilüsyonları ile ikincil antikorumun 1:15000 ve 1:20000 dilüsyonlarının kullanıldığı deneyde, ABTS substratının eklenmesinden durdurma solüsyonu (0.625 M Okzalik asit) eklenmesine kadar geçen sürede 405 nm'de tekrarlayan okumalar yapılarak bağlanma yüzdelерinin substrat reaksiyonuyla ilişkisi incelendi. Reaksiyonun 35. dakikasından sonra neredeyse bağlanma yüzdesinin değişmediği gözlemlendi. sAb'nin 1:15000 dölüsyonunda uygun bağlanma yüzdesi ve net OD değerleri elde edilmesinden ötürü 1:15000 dilüsyonda devam edilme kararı alındı.



Şekil 4.9. Farklı pAb ve sAb dilüsyonlarında bağlanma yüzdelерinin substrat eklenmesinden reaksiyonun durma süresine kadar zaman içerisindeki değişimi

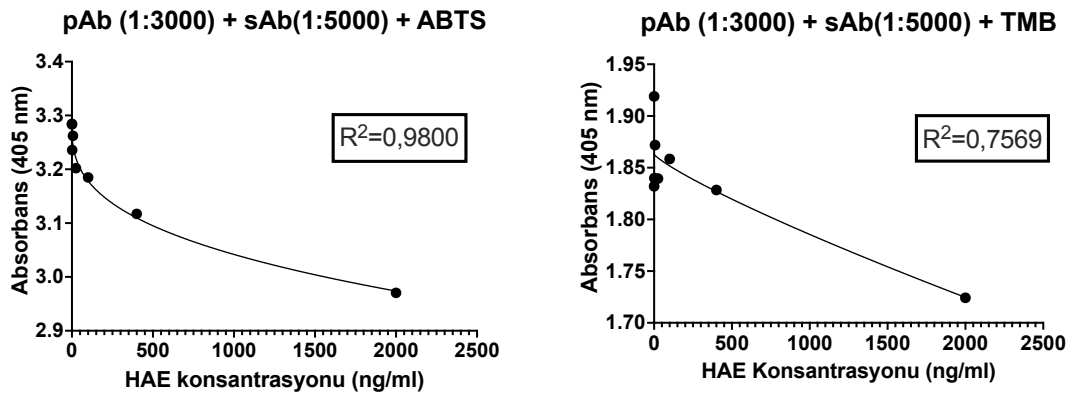
4.1.7.2. İkincil Antikorun Tüp İnkübasyonunun Optimizasyonu

İkincil antikorun inkübasyon zamanının yanında sıcaklık ve mobilizasyonun da etkisi farklı deneylerde değerlendirilmiştir. İlk protokolde 37°C’de 1 saatlik inkübasyonun 405 nm’deki ölçümlerde yüksek OD değeri oluşturduğu görüldüğünden farklı inkübasyon şartlarındaki deneylerle inkübasyonun optimizasyonu sağlanmaya çalışıldı. İkincil antikorların en uygun konsantrasyonu olarak 1:15000 dilüsyon belirlendikten sonra 2,5 saatlik oda sıcaklığı, bir saatlik oda sıcaklığı inkübasyonunun yanında bir saatlik oda sıcaklığında çalkalayıcı yardımıyla çözeltiye mobilite kazandırılan inkübasyon modelleri karşılaştırıldı. Oda sıcaklığında bir saatlik inkübasyonun yeterli olduğu ve çalkalayıcının ve 2,5 saatlik inkübasyonun yüksek OD değeri kazandırmasından ötürü bir saatlik oda sıcaklığında sAb’nin inkübasyonu ile devam edildi.

4.1.8. Konjugat Reaksiyonunun Optimizasyonu

4.1.8.1. Substrat Seçimi

Analit ve antikor konsantrasyonlarının son halini almadan önceki deneylerde, ABTS ve TMB substrat olarak test edildi. Protokolde kullanılan Abcam ab97080 katalog numaralı HRP (Horseradish Peroxidase) enzimi için uygun substrat olarak TMB ve ABTS yapısındaki substratlar karşılaştırıldı. ABTS içeren *Super AquaBlue* kullanımında aynı şartlardaki TMB kullanımına göre yüksek OD değeri olsa da standart eğrisi oluşumunda daha tutarlı davrandığı görüldü. Standart eğrisini oluşturan konsantrasyonların temsil ettiği bağlanma yüzdesindeki farkların düşük olmasına ve yüksek OD değerlerine rağmen ABTS'nin konjugat ile uyum içinde çalıştığı gösterildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Optimizasyonun erken safhalarında yapılan deneyde ABTS ve TMB'nin karşılaştırılması

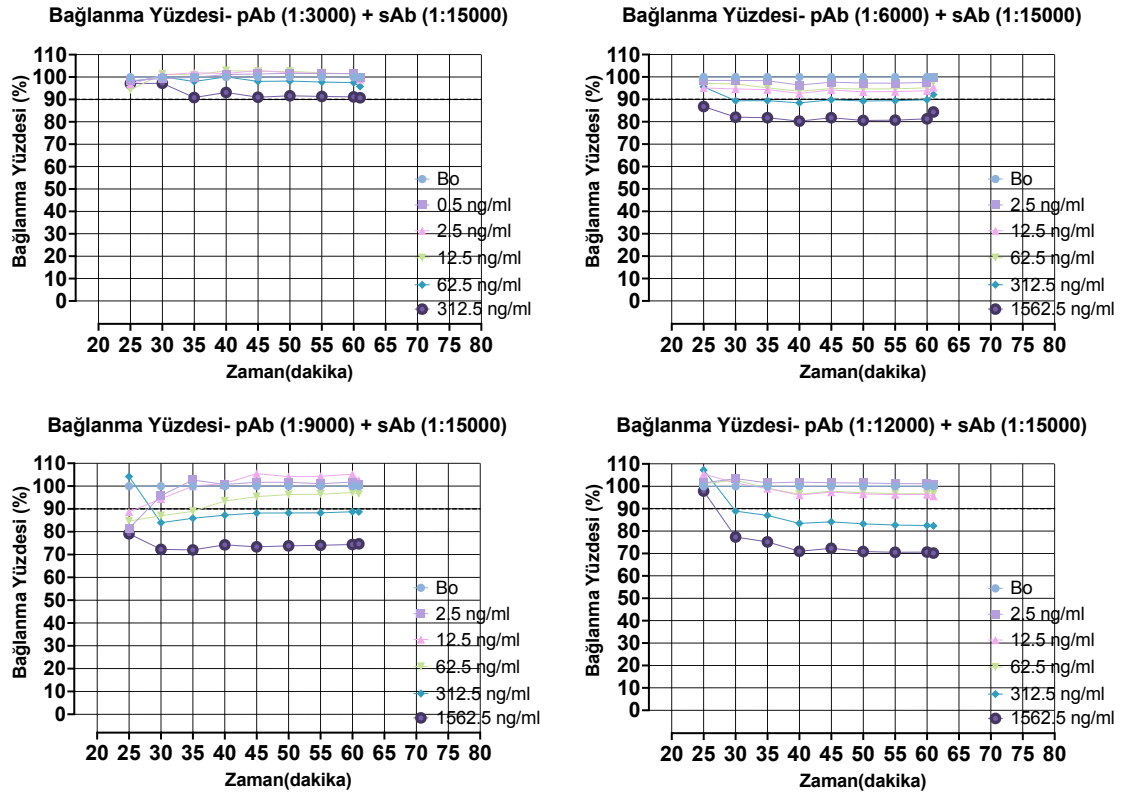
4.1.8.2. Substrat Hacminin Optimizasyonu

Substrat olarak kullanılan ABTS içeriğindeki Super AquaBlue kuyucuğun tabanından 50 µL'lik hacime kadar bölgeyi kapladığı için birincil ve ikincil antikorların analite bağlanması da bu bölgede gerçekleşmektedir. Kuyucuğun geri kalan kısmında ikincil antikor bağlanması olmayacağı için yüksek hacim kullanımı sadece kolorimetrik değişimde renk skalasında dilüsyon farkını yansıtacaktır. Maliyet etkinliği hesaba katıldığında minimum hacimlerde substrat kullanımı uygundur. Başlangıçta kullanılan 100 µL'lik substrat ile 75 µL'lik substrat kullanımı

karşılaştırıldığında hassasiyetin etkilenmediği görülmüş ve 75 µL'lik Super AquaBlue ve aynı hacimde 0.625 M'lık okzalik asit ile reaksiyon sonlandırılmıştır.

4.1.8.3. Reaksiyonun Durdurulma Zamanının Optimizasyonu

Bağlanma yüzdesi yarışmalı ELISA protokollerinde bağlanma yüzdesini göstermek için ihtiyaç duyulan negatif kontrole göre göreceli oran (%B/B₀) konjugat-substat arasındaki reaksiyon süresi ile doğrudan ilişkilidir. Şekil 4.11'de görüleceği üzere, 4 µg/ml HAE ile kuyucukların kaplandığı bir deneyde satranç tahtası titrasyonu uygulanmış ve birincil antikor 1:3000 ile 1:12000 arasında titre edilerek, ikincil antikorun 1:15000 dilüsyonunda, durdurma solüsyonunun eklenmeden önce her 5 dakikalık aralıklardaki okumalarla bağlanma yüzdesinin görülmesi ve uygun dinamik OD aralığı için reaksiyonun yeterli süre devam ettirilmesi amaçlanmıştır. Birincil antikor ve analit arasındaki yarışmanın hassasiyetini ve tekrarlanabilirliğini arttırmak için standardın düşük konsantrasyonlarındaki bağlanma yüzdesinin %90'ın altına indirilmesi ve standardın belirlenen konsantrasyonlar arasındaki bağlanma yüzdesi farkının en az %10 olması hedeflenmiştir. Deneyden elde edilen sonuca göre birincil antikorun düşük dilüsyonlarında bağlanma yüzdelерinin 40. dakikadan sonra neredeyse sabit kaldığı, 40.dakikadan sonra reaksiyonun devamına izin vermenin bağlanma yüzdesinde değişiklik olmasa da yüksek OD'ye neden olduğu görülmüştür. Ayrıca 60. dakikada 75 µl eklenen 0.625 M'lık okzalik asid yapısındaki ABTS durdurma solüsyonunun belirgin renk değişikliğine neden olmadığı ve bağlanma yüzdesinin etkilenmediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.11. Farklı pAb dilüsyonlarında, 1:15000 dilüsyondaki sAb'nin bağlanma yüzdesinin substrat eklenmesinden reaksiyonun durma süresine kadar geçen zaman içerisindeki değişimi

4.1.9. Kolorimetrik Ölçüm

ThermoFischer Scientific tarafından üretilen ABTS yapısındaki Super AquaBlue'da önerilen ölçüm dalga boyu 405 nm'dir. Literatürde farklı dalga boylarında ölçüm yapıldığından, dalga boyu olarak 405 nm, 450 nm, 490 nm ve 650 nm'de ölçümler ayrı ayrı aynı plaka kullanılarak test edilmiş ve en iyi standart eğrisine üretici önerisi olan 405 nm'deki spektrofotometre ile yapılan kolorimetrik ölçümde ulaşılmıştır.

4.1.10 Deneyin Validasyonu

Deneyin optimizasyonu esnasında R^2 değeri 0,99 değerine ulaştıktan sonra optimizasyonun tüm basamaklarında validasyon deneyleri tekrarlanmış ve yukarıda her basamağın optimizasyonunu temsil eden validasyon verileri de verilmiştir.

- *Linearite (Doğrusallık)*: Bir ELISA'nın linearitesi, "numunedeki analit konsantrasyonu ile dilüsyonlar arasında doğru orantılı sonuçlar" gösterme kabiliyeti olarak açıklanabilir.

Optimizasyon yapılırken serum ve plazma numunelerindeki linearite değerleri Tablo 4.4'te özetlenmiştir. Plazma ve serumda bire sekiz dilüsyonda dahi güvenilir geri kazanım yüzdeleri sağlanmıştır.

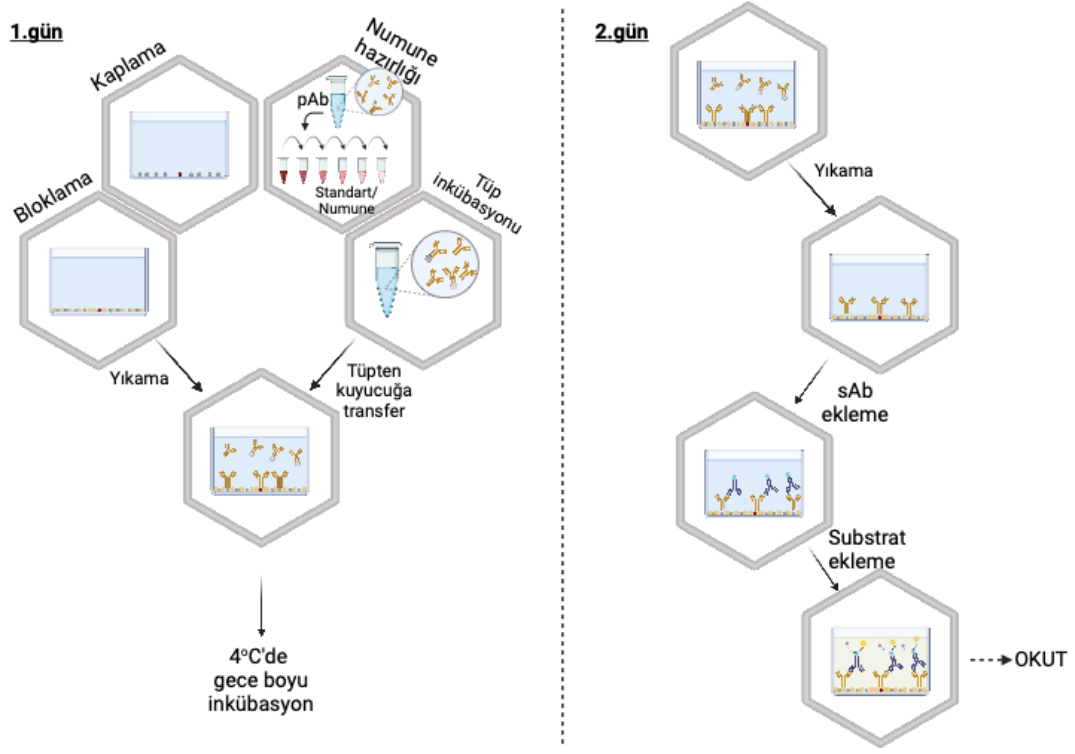
- *Keskinlik*: Bu optimize protokolda serum örneklerinde *intra-Assay CV* %1,96 ve *inter-Assay CV* %7,64 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.8). Validasyonda incelenen diğer linearitedeki geri kazanım yüzdeleri Şekil 4.6'da özetlenmiştir.

Tablo 4.8. Optimize deneyde validasyon için tekrarlanan deney sayısı ve serum için elde edilen *intra-assay* ve *inter-assay CV* değerleri

n	Intra-Assay CV (%)	Inter-Assay CV (%)
8	1,96	7,64

Optimizasyon ve validasyon sürecinin ardından tamamlanan yarışmalı ELISA protokolü ile sağlıklı kontrol grubunun serumları, ağır COVID pnömonili pozitif kontrol grubunun serum numuneleri ve hedef kohortumuz olan MIS-C'li hastaların serum numuneleri çalışıldı.

4.1.11. Deney Protokolünün Özeti



Şekil 4.12. Optimize edilmiş ve tekrarlanabilirliği sınanmış EDP için yarışmalı ELISA protokolünün şematik özeti (biorender.com'da hazırlanmıştır)

Yarışmalı ELISA protokolünün optimizasyonla beraber eş zamanlı yürütülen validasyon neticesindeki nihai şeması (Şekil 4.12) ve deneyde kullanılan kimyasallar ve inkübasyonları Tablo 4.9'da özetlenmiştir.

Tablo 4.9. EDP tespitinde optimize ve valide edilen yarışmalı indirekt ELISA protokolünde kullanılanların derişimleri ve inkübasyon şartlarının özeti

EDP için indirekt ELISA protokolü			
Standart/Numunenin hazırlanması			
Kaplama solüsyonu	1. Gün	50 uL HAE (1.25 ug/mL)	
Kaplamadaki inkübasyon		Oda sıcaklığında 2 saat	
Bloklama tamponu		PBST TW % 0,05- BSA % 5	
Bloklama inkübasyonu		37°C’de 1 saat	
Deney tamponu		PBST TW % 0,05- BSA % 7,5	
Dilüsyon faktörü		3 2700 ile 11.1 ng/ml arası B ₀ /B% (15→90)	
Standart/Numune ve pAb’un tüp inkübasyonu hacimleri		1:2,5 50+75 uL	
pAb ile tüp inkübasyonu		Oda sıcaklığında 1,5 saat	
pAb’un dilüsyonu		1:25,000	
pAb ile plaka inkübasyonu		4°C’de 18 saat	
pAb’un dilüsyonu		1:15,000	
sAb ile plaka inkübasyonu		Oda sıcaklığında 1 saat	
Substrat		2. Gün	75 uL ABTS
Durdurma solüsyonu			75 uL Okzalik Acid
Okuma	405nm’de 40.dk		

4.2. Klinik Özellikler

Kontrol grubundaki sağlıklı çocukların ortanca yaşları 7 (IQR,5-12) yıld ve 28 erkek ve 28 kızdan oluşuyorlardı. Aktif enfeksiyonları ve kronik hastalıkları yoktu.

SARS-CoV-2’ye bağlı ağır pmömonileri olan kontrol grubundaki çocukların ortanca yaşları ise 15 (IQR,7-16) yıld ve 9 hastanın 4’ü erkekti. Bu dokuz hastadan

sadece bir tanesinin altta yatan hastalığı yokken, üçünün obezitesi vardı. Diğer hastalardan ikisi Down sendromu, biri GM1 gangliosidoz, biri mukolipidoz tip II (I-cell) ve biri de serebral palsi hastasıydı.

4.2.1. MIS-C'li hastaların klinik özellikleri

Çalışmaya toplamda 90 MIS-C tanısı olan hasta dahil edilmiştir. Hastaların hepsi DSÖ'nün tanı kriterlerini karşılamaktaydı. Klinik fenotiplerine göre ayrıldığında 19 (%23) hasta ateş - inflamasyon, 34 (%36) hasta KH benzeri klinik ve 37 (%40) hasta şok ile başvurmuştur.

MIS-C'li hastaların başvurularındaki ortalama yaşları 8 olup KH benzeri fenotipe sahip hastaların 5 yıl ve şok ile başvuranların 11 yıl idi ($p < 0,001$). Erkek cinsiyet tüm fenotiplerde daha sıklıkla ve toplamda 54 (% 60) hasta erkekti.

Üç hastada SARS-CoV-2 PCR testi pozitif iken, tüm hastalarda COVID ELISA IgG pozitifliği tespit edildi. Ayrıca hastaların büyük bir kısmına acil tedavi başlanması gerekliliği ya da ELISA testinin sonucunun gecikecek olması nedeniyle hızlı antijen testi de yapılmış ve 73 / 74 (99%) oranında sonuçların pozitif olduğu tespit edilmiştir.

Hastalarda ateş süresi ortanca 5 gün (IQR,5-7) olup, %80 oranında pürülan olmayan konjonktivit, %61 oranında vücutta döküntü, %67 oranında oro-mukozal değişiklik, %44 oranında servikal lenfadenopati (LAP) ve %13 oranında da ekstremitelerde ödem gibi değişiklikler vardı.

Hastaların organ tutulumlarına bakıldığında karın ağrısı, ishal, kusma ve diğer gastrointestinal semptomlardan herhangi birini gösteren hastalar %83 oranındaydı ve gastrointestinal sistemin en sık tutulan organ olarak öne çıktığı görülmekteydi. Baş ağrısı, bilinç değişikliği, miyalji ve diğer sinir sistemi semptomlarından birini gösteren hastalar %26 oranındaydı. Hematüri, proteinüri, steril piyüri ve akut böbrek hasarı (ABH) bulgularından birini gösteren hastalar ise %51 oranında olup sadece ABH oranı %16 olarak tespit edildi. Şokla gelen her üç hastadan birinde ABY mevcuttu. MIS-C'nin en önemli organ tutulumu olan kardiyovasküler sistem tutulumu; troponin veya BNP'de yükselme, hipotansiyonun olması ya da EKG veya EKO'da MIS-C'yi destekleyecek bulguların olması olarak belirlendiğinde, toplamda

hastaların %79'unda tutulumun olduğu; ayrıca ateş -inflamasyon fenotipinde hastaların yarısında, KH benzeri fenotipte her 4 hastanın üçünde ve şokta ise tüm hastalarda kardiyak tutulum varlığı gösterilmiştir.

MIS-C'nin en önemli komplikasyonlarından makrofaj aktivasyon sendromu (MAS) başvuru anında toplamda %20 oranında görülürken, şoklu hastalarda bu oran %35'ti (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. MIS-C hastalarının klinik özellikleri

MIS-C klinik özellikleri	Toplam, N = 90 ¹	Ateş - İnflamasyon, N = 19 ¹	KH benzeri, N = 34 ¹	Şok, N = 37 ¹	Ateş – İnf. vs KH	Ateş – İnf. vs Şok	KH vs Şok	P-değeri
Yaş (yıl)	8(4-12)	8 (2,5-11)	5 (3-9,5)	11 (8-14)	>0,9	0,084	<0,001	<0,001
Cinsiyet (E)	54 (%60)	14 (%74)	20 (%59)	20 (%54)	>0,9	0,7	>0,9	0,4
SYVP pozitifliği	6 (%6,7)	2 (%11)	4 (%12)	0 (%0)	>0,9	0,3	0,14	0,065
SARS-CoV-2 PCR (Negatif)	82 / 87 (%94)	18 / 19 (%95)	31 / 34 (%91)	33 / 34 (%97)	>0,9	>0,9	>0,9	0,8
Hızlı antijen testi (<i>Reaktif</i>)	73 / 74 (%99)	15 / 15 (%100)	28 / 28 (%100)	30 / 31 (%97)	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9
Covid-19 ELISA IgG (pozitif>1,1)	3,6 (2,6-7,9)	4,3 (2,8-7,4)	6,0 (2,5-8,7)	3,2 (2,0-6,3)	>0,9	0,6	0,5	0,3
Ateş	5 (4-7)	4 (2,5-6)	5 (4-7)	6 (4-7)	0,2	0,032	>0,9	0,028
KH kriterleri	3 (2-3)	2 (1-3)	3 (3-4)	3 (2-3)	<0,001	0,035	0,12	<0,001
Konjonktivit	72 (%80)	11 (%58)	30 (%88)	31 (%84)	0,052	0,2	>0,9	0,034
Döküntü	55 (%61)	9 (%47)	25 (%74)	21 (%57)	0,2	>0,9	0,6	0,13
Oromukozal değişiklik	60 (%67)	8 (%42)	29 (%85)	23 (%62)	0,005	0,5	0,10	0,005
Ekstremitte değişikliği	12 (%13)	0 (%0)	4 (%12)	8 (%22)	0,9	0,12	>0,9	0,068
Servikal LAP	40 (%44)	5 (%26)	22 (%65)	13 (%35)	0,031	>0,9	0,053	0,009
Kardiyak tutulum	71 (%79)	10 (%53)	25 (%74)	37 (%100)	0,4	<0,001	0,016	<0,001
GIS tutulumu	75 (%83)	14 (%74)	28 (%82)	33 (%89)	>0,9	0,7	>0,9	0,3
SSS tutulum	23 (%26)	4 (%21)	3 (%8,8)	16 (%43)	0,7	0,4	0,004	0,003
Renal tutulum	41 / 80 (%51)	8 / 18 (%44)	12 / 28 (%43)	21 / 34 (%62)	>0,9	0,8	0,6	0,3
Akut böbrek hasarı	14 / 88 (%16)	1 / 18 (%5,6)	1 / 34 (%2,9)	12 / 36 (%33)	>0,9	0,12	0,004	0,001
Artrit	2 (%2,2)	1 (%5,3)	1 (%2,9)	0 (%0)	>0,9	>0,9	>0,9	0,3
MAS	18 (%20)	1 (%5,3)	4 (%12)	13 (%35)	>0,9	0,062	0,081	0,011

n (%); Ortanca (IQR)

4.2.2. MIS-C'nin Laboratuvar Özellikleri

Hastaların hemogramları değerlendirildiğinde genel MIS-C özelliği olarak mutlak lenfosit sayısı $1100/ \text{mm}^3$ (IQR,700-1700) ve trombosit sayısı $164.000/\text{mm}^3$ (IQR,110.000-281.000) olup genel popülasyondan düşüktü. Şok hastalarında bu iki değer fenotipler arasında anlamlılık düzeyine ulaşmasa da (p değeri=0.073 ve 0.079, sırasıyla) daha düşüktü. İlâveten hastaların genel yaş ortalaması şok hastalarında daha yüksek olmasına rağmen hemoglobinin değeri şoklu hastalarda diğer fenotiplerden anlamlı düşüklüğüyle ayrılıyordu (p=0.003).

İnflamatuvar belirteçlere bakıldığında CRP, ferritin, ESH, prokalsitonin ve IL-6'daki yükselmeler dikkat çekiciydi. Bütün hastalarda ESH dışında tüm parametrelerde üst sınırın üstünde değerler tanıda görüldü. Hastalık ciddiyetinde, şokun önemli bir prezentasyon olması nedeniyle CRP, ferritin ve prokalsitonin şok hastalarında diğer fenotiplerle kıyaslandığında anlamlı düzeyde yüksekken, ESH ve IL-6'daki yükselmede fenotipler arasında anlamlı bir fark yoktu.

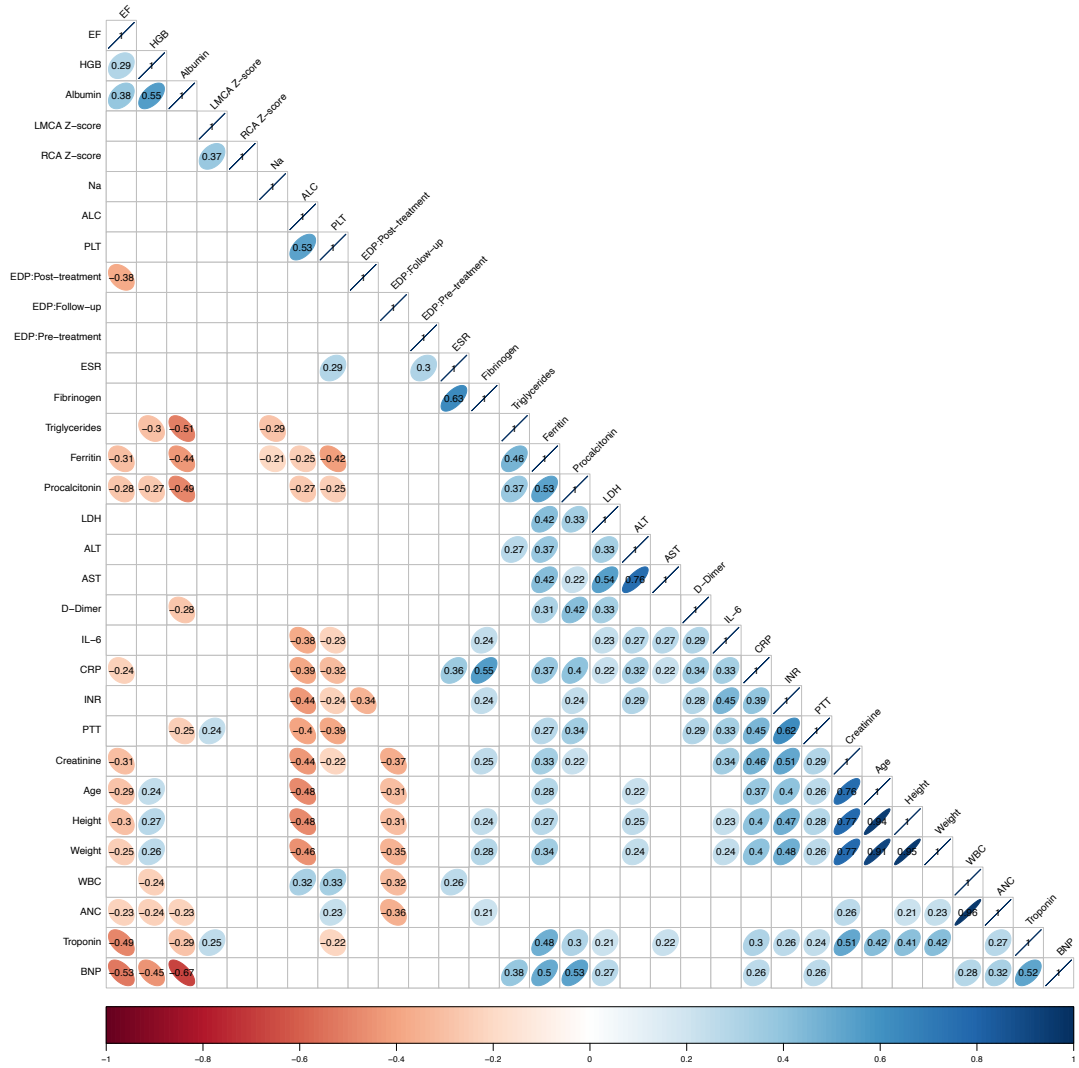
MIS-C'li hastaların biyokimyasal incelemesinde sodyum ve albümin düzeylerinde düşüklük dikkat çekiciydi. Şoklu hastalarda albüminin ortanca değeri 26,8 iken diğer fenotiplerde bu değer 33,3 g/L idi. LDH ve trigliseritteki yükselme grupları arasında anlamlı fark oluştursa da (p=0,031 ve 0,045, sırasıyla) grupları arasında belirleyici bir yükseklik farkı görülmedi.

Koagülasyon parametrelerinden INR, aPTT ve D-dimerde fenotipler arasında anlamlı fark varken, fibrinojendeki yükselme fenotipler arasında fark oluşturmamıştı. D-dimer düzeyi MIS-C hastalarında yüksek görülmüş olup, ateş & inflamasyondaki hastalarda diğer fenotiplerdekine kıyasla görece düşüklük anlamlıydı (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. MIS-C hastalarının laboratuvar özellikleri

MIS-C laboratuvar özellikleri	Toplam, N = 90 ¹	Ateş - İnflamasyon, N = 19 ¹	KH benzeri, N = 34 ¹	Şok, N = 37 ¹	Ateş – İnf. vs KH	Ateş – İnf. vs Şok	KH vs Şok	P-değeri
Lökosit (4,0-13,8 x 10 ⁹ /L)	10,1 (6,6-14,9)	10,5 (7,2-12,6)	8,4 (5,5-12,3)	12,1 (8,2-17,8)	0,6	0,7	0,015	0,018
Mutlak nötrofil sayısı (1,6-8,3 x 10 ⁹ /L)	7,8 (4,8-12,7)	7,6 (4,8-9,9)	6,2 (4,0-9,8)	10,8 (6,5-15,5)	>0,9	0,2	0,003	0,004
Mutlak lenfosit sayısı (1,3-5,8 x 10 ⁹ /L)	1,1 (0,7-1,7)	1,1 (0,7-2,4)	1,3 (0,8-2,0)	1,0 (0,7-1,3)	>0,9	0,8	0,051	0,073
Hemoglobin (102-127 g/L)	114 (105-123)	124 (112-134)	114 (107-122)	109 (97-117)	0,2	0,007	0,082	0,003
Platelet sayısı (189-394 x 10 ⁹ /L)	164(110-281)	204 (151-289)	165 (109-351)	154 (106-207)	>0,9	0,078	0,3	0,079
C-reaktif protein (<0,5 mg/L)	18,0 (9,1-25,7)	10,6 (8,2-23,7)	12,8 (7,7-21,4)	19,6 (16,8-28,3)	>0,9	0,2	0,017	0,018
Ferritin (5,3-99,9 ug/L)	367 (176-690)	182 (109-337)	278 (151-456)	693 (345-1,229)	0,7	<0,001	<0,001	<0,001
ESH (mm/sa)	40 (21-51)	31 (21-49)	41 (21-52)	41 (21-54)	>0,9	>0,9	>0,9	0,9
IL-6 (<6,4 pg/mL)	82 (26-170)	128 (44-188)	50 (19-135)	80 (40-195)	0,7	>0,9	0,7	0,3
Prokalsitonin (<0,1 ng/mL)	4,2 (1,7-13,1)	1,4 (0,7-11,0)	2,2 (1,0-5,7)	10,4 (3,7-22,9)	>0,9	0,005	<0,001	<0,001
Sodyum (135-143 mmol/L)	134 (133-136)	135 (133-137,5)	134 (133-136)	134 (131-136)	>0,9	>0,9	>0,9	0,7
Albumin (35-47 g/L)	32,1 (26,8-36,1)	33,3 (32,2-38,3)	33,3 (31,3-38,4)	26,8 (25,7-29,9)	>0,9	<0,001	<0,001	<0,001
Kreatinin (0,26-0,77 mg/dL)	0,4 (0,3- 0,6)	0,4 (0,2-0,6)	0,3 (0,3-0,4)	0,6 (0,4- 0,7)	0,7	0,020	<0,001	<0,001
Alanin aminotransferaz (<25 U/L)	30 (15-61)	17 (14-36)	32 (16-60,0)	31 (22-71)	0,3	0,046	>0,9	0,051
Aspartat aminotransferaz (<52 U/L)	36 (27-51)	31 (25-38)	38 (25-48)	38 (29-78)	0,9	0,2	0,7	0,12
Laktat dehidrogenaz (110-295 U/L)	314 (264-374)	264 (235-336)	321 (287-374)	316 (293-422)	0,066	0,051	>0,9	0,031
Trigliserid (<150 mg/dL)	202 (140-272)	151 (67-223)	196 (133-269)	236 (171-320)	0,3	0,056	0,7	0,045
INR (0,8-1,2)	1,2 (1,1-1,3)	1,2 (1,1-1,3)	1,2 (1,1-1,2)	1,2 (1,2-1,4)	>0,9	0,7	0,010	0,015
PTT (24-36 s)	26 (23-28)	24 (22- 28)	24 (23-27)	27 (26-30)	>0,9	0,045	0,004	0,003
Fibrinojen (180-350 mg/dL)	496 (407-663)	547 (472-667)	475 (372-618)	501 (350-678)	0,3	0,9	>0,9	0,3
D-dimer (<0,5 ug/mL)	3,8 (2,0-6,5)	1,9 (1,3-4,5)	3,7 (2,2-8,3)	4,2 (3,0-6,6)	0,042	0,042	>0,9	0,024
Troponin (14-42,9 ng/L)	28,7 (8,0-201,7)	9,6 (3,6-27,1)	12,6 (4,8-39,4)	99 (31-506)	>0,9	<0,001	<0,001	<0,001
BNP (<100 pg/mL)	255 (76-1,081)	87 (28-213)	189 (48- 421)	1,129 (299-2,245)	0,6	<0,001	<0,001	<0,001

n (%); Ortanca (IQR)



Şekil 4.13. Hastaların tanı anındaki laboratuvar değerleri ve kategorik olmayan değişkenleri arasındaki spearman korelasyon matrisi. Yalnızca istatistiksel olarak anlamlı olanların korelasyon katsayısı verilmiştir

Şekil 4.13'te başvuru anındaki laboratuvar ve demografik verilerin parametrik olmayan devamlı değişkenler arasındaki matrisinde spearman korelasyon analizindeki R2 değerleri yerleştirilmiştir. P değeri 0.05'in altında olanların R2 değerlerine göre matrisinde, hemoglobin ve albümin, mutlak lenfosit sayısı ve platelet sayısı, ESH ve fibrinojen, ALT ve AST, INR ve aPTT, LDH ve AST, fibrinojen ve CRP, ferritin ve BNP, ferritin ve prokalsitonin, kreatinin ve yaş/boy/kilo, troponin ve BNP arasında pozitif korelasyon varken; EF ve BNP, albümin ve BNP, albümin ve trigliserid arasında negatif korelasyon görülmüştür.

4.2.3. MIS-C'de Kalp Tutulumu

MIS-C'li hastaların başvurusunda troponinin değeri 42.9 ng/L'dan daha yüksek düzeyde olan 36 (%40) hasta ve BNP değeri 100 pg/mL üzerinde olan 59 (%66) hasta vardı. Kalp tutulumunu spesifik olarak gösteren troponin ve BNP'deki yükseklik KH ve şokta fenotipsel ayırmadan ötürü anlamlılık göstermiştir ($p<0,001$). Şokta miyokard hasarını gösteren troponin değerleri 99 (31-506) ng/L düzeyinde iken, BNP değeri şokta 1129 (229-2245) ve KH benzeri fenotipte 189 (48-421) pg/mL idi. Hastaların beşte birinde EKO tetkikinde EF değeri %55'in altındaydı.

EKO'da hastaların hemen hemen yarısında kapak yetmezliği tespit edilirken, beşte birinde perikardiyal efüzyon görülmüştür. Kardiyak değerlendirme içinde bütün bulgular ve sonuçlar şok hastalarını anlamlı düzeyde diğer fenotiplerden ayırmaktaydı ($p=0.001$). Hastanede yatış esnasında sadece 4 hastada koroner arter anormalliği (Boston Z-skoru >2) görülmüştür (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. MIS-C tanılı hastalarda kalp tutulumu

MIS-C laboratuvar özellikleri	Toplam, N = 90 ¹	Ateş - İnflamasyon, N = 19 ¹	KH benzeri, N = 34 ¹	Şok, N = 37 ¹	Ateş - İnf. vs KH	Ateş - İnf vs Şok	KH vs Şok	P-değeri
BNP (<100 pg/mL)	255 (76-1,081)	87 (28-213)	189 (48-421)	1,129 (299-2,245)	0,6	<0,001	<0,001	<0,001
Troponin (14-42,9 ng/L)	28,7 (8,0-201,7)	9,6 (3,6-27,1)	12,6 (4,8-39,4)	99 (31-506)	>0,9	<0,001	<0,001	<0,001
EKO								
EF (%)	63 (56-70)	65 (64-71)	66 (62-73)	56 (50-63)	>0,9	0,002	<0,001	<0,001
EF < %55	18 (%20)	0 (%0)	1 (%2,9)	17 (%46)	>0,9	<0,001	<0,001	<0,001
Kapak yetmezliği	43 (%48)	1 (%5,3)	13 (%38)	29 (%78)	0,030	<0,001	0,002	<0,001
Perikardiyal efüzyon	18 (%20)	0 (%0)	3 (%8,8)	15 (%41)	>0,9	0,003	0,008	<0,001
Z-skoru >2,0 (yatışta)	4 (%4,4)	1 (%5,3)	2 (%5,9)	1 (%2,7)	>0,9	>0,9	>0,9	0,8
Kardiyak tutulum	71 (%79)	10 (%53)	25 (%74)	37 (%100)	0,4	<0,001	0,016	<0,001

n (%); Ortanca (IQR)

4.2.4. EDP'nin MIS-C'de Yeri

MIS-C tanılı hastalardan tedavi öncesi ve sonrası farklı zamanlarda alınan serum örneklerinde ve kontrol grubu olarak seçilen sağlıklı çocukların serum örneklerinde EDP düzeyleri yukarıda bahsedilen yeni geliştirilen yarışmalı indirekt ELISA protokolü ile değerlendirildi.

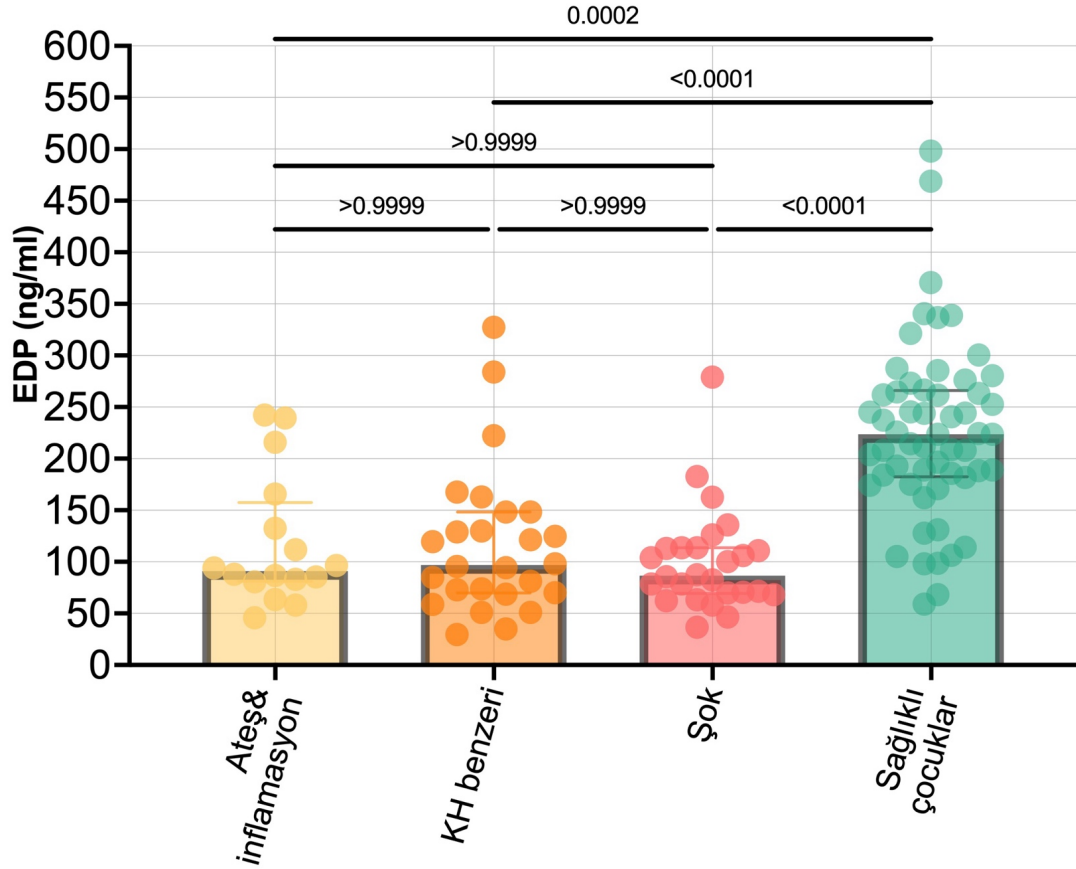
Tüm MIS-C hastalarının EDP düzeyleri fenotipik olarak tedavi öncesi alınan serum numunelerinde karşılaştırıldığında; tüm gruplar arasında anlamlı farkın olduğu ($p<0,0001$), her bir fenotipin sağlıklı çocuklarla arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu, fakat fenotipler arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Şekil 4.14) Tedavi esnası ve poliklinik takip zamanlarında alınan serum örneklerinde EDP düzeyinde MIS-C'nin fenotiplerine göre farklılık gözlenmedi (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Farklı MIS-C fenotiplerindeki hastalarda EDP düzeylerinin farklı zamanlarda alınan serum örneklerindeki ortanca ve IQR değerleri

Numune alınma zamanı	Hepsi	Ateş - İnflamasyon	KH benzeri	Şok	p-değeri
Tedavi öncesi	94 (71-129)	95 (86-157)	95 (70-135)	87 (70-114)	0,9
Tedavi esnası	170 (139-222)	227 (194-249)	161 (140-206)	155 (130-218)	0,7
Poliklinik takibi	211 (177-247)	209 (186-289)	222 (188-247)	210 (173-229)	>0,9

n (%); Ortanca (IQR)

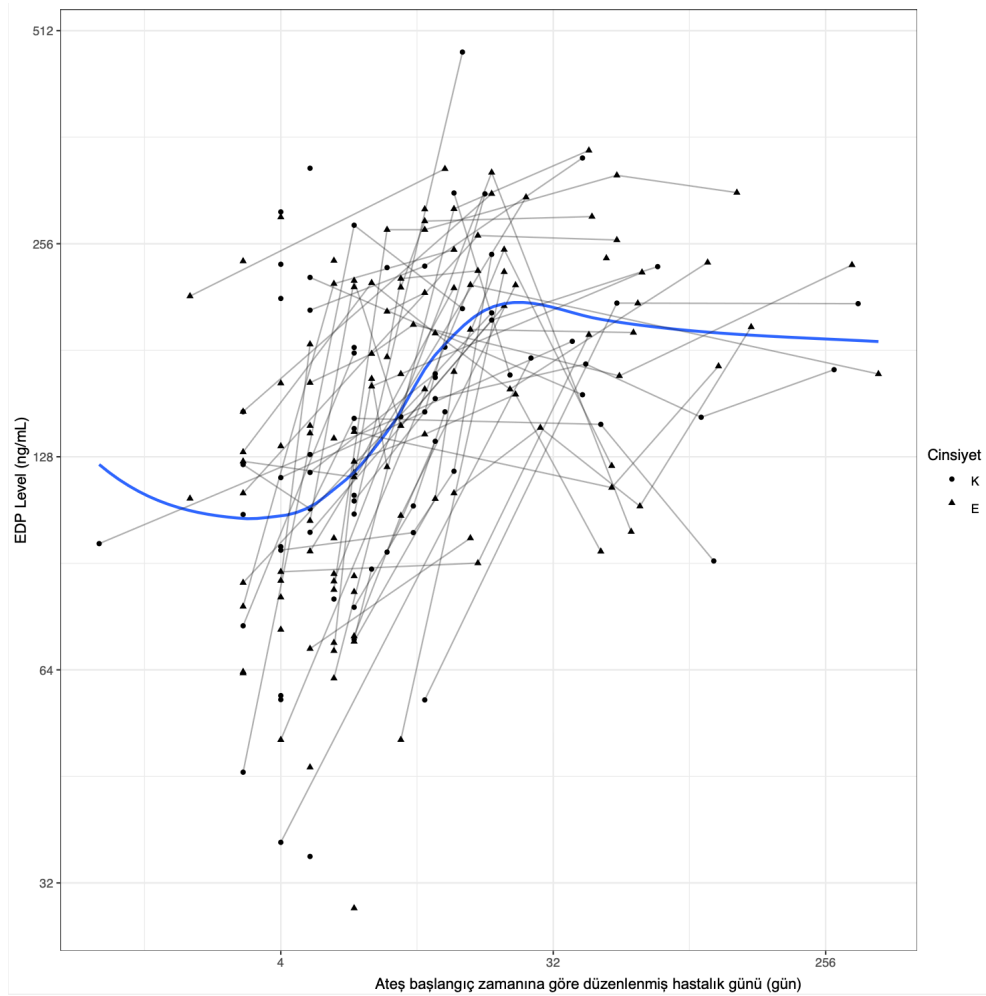
Kruskal-Wallis test p - value < 0.0001

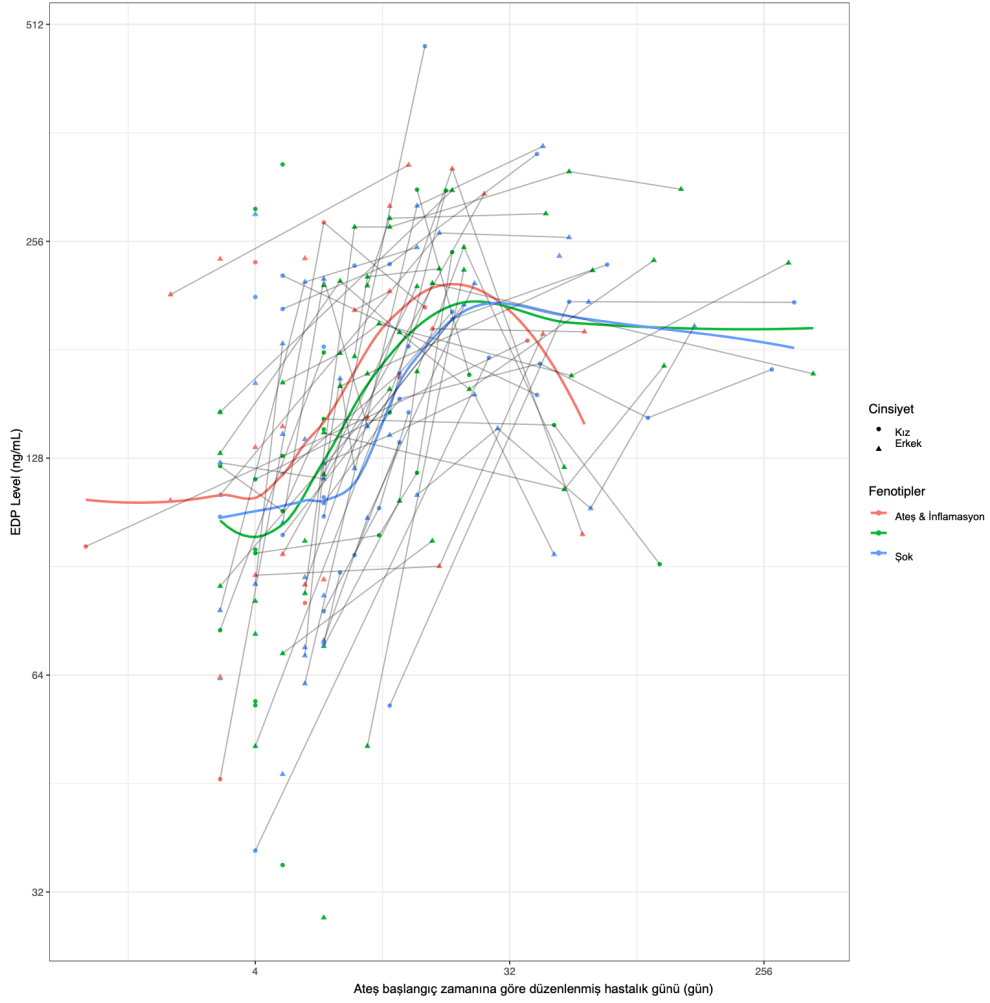


Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
KH benzeri vs. Ateş & inflamasyon	-0.6298	No	ns	>0.9999
Şok vs. Ateş & inflamasyon	-7.822	No	ns	>0.9999
Sağlıklı çocuklar vs. Ateş & inflamasyon	42.81	Yes	***	0.0002
Şok vs. KH benzeri	-7.192	No	ns	>0.9999
Sağlıklı çocuklar vs. KH benzeri	43.44	Yes	****	<0.0001
Sağlıklı çocuklar vs. Şok	50.63	Yes	****	<0.0001

Şekil 4.14. Tedavi öncesi dönemde EDP düzeyinin farklı klinik fenotiplerdeki ve sağlıklı çocuklardaki ortanca değerleri. Kruskal Wallis testi ile modele alınan gruplar arasındaki p değeri < 0,0001'dir

MIS-C'li hastaların hastaneye başvurusundan önce ortalama 5 gün (IQR, 4-7) ateşli oldukları görülmüştür. Hastaların ateşlerinin çıktığı günlere göre tedavi öncesi alınan serumlarındaki EDP düzeyleri sıralandığında ve tedavi almaya başlayıp poliklinikte takibe geçtiği süreler gere zamansal eğrisi longitudinal düzleme aktarıldığında; EDP düzeyinin 4. günde en düşük seviyeye indiği ve daha sonra immünmodulator tedaviyle yükselişe geçtiği izlenmektedir (Şekil 4.15). Hiperinflatuar durumun rezolüsyonu ile hastalar taburcu edildikten sonra ilk poliklinik kontrollerinde değerlerin en yüksek noktaya ulaştığı, ardından zamansal uzamda ateşinin ilk çıktığı andan sonra geçen dört haftanın sonunda EDP düzeyinde hafifçe bir düşüşün ardından plato çizdiği görülmektedir. MIS-C'nin klinik fenotiplerine göre aynı analiz tekrarlandığında fenotipik planda EDP'nin MIS-C'de doğal seyrinin benzer olduğu söylenebilir (Şekil 4.15).



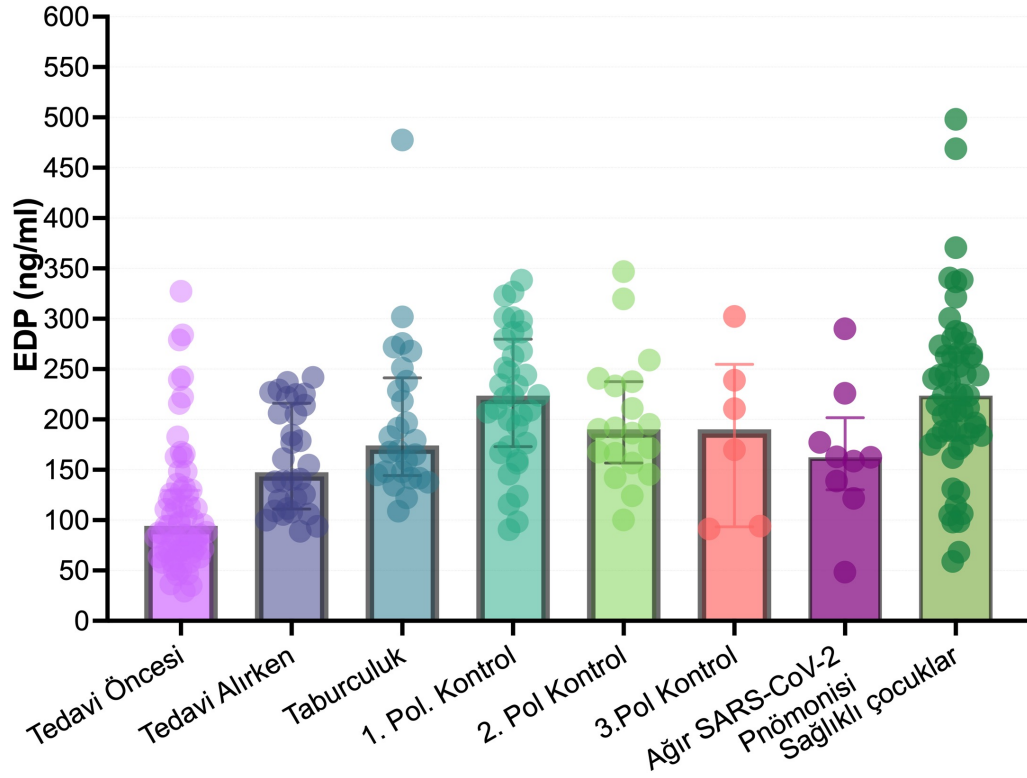


Şekil 4.15. MIS-C’de EDP’nin doğal seyrini görmek için ateş başlangıç zamanına göre EDP düzeylerinin zaman içindeki değişimi

Üstteki şekilde ateş başlangıç zamanına göre tüm hastaların EDP düzeyi y düzlemine yerleştirilmeye başlanıp zaman içinde tedaviyle beraber doğal seyri görülmektedir. Alttaki şekilde ise MIS-C hastaları fenotiplerine göre gruplara ayrılıp aynı yöntemle ateş başlangıç zamanına göre EDP düzeyleri y düzlemine yerleştirildiğindeki doğal seyri izlenmektedir.

MIS-C tanısıyla izlenen hastaların tedavi öncesindeki serumlarında (n=68) ortalanca EDP 94,3 (IQR,70,3-129,7) ng/ml olup immünmodülatör tedavi başlandıktan sonraki 24-72 saatte alınan serum örneklerinde (n=30) ortalanca EDP 147,7 ng/ml (IQR,111-216,2) değere ulaşmış ve ardından da taburculukta alınan serumlarında (n=26) ortalanca EDP’nin 174,1 (IQR,144,2-241,3) ng/ml değere yükseldiği görülmüştür. Hastaların birinci poliklinik kontrollerinde (n=35) EDP’nin ortalanca 223,8 ng/ml (IQR,173,1-279,7) değeri ile pik yaptığı tespit edilmiştir. EDP değerinin hafif bir düşüşün ardından ikinci (n=19) ve üçüncü (n=6) poliklinik takiplerinde

sırasıyla ortanca 190,3 (IQR,156,8-237,6) ng/ml ve 190,3 (IQR,93,4-254,8) ng/ml değerleri ile plato çizdiği görüldü. Sağlıklı çocuklardan oluşan 56 kişilik kontrol grubunda ise ortanca 223,7 (IQR,184,2-264,7) ng/ml iken solunum desteği ihtiyacı olan ağır COVID pnömonili 9 kişilik diğer kontrol grubunda ortanca 162,4 (IQR,130,2-201,7) ng/ml idi (Şekil 4.16).

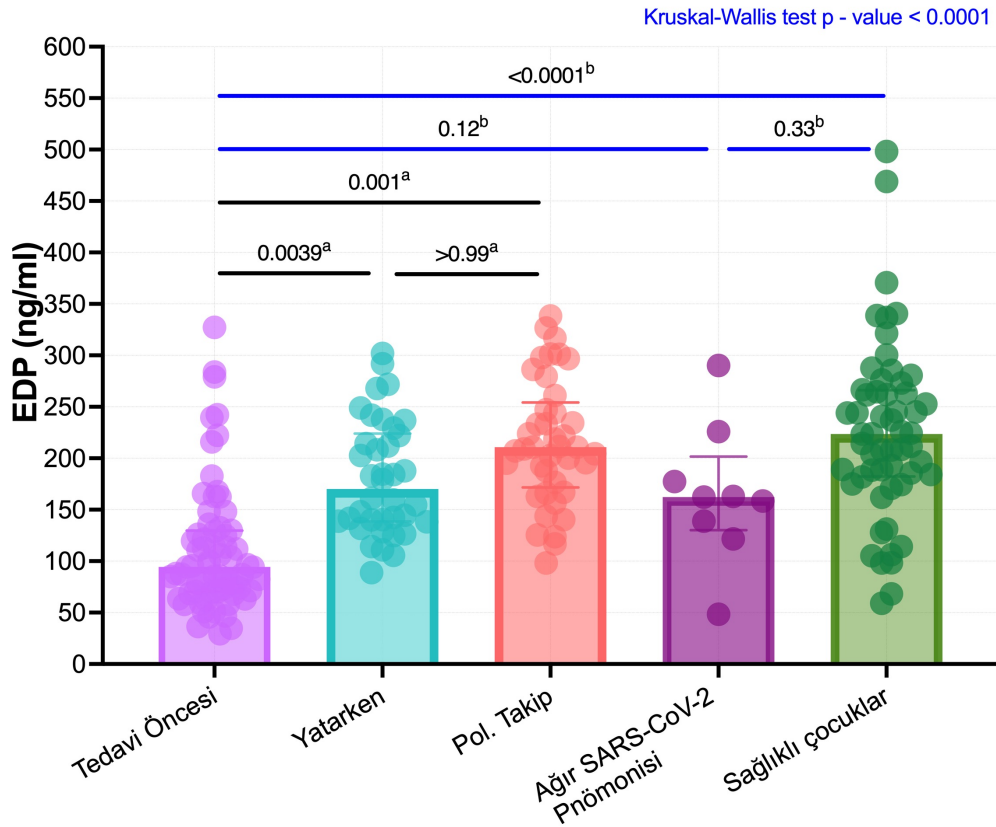


Şekil 4.16. MIS-C'li hastaların serum örneklerinin klinik takiplerinde alınma zamanlarına göre EDP düzeyleri ve kontrol grubunun EDP düzeyi

Hastaların hastanede yatmakta iken/tedavi altında/taburculuk anında alınan kanları çok yakın zaman diliminde alınmış olduğu için ve immünmodülatör tedavi ile klinik iyileşmenin görüldüğü zamanlara ait kanlar olduğu için bu sonuçlar “tedavi esnası” başlığı altında birleştirildi. Aynı şekilde herhangi bir tedavi altında olmayan, iyileşmiş, semptomsuz hastaların rutin poliklinik kontrollerinde alınan örnekleri de “poliklinik takip” başlığı altında birleştirildi. MIS-C'li hastaların EDP değerleri tedavi öncesi, esnası ve poliklinik takip şeklinde üç dönemde (*paired*) EDP'deki artışların hasta bazında artışlarının karşılaştırıldığı analizde, artıştaki fark anlamlı bulundu ($p<0,0004$). Bu üç dönemin dahil edildiği modelde alt gruplar kıyaslandığında, hastaların tedavi öncesi ve tedavi esnasında alınan serum

örneklerindeki hasta bazındaki yükselme ($p=0,0039$); ayrıca tedavi öncesi ve poliklinik takipteki hasta bazlı EDP'deki yükselme ($p=0,001$) anlamlıydı. Ancak tedavi almaya başladıktan sonra halihazırda yatarken alınan “tedavi esnası” serumları ile poliklinik takipteki serumları arasındaki hasta bazlı yükselme arasında fark yoktu ($p>0,99$) (Şekil 4.17).

Yine aynı şekilde MIS-C'li hastaların tedavi öncesi alınan serum örnekleri ile kontrol grubundaki iki alt grup bir modele alınarak ayrı ayrı karşılaştırıldığında EDP düzeyleri bu gruplar arasında farklı bulundu ($p < 0,0001$). Sağlıklı çocuklar ile MIS-C'li hastaların tedavi öncesi alınan serumları arasında istatistiksel fark bulunurken ($p < 0,0001$), MIS-C'lilerle ağır COVID pnömonili hastalar arasında ($p=0,12$) ve sağlıklılarla pnömonililer arasında ($p=0,33$) fark bulunmadı (Şekil 4.17).

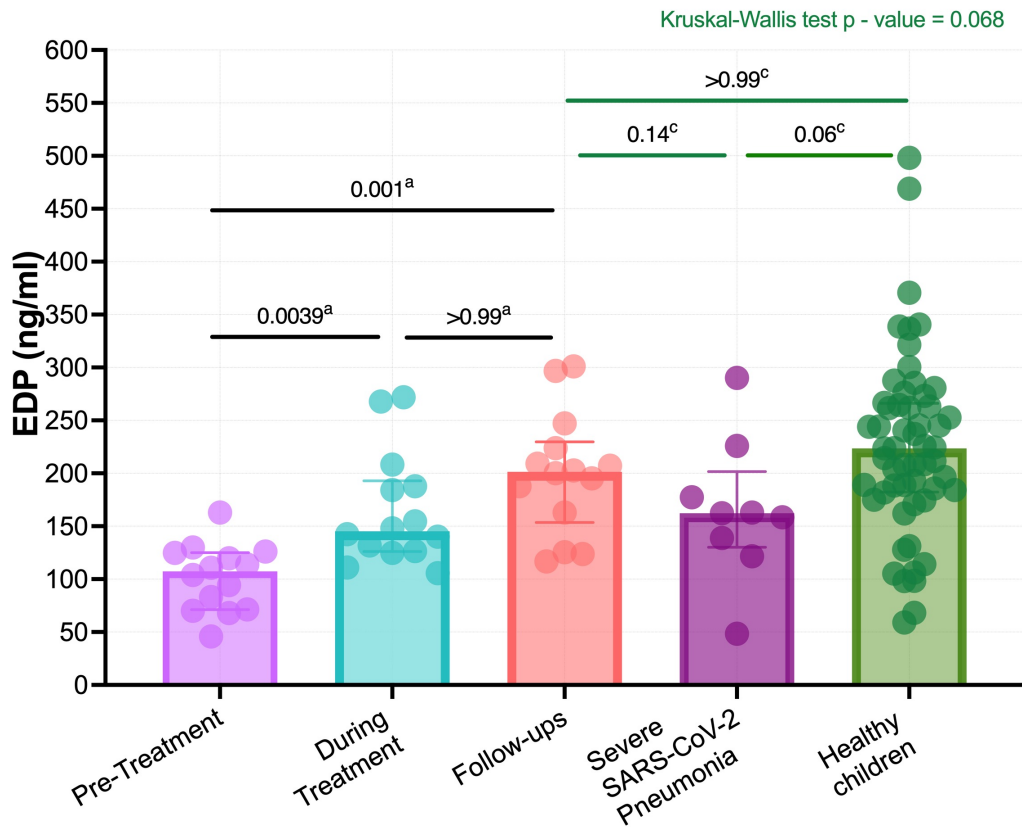


Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Tedavi Öncesi vs. Ağır SARS-CoV-2 Pnömonisi	-28.27	No	ns	0.1158
Tedavi Öncesi vs. Sağlıklı çocuklar	-50.47	Yes	****	<0.0001
Ağır SARS-CoV-2 Pnömonisi vs. Sağlıklı çocuklar	-22.19	No	ns	0.3265

Şekil 4.17. MIS-C hastalarının tedavi öncesi serumlarıyla kontrol gruplarının karşılaştırılması

a: Dunn-Bonferroni çoklu karşılaştırma testi (a: Friedman testi $p<0,0004$) b: Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi (Kruskal Wallis Testi testi $p<0,0001$)

MIS-C'li hastaların taburcu olduktan sonra poliklinik takipleri sırasında alınan serum örnekleri ile kontrol grubundaki iki alt grup farklı bir modele dahil edilerek ayrı ayrı yeniden karşılaştırıldı. EDP düzeylerinde gruplar arasında fark yoktu ($p=0,068$). Ağır COVID pnömonili hastalar ile sağlıklı çocuklar arasında ($p=0,06$) ve MIS-C'li hastaların poliklinikte takiplerinde alınan serumları arasında ($p=0,14$); ayrıca poliklinik takibindeki geçirilmiş MIS-C'li çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında da ($p>0,99$) istatistiksel fark bulunmadı (Şekil 4.18). Fakat pnömoni grubuyla sağlıklı çocukların ($p=0,0279$), tedavi öncesi MIS-C ile pnömonili çocukların ($p=0,0092$) ayrı ayrı karşılaştırmasında EDP düşüklüğü anlamlıydı.

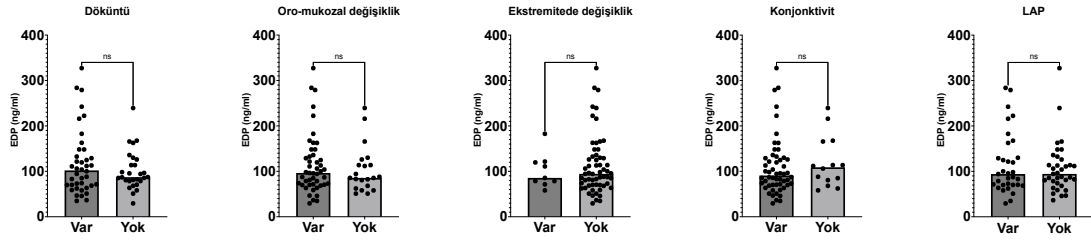


Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Pol. Takip vs. Ağır SARS-CoV-2 Pnömonisi	22.63	No	ns	0.1366
Pol. Takip vs. Sağlıklı çocuklar	-2.968	No	ns	>0.9999
Ağır SARS-CoV-2 Pnömonisi vs. Sağlıklı çocuklar	-25.60	No	ns	0.0612

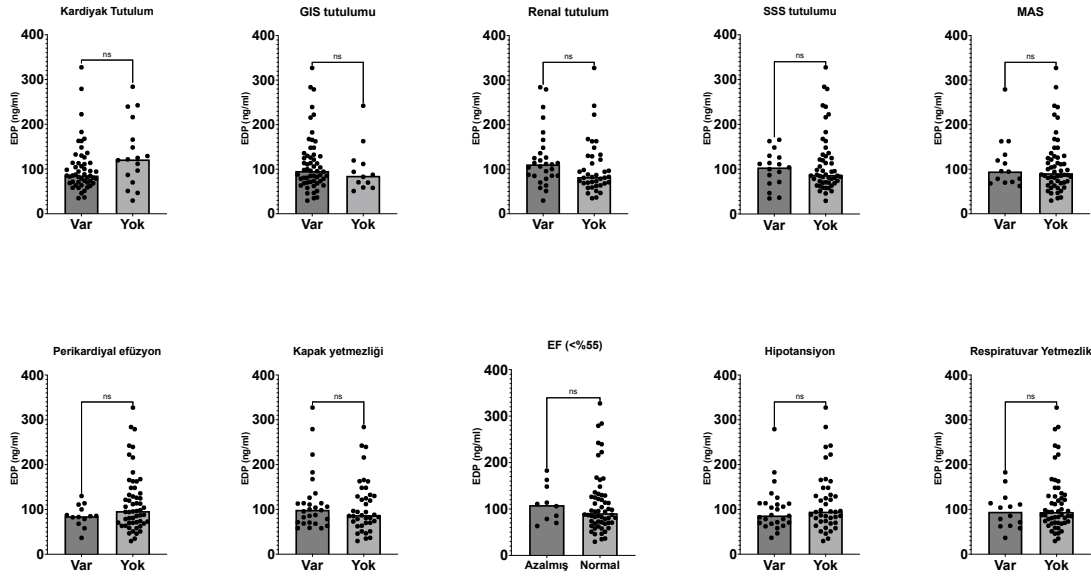
Şekil 4.18. Poliklinik takibe giren MIS-C'ler ile kontrol gruplarının karşılaştırılması

a: Dunn-Bonferroni çoklu karşılaştırma testi (a: Friedman testi $p<0,0004$) b: Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi (Kruskal Wallis Testi testi $p=0,09$)

EDP düzeyi immünmodülatör tedavi öncesi alınan serum örneklerinde çalışılmış ve hastaların semptom ve bulgularıyla ilişkisi incelenmiştir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). MIS-C'li hastaların klinik prezantasyonunda KH kriteri olarak döküntü, oro-mukozal değişiklik, ekstremitelerde değişiklik, LAP ve konjonktivit olmasıyla EDP düzeyleri arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. KH kriterlerindeki semptomlara göre tedavi öncesi alınan serumlardaki EDP düzeyleri.



Şekil 4.20. Organ tutulumlarına göre tedavi öncesi alınan serumlardaki EDP düzeyleri.

Organ tutulumları ile EDP düzeyi arasındaki ilişkinin incelenmesinde de istatistiksel bir fark görülmemiştir. Serumdaki EDP düzeyleri ile GİS, renal, SSS ve kardiyak tutulum olması arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Ayrıca, solunum desteği ihtiyacının olması, perikardiyal effüzyon, kapak yetmezliği, EF değerinin %55'ten az olması ve hipotansiyon gibi kardiyopulmoner sistemin bulguları ile serum EDP düzeyi arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir (Şekil 4.20).

Hastaların klinik ağırlığına göre derecelendirilmesinde şok fenotipinde olanlar en ağırlarıdır. Bu hastaların yaş, başvuru ateş günü, KH kriter sayısı ve laboratuvar değerlerinin değerlendirmeye alınarak şok varlığını öngörebilmek üzere lojistik regresyonla önce tek değişkenli ardından da istatistiksel olarak anlamlı çıkanlarla ($p < 0,25$) çok değişkenli model oluşturuldu. Tek değişkenli modelde anlamlı çıkmayan KH kriter sayısı, ESH, IL-6, sodyum, trigliserid, fibrinojen, D-dimer ve EDP düzeyi çok değişkenli modelde kullanılmadı. Bu modelde şokun öngörülmesinde risk faktörü olabilecek bir parametre saptanmadı (Tablo 4.14).

Şekil 4.13'teki korelasyon matrisinde görülebileceği üzere tedavi öncesinde, sonrasında ve poliklinik takiplerde alınan serumlardaki EDP düzeyleri ile diğer laboratuvar parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık ifade eden korelasyon bulunamamıştır. Yalnızca takiplerde alınan serumlardaki EDP düzeyleri ile hastanın yaş, kilo, boy, kreatinin, lökosit ve nötrofil sayısı arasında zayıf bir negatif korelasyon görülmüştür.

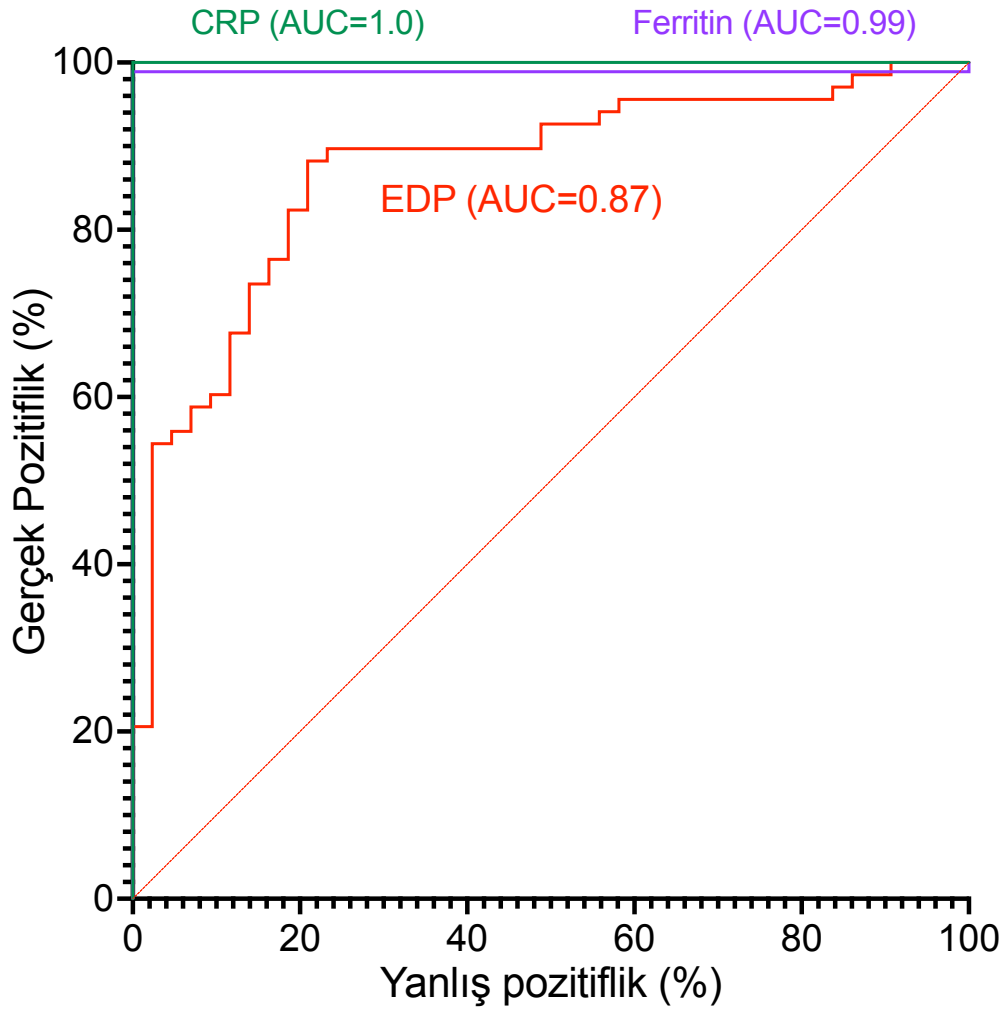
Tablo 4.14. Çok değişkenli lojistik regresyonla şok fenotipindeki hastaları tanı anındaki verileriyle öngörülmesi

Bağımsız değişkenler	Tek Değişkenli Model				Çok Değişkenli Model		
	N	OR ¹	95% CI ¹	p- değeri	OR ¹	95% CI ¹	p-değeri
Yaş	90	1.23	1.11, 1.38	<0.001	1.18	0.90, 1.54	0.2
Başvuruda ateş günü	90	1.20	1.00, 1.48	0.064	1.49	0.81, 2.73	0.2
KH kriter sayısı	90	0.90	0.62, 1.29	0.6			
Hemoglobin	90	0.95	0.92, 0.98	0.004	0.93	0.86, 1.01	0.074
Lökosit	90	1.08	1.01, 1.16	0.028	1.00	0.78, 1.29	>0.9
Nötrofil	90	1.12	1.04, 1.21	0.005	1.01	0.76, 1.33	>0.9
Lenfosit	90	0.63	0.36, 0.97	0.063	0.61	0.18, 2.01	0.4
Platelet	90	1.0	0.99, 1.00	0.014	0.99	0.98, 1.00	0.2
CRP	90	1.08	1.03, 1.15	0.002	1.03	0.89, 1.19	0.7
Ferritin	90	1.00	1.00, 1.01	<0.001	1.00	1.00, 1.00	0.13
ESH	84	1.00	0.98, 1.02	>0.9			
Prokalsitonin	85	1.06	1.02, 1.11	0.010	1.02	0.95, 1.10	0.6
IL-6	74	1.00	1.00, 1.00	0.9			
Sodyum	90	0.99	0.88, 1.11	0.9			
Albümin	90	0.77	0.67, 0.86	<0.001	0.91	0.74, 1.12	0.4
Kreatinin	90	230	20.5, 4,260	<0.001	79.7	0.10, 65,081	0.2
ALT	90	1.00	1.00, 1.01	0.2	1.00	0.98, 1.02	>0.9
AST	90	1.01	1.00, 1.03	0.058	1.00	0.98, 1.02	0.9
LDH	90	1.00	1.00, 1.01	0.035	1.00	0.99, 1.01	0.7
Trigliserid	84	1.00	1.00, 1.00	0.6			
INR	90	45.0	3.55, 850	0.006	5.79	0.00, 10,901	0.6
Fibrinojen	90	1.00	1.00, 1.00	0.7			
aPTT	90	1.16	1.05, 1.30	0.008	0.93	0.75, 1.15	0.5
D-Dimer	90	1.00	0.97, 1.04	0.8			
Troponin	90	1.00	1.00, 1.00	0.070	1.00	1.00, 1.00	0.7
BNP	87	1.00	1.00, 1.00	<0.001	1.00	1.00, 1.00	0.9
CDC inflamasyon kriteri	90	1.96	1.40, 2.89	<0.001	0.73	0.34, 1.56	0.4
EF	85	0.88	0.82, 0.94	<0.001	0.92	0.83, 1.02	0.087
SARS-CoV-2 IgG	68	0.88	0.75, 1.03	0.13	0.86	0.61, 1.22	0.4
EDP (tedavi öncesi)	68	1.0	0.99, 1.00	0.3			

¹OR = Tahmini rölatif risk, CI = güven aralığı

MIS-C hastalığında duyarlılığını ve özgüllüğünü değerlendirmek üzere Receiver operating characteristic (ROC) eğrisi CRP, ferritin ve EDP için ayrı ayrı oluşturularak birbirleriyle kıyaslanmak üzere birleştirildi (Şekil 4.21). Sağlıklı çocuklarla MIS-C'li çocukların dahil edilerek MIS-C tanısında bu biyobelirteçlerin güvenilirlikleri test edildi. Bu analiz için sağlıklı çocukların CRP ve ferritin değerleri negatif kabul edildi. MIS-C tanı kriterlerinde ve bizim hasta grubumuzda CRP >3,0 mg/dl olduğu için yanlış pozitifliği CRP'nin %0 olup eğri altı alanı (AUC) % 100'dür. Bu kendi içinde bir BİAS oluşturmaktadır ve istatistiksel bir anlam ifade etmemesi yorumu yapılabilir.

MISC'lilerde EDP'deki tedavi öncesi dönemdeki düşüklüğün MIS-C tanısı koymada ayırt ediciliği yeterlidir. (AUC: 0,8704, %95CI: 0,80-0,94, $p<0,0001$). Öyle ki MIS-C'li hastalardan rastgele seçilen birinin EDP düzeyindeki düşüklük %87 olasılıkla tanı koydurucudur; bu da geliştirilen ELISA protokolü ile ölçülen EDP düzeylerinin tanısal yeterliliğini ve doğruluğunu göstermektedir.



Şekil 4.21. ROC analizi. Sağlıklı çocuklar ve MIS-C'li hastalardaki CRP, Ferritin ve EDP için ayrı ROC analizleri birleştirilerek oluşturulmuştur

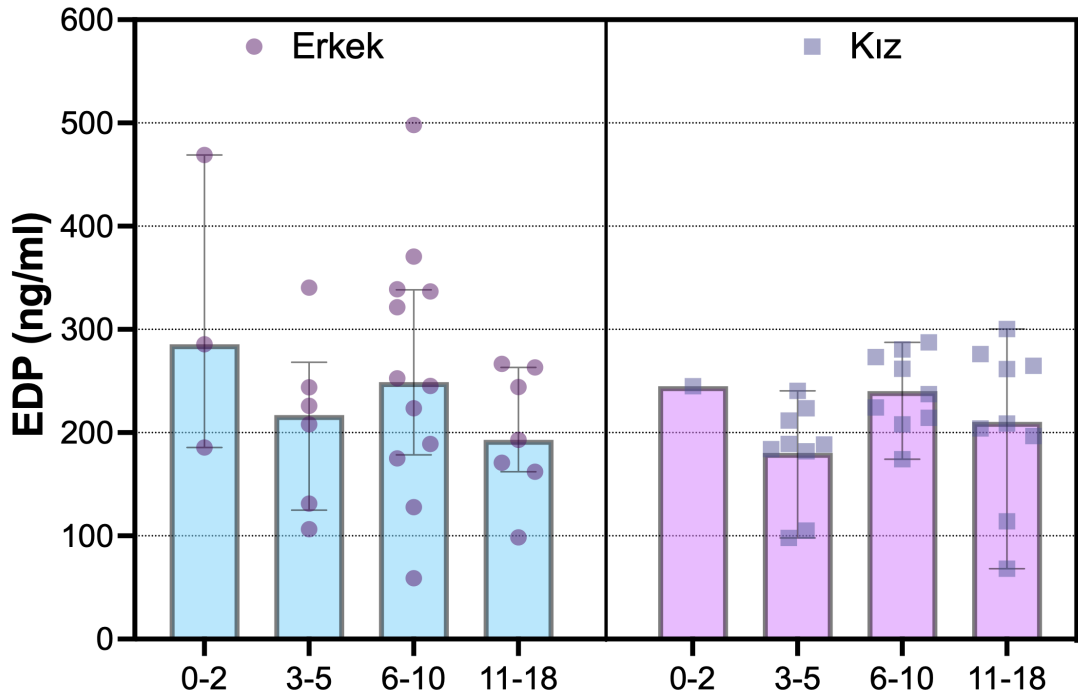
ROC analizinden elde edilen duyarlılık ve özgüllük değerleri kullanılarak kesim noktasının hesaplaması yapıldı. Her bir EDP kesim noktası için hesaplanan duyarlılık ve özgüllük değerlerinin tekabül ettiği en yüksek Youden indeksi, en düşük Öklid mesafesi ve en düşük birleşim indeksi değerleri belirlendi. Tablo 4.16'daki özete göre en uygun kesim noktaları olarak 166,6 ng/ml ya da 170,9 ng/ml EDP değerleri kullanıldığında en az %90 ihtimalle MIS-C hastalığını öngörebildiği görüldü.

Tablo 4.15. Kesim değerinin hesaplanmasında kullanılan parametreler

Kesim noktası	Duyarlılık (%)	Özgünlük (%)	Olabilirlik Oranı	Youden indeksi	Öklid mesafesi	Birleşim indeksi	PPD (%)	NPD (%)
166,6	79,1 (64,8-88,6)	86,7 (76,7-92,9)	6,0	65,8	24,8	8,3	90,4	52,2
170,9	79,1 (64,8-88,6)	88,2 (78,5-93,9)	6,7	67,3	24,0	9,2	91,4	52,7

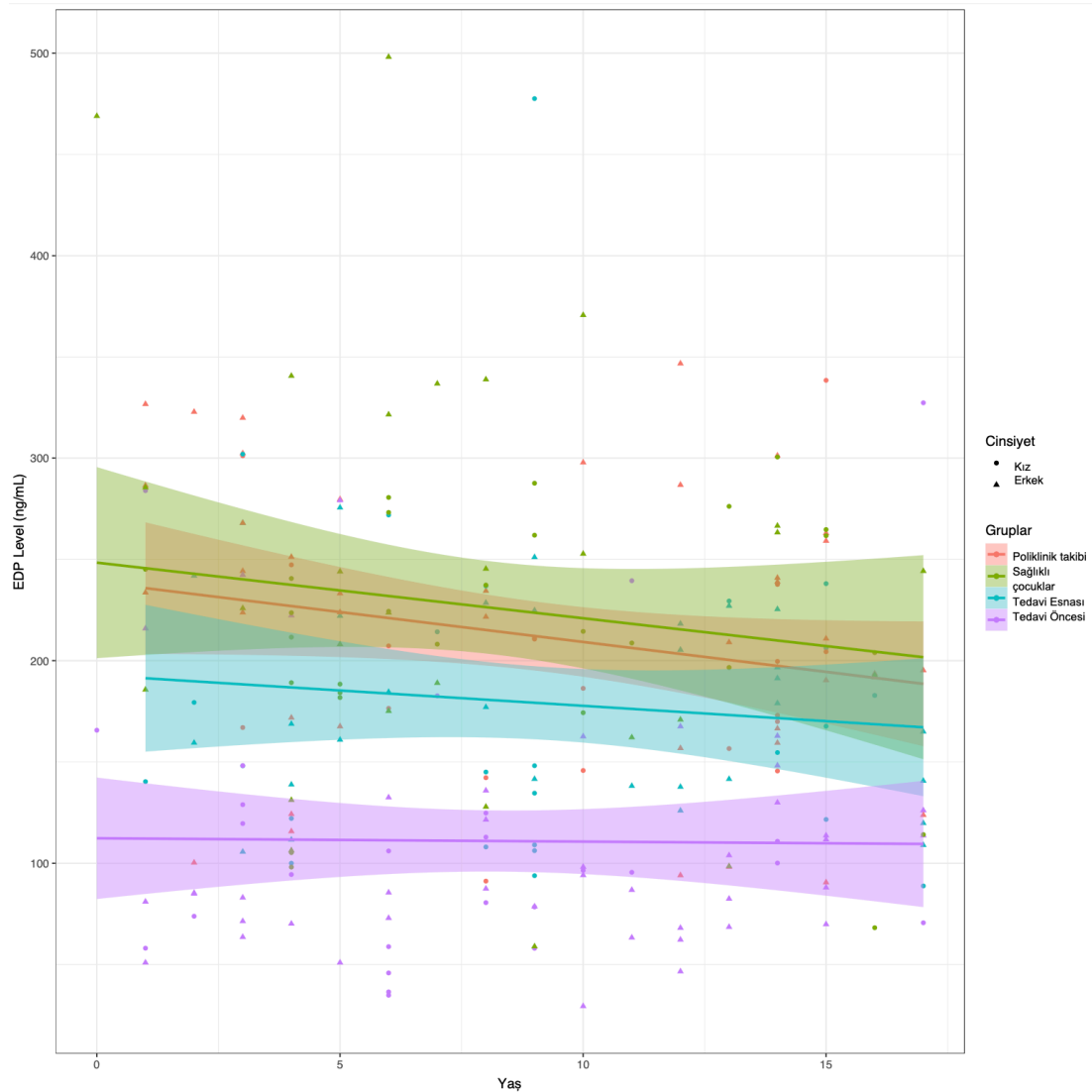
PPD: Pozitif prediktif değer; NPD: Negatif prediktif değer

Kontrol grubundaki 56 sağlıklı çocuğun yarısı erkekti ve 224 ng/ml (IQR, 182,8-265,3) aralığında serum EDP düzeyleri ölçüldü. Kalan 28 sağlıklı kız hastada EDP 219,1 ng/ml (IQR,177,4-271,1) ölçüldü. Kontrol grubundaki SARS-CoV-2'ye bağlı pnömonisi olan ve solunum desteği ihtiyacı olan 9 hastanın ortanca 162.4 ng/ml (IQR,130,2-201,7) olarak EDP düzeyi ölçüldü.

**Şekil 4.22.** Sağlıklı çocuklarda cinsiyete göre 0-2, 3-5, 6-10, 11-18 yaş gruplarında ortanca EDP düzeyleri

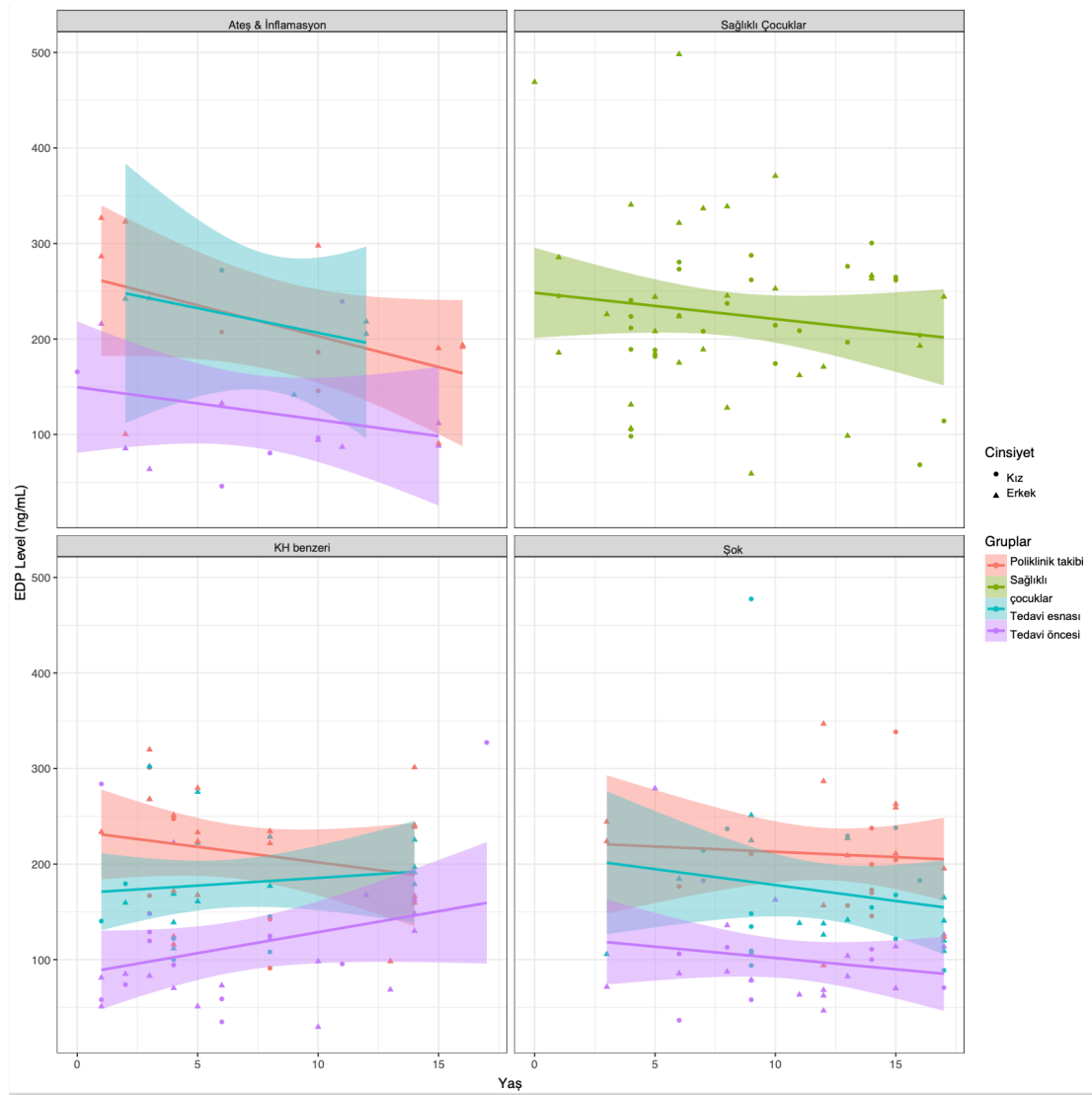
Sağlıklı çocuklar yaş grupları ve cinsiyete ayrıldığında cinsiyetten etkilenmediği fakat 0-2, 3-5, 6-10, 11-18 yaş gruplarında her iki cinsiyette benzer şekilde ortanca değerlerinin farklılık gösterdiği görüldü (Şekil 4.22). EDP'nin

çocukluk döneminde yaş aldıkça azalan bir seyri olabileceği düşünülerek gruplandırmadan yaş ekseninde çizgisel grafikte değerlendirildi. Buradan hareketle sağlıklı çocuklarda yaş alındıkça EDP düzeylerinin çocuklarda cinsiyet fark etmeksizin azaldığı görüldü (Şekil 4.23). Yine aynı şekilde görüleceği üzere EDP değerinin, MIS-C kohortunun fenotiplere ayrılmadan bir bütün halde tedavi esnasında ve poliklinik takipleri esnasında alınan serum numunelerinde benzer düşüşü gösterdiği görüldü. Yalnız tedavi öncesinde alınan MIS-C numunelerinde EDP düzeyleri zaten yeterince düşük olduğu için yaşla değişimi gözlenemedi.



Şekil 4.23. MIS-C tanısıyla izlenen hastaların tedavi öncesi, tedavi esnası ve poliklinik takibinde alınan serum örneklerindeki EDP düzeyinin yaş ekseninde değerlendirilmesi ve sağlıklı çocuklardan farkı

MIS-C hastaları önce serumların alınma zamanına göre tedavi öncesi, tedavi esnası ve poliklinik takip olarak ayrılıp, ardından da MIS-C fenotiplerine göre EDP düzeyleri yaş ekseninde değerlendirildiğinde, KH benzeri fenotip dışında ateş - inflamasyon ile şok fenotipindeki hastalarda tedavi öncesi, tedavi esnası ve poliklinik takiplerinde hastaların yaşla beraber EDP düzeylerinin genel kohorttaki gibi düştüğü gözlemlendi. KH benzeri grupta ise tedavi öncesi ve tedavi esnasında EDP düzeyleri yaşla beraber artmakta iken poliklinik takiplerinde/ iyileştikten sonra diğer çocuklar gibi yaşla EDP düzeyinin düşüşü izlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. EDP'nin yaş ekseninde sağlıklı ve MIS-C'li hastaların farklı fenotiplerindeki tedavi öncesi ve sonrası düzeyleri

5. TARTIŞMA

5.1. MIS-C

MIS-C 2020 Mayıs ayında tanımlandıktan sonra hasta sayısının azlığından dolayı nadiren 100 hastanın üzerinde kohortlarla MIS-C'nin kliniği ve tedavisi yorumlanılmaya çalışıldı. Bu nedenle merkezler hasta popülasyonlarını birleştirerek yayınlama eğilimindeydi. *Best Available Treatment Study* (BATS) gibi konsorsiyumlar oluşturulup hasta sayıları biriktikçe daha fazla hasta sayısı ile farklı çalışmalar da yayınlandı [108, 109].

Hastaların başvuru anında SARS-CoV-2 ile temasının belirlenmesi tüm vaka tanımlarında ortak olan bir kriterdir. Essalami ve arkadaşlarının yaptığı meta analizde 48 çalışmadan derlediği 3543 MIS-C'li hastanın SARS-CoV-2 enfeksiyonu her ne kadar çalışmalar fazlasıyla heterojen olsa da ($I^2 = \%90,26$) ortalama $\%33$ SARS-CoV-2 PCR pozitifliği olduğu, SARS-CoV-2 IgG pozitifliğinin ($I^2 = \%82,31$) ise $\%81$ olduğu bulunmuştur [110].

Çalışmamıza alınan hastaların hepsi DSÖ'nün tanı kriterlerini tam olarak karşılamaktaydı. Hastaların $\%6$ 'sında SARS-CoV-2 PCR pozitifliği ve tüm hastalarda ELISA IgG pozitifliği mevcuttu.

BATS konsorsiyumunun [109] 39 farklı ülkeden 2009 MIS-C'li çocuğun verisini retrospektif olarak değerlendirdiği çalışmasında, ortanca yaş 8 yıl olup hastaların $\%59,3$ 'ü erkekti. Ateşten ($\%92,7$) sonra karın ağrısı $\%60,9$ oranıyla en sık semptom iken baş ağrısı $\%29,5$ oranında görülmüştür. Kawasaki kriterlerini karşılayan vakalar hastaların $\%31,3$ 'üne tekabül etmektedir. Hastalar arasında ventilasyon, inotropik tedavi veya ECMO ihtiyacı olan $\%26,6$ 'sıdır. Jiang ve arkadaşlarının yaptığı MIS-C'nin epidemiyolojisi ve klinik özelliklerinin değerlendirildiği ve 3194 hasta üzerinde yapılan meta-analizde [111] ortalama yaş $8,1 \pm 2,37$ olup, vakaların $\%58,11$ 'i erkek çocuklardı. Ateş hastaların $\%90,85$ 'inde görülmüş, spesifik olmayan GIS semptomları $\%51,98$, karın ağrısı $\%48,97$, miyokardit $\%29,34$ ve nörolojik semptomlar vakaların $\%26,92$ 'sinde rapor edilmiştir. İnkomplet KH kriterlerini vakaların $\%18,67$ 'si, komplet KH'yi $\%15,18$ 'si karşılarken, $\%37,75$ 'te şok prezentasyonu görülmüştür. Bu çalışmalara benzer

şekilde bizim çalışmamızda da ortanca yaş 8 yıl olup hastaların %60'ının erkek olduğu tespit edildi. Ateşi olmayan hasta olmayıp, gastrointestinal sistemin %83 ile en çok etkilenen sistem olduğu görüldü. Onu %79 ile kardiyak tutulum takip ederken organlar arasında en az tutulmanın %26 oranla SSS olduğu tespit edilmiştir. Hastalarımızın 34'ü (%37) KH kriterlerini karşılamış olup inotrop ihtiyacı olan şoklu hastalar %41,1'dir. Bu bağlamda hastalarımız değerlendirildiğinde GIS ve kardiyak komplikasyonların daha sıklıkla görüldüğü söylenebilir. Akut böbrek hasarı (ABH) oranını bulmayı hedefleyen bir başka meta-analizde [42] ABH için kaba oran %20 iken bizim kohortumuzda %16'dır.

MIS-C tanımlandıktan hemen sonra Temmuz 2020'de Birleşik Krallık'taki vakalarını yayınlanan ve klinik fenotiplendirme kriterlerini kullandığımız Whittaker ve arkadaşlarının 58 hasta ile yaptığı çalışmada [33] tüm çocuklarda ateş olup karın ağrısı %53'ünde görülürken %22'sinde ise ABH görülmüştür. Fenotipik olarak kıyaslandığında hastaların yarısında şok görülmüş olup, %22'si KH kriterlerini karşılamış ve %40'ında şok veya KH özellikleri olmaksızın ateş ve inflamasyon görülmüştür. Bu çalışmada tüm hastalarda ortanca lenfosit sayısı $800/\text{mm}^3$, platelet sayısı $151.000/\text{mm}^3$, CRP 22,9 mg/dl ve ferritin 610 ug/L iken şoklu hastalarda lenfopeni ve trombositopeni daha derinleşmekte, CRP (32,1 mg/dl) ve ferritin (888 ug/L) değerleri daha da yükselmektedir. Ateş-inflamasyonla giden grupta ise kliniğin daha silik olmasıyla beraber lenfosit ve trombosit sayıları daha yüksek ve görece CRP ve ferritin değerleri düşüktür. Bu haliyle şok tablosundaki hastalar bizim vaka serimizde yukarıda bahsi geçen çalışmalara benzer şekilde diğer iki fenotipten farklı olarak bisitopeni tablosuyla, yüksek CRP ve ferritin düzeyiyle karakterize iken, KH benzeri ve ateş&inflamasyon fenotipleri de literatürle uyumlu özellikler sergilemekteydi.

KH'nin en önemli komplikasyonu olan koroner arter anormalliği (Z-skoru >2) MIS-C'de daha nadir görülmektedir. BATS'nin son yazısında [109] herhangi bir zaman diliminde saptanan koroner arter aneverizması (Z-skoru $>2,5$) %12,3 olarak rapor edilmiştir ki KAA prevalansının %12,3'ten daha yüksek olması gerekmektedir. MIS-C tanımlandıktan sonra 2020 ve 2022 yıllarında yapılan iki meta-analizde hipotansiyon oranının %60 ve %64,5 olup aynı analizlerde ECMO uygulanma prevalansı %6 ve %5,3 olarak raporlanmıştır [34, 45]. Fransa ve

İsviçre'deki 14 yoğun bakım ünitesinden MIS-C'ye bağlı akut kalp yetmezliği olan 35 hasta ile yapılan çalışmada LV ejeksiyon fraksiyonu (EF), dahil etme kriterlerinden biri olduğu için tüm hastalarda düşük ölçülmüş olmakla birlikte üçte birinde ciddi EF düşüşü (EF <%30) gösterilmiştir. Bu hastaların %80'ine inotrop desteği sağlanmış ve 10 hastaya ECMO desteği verilmek zorunda kalındığı raporlanmıştır [112]. Bu pencereden bakıldığında çalışmamızda sadece bir hastamızda ECMO'ya ihtiyaç duyulması ve yalnızca 4 hastada KAA gelişimi gözlenmesi erken tedaviye başlama [113, 114]veya doğru immünmodülatör yaklaşım [114, 115] ile ilişkili olabilir.

MIS-C'de hematolojik tutulumun en dramatik hali hemofagositik lenfositik lenfositik (HLH) ve makrofaj aktivasyon sendromudur (MAS). MAS ve HLH'nin henüz tam olarak patofizyolojik ayrımları aydınlatılamamış olsa da bozulmuş sitotoksitenin bir sonucu olan sitokin fırtınasının farklı iki formudur. İnflamazom aktivasyonunu gösteren IL-18 ve IFN- γ yolağının aktivasyonunu gösteren CXCL9'un birbirine oranının HLH ve MAS vakalarında farklı olduğu gösterilmiştir. IL-18/CXCL9 oranının <2,3'ün altında olması ailesel HLH'yi MAS'tan anlamlı şekilde ayırmaktadır [116]. IFN- γ disregülasyonuna bağlı CXCL9'un yükseldiği IL-18'in düştüğü ve MAS lehine bir ayrım olduğu MIS-C'de de gösterilmiştir [117, 118]. Ayrıca bu orandan başka CXCL9'un MIS-C'de önemli bir biyobelirteç olduğunu gösteren güçlü kanıtlar vardır [31, 49]. EULAR, ACR ve PRITO'nun 2016'daki konsensusuna [14] göre; platelet $\leq 181 \times 10^9/l$, aspartat aminotransferaz (AST) $> 48 U/l$, trigliserid $> 156 mg/dl$ ve fibrinojen $\leq 360 mg/dl$ gibi laboratuvar değerlerinden en az ikisinin yanında ferritin $> 685 ng/ml$ olması romatolojik bir hastalığı olan pediatrik febril bir hastada MAS tanısını koydurmaktadır. Tipik olarak MAS'da ateş, değişen bilinç durumu, lenfadenopati ve hepatosplenomegali görülmektedir. Sistemik JİA hastaları arasında MAS prevalansının %10 kadar olduğu bilinmekle beraber, subklinik MAS'ın JİA'li hastalarda %30-40 oranında görülebileceği son raporlarda bildirilmektedir [14]. Polanya'daki ulusal MIS-C kayıt sistemindeki DSÖ kriterlerine uyan 274 MIS-C hastasının 59'unun (%22) MAS'ın laboratuvar kriterlerini karşıladığı raporlanmıştır ve kohortumuzla benzer oranları paylaşmaktadır [52].

5.2. EDP

MISC hastalığında EDP'nin rolüne dair literatürde bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmayla MIS-C hastalarında EDP'nin rolünü anlamaya çalıştık. Tasarlayıp tekrarlanabilirliğini gösterdiğimiz yarışmalı ELISA protokolü ile serumda düzeyi ölçülen EDP'nin MIS-C hastalarında sağlıklı kontrollere göre düşüklüğü MIS-C hastalarında tanısal olabileceğinin bir göstergesidir. Bununla birlikte aynı MIS-C hastalarının hastanede ve taburcu olduktan sonra tedaviyle beraber klinik ve laboratuvardaki iyileşmeyle beraber anlamlı olarak EDP düzeyleri de yükselmektedir. Öyle ki taburculuk sonrası tedavisiz izlenen MIS-C hastaları, sağlıklı çocuklar ve pnömonili çocukların EDP düzeyleri arasında fark olmayışı EDP'nin, MIS-C hastalığının akut dönemindeki rolünü bir kez daha ortaya koymaktadır. MIS-C gibi çoklu organ tutulumuyla giden bir hastalıkta, hastalardaki EDP düşüklüğü ile hiçbir semptom ve organ tutulumunun ilişkilendirilememesi ve fenotipten de bağımsız olması EDP'nin MIS-C'ye özgü bir biyobelirteç olabileceği ya da spesifik bir organ tutulumunu temsil etmeyen negatif akut faz reaktanı gibi davranan bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. EDP'nin sağlıklı çocuklarda yaş aldıkça serumdaki düzeyinin düşmesi, MIS-C'de tedavi almaya başladıktan sonra klinik iyileşmeyle yükselen EDP düzeylerinin de yaş faktöründen etkilenerek serumda görece düşük izlenmesi bulgularımızdaki tutarlılığı kuvvetlendirmiştir. ELISA protokolümüzde kullanılan anti-tropoelastinlerin α -elastin ve tropoelastini bağlamasına dayanarak, MIS-C'lerdeki EDP'lerin düşük olması, MIS-C'nin akut bir hastalık olması ve uygun tedavi ile hızlı rezolüsyon göstermesi, elastin *turnoverı* içerisinde bu EDP'lerin degradasyonunun/*breakdown* olmadığını hatta hiperinflamatuvar durum esnasında tüketildiğini düşündürmektedir.

Anevrizmaların oluşmasında EDP'nin rolüne dair güçlü kanıtlar vardır. EDP'nin kanda artışı M1 tipi makrofajları arttırarak M1/M2 oranının artışına ve bu yolak üzerinden de MMP-9'un artmasına neden olur. MMP-9'ların elastinlerin yıkımında görev almasıyla EDP kendi artışını beslemektedir. Bu döngünün rolüyle abdominal aortada anevrizmaların (AAA) gelişimi gözlenmiştir [119]. Petersen ve arkadaşlarının yaptığı [100] bir çalışmada α -elastin kullanılarak hazırlanan ELISA'larla AAA olan hasta grubunda EDP düzeyleri araştırılmıştır. Bu çalışmada EDP seviyelerinin rüptüre AAA'sı olan hastalarda asemptomatik AAA'sı olanlara

göre anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir. Bu durumu yazarlar rüptüre AAA'da matür elastinin bozulmasıyla daha az EDP'nin tespit edilebildiğiyle ya da rüptüre AAA hastalarında düşük EDP seviyelerinin hemodilüsyona bağlı olabileceği şeklinde açıklamışlardır. Kardiyak patolojilerde anevrizma dışında aterosklerozun belirlenmesinde de EDP'ler kullanılabilir. Aynı grubun aynı ELISA protokolü ile bir sene sonra yayınladığı EDP çalışmasında [104], hem AAA'lı hastalarda (n=10) hem de semptomatik karotid stenozu (n=10) olan hastalarda EDP konsantrasyonları, şikayeti olmayan aterosklerozu olan hastalara (n=10) kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Sadece büyük arterlerin etkilendiği hastalıklarda değil ayrıca EDP'nin yükselişinin diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının da habercisi olabileceği bildirilmiştir [120]. Hasta popülasyonumuzdaki KAA vakalarının çok az olması, hastalarımızda AAA değil de KAA olması ve çok akut bir dönemde serum örneğinin alınmış olması literatürde daha önce gösterilen anevrizma-EDP ilişkisini doğrulayamamıştır. Bir yandan da bu çalışmalarda hasta sayısının az oluşu ve sadece bir çalışmada bilgisi verilen *intraassay CV* değerinin %40'ı bulması çalışmaların sonuçlarını tartışmaya açık hale getirmektedir.

Tropoelastin EDP sentezinde prekürsör olduğu için anti-tropoelastinlerin üretimi, alfa-elastinler degradasyonla ortaya çıktığı için yıkımı gösterir ve serumdaki anti-tropoelastinin α -elastine oranı, insanda elastin sentezi ve yıkımı için bir ölçüt olarak kullanılabilir ve kabaca elastin *turnover*ını gösterir. Colburn ve arkadaşlarınca [121] yapılan bir çalışmada anti- α -elastin ve anti-tropoelastin düzeylerinin sistemik sklerozdaki (SSc), romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, polimiyozit, vaskülit ve fibrozitlerden oluşan konnektif bağ doku hastalıklarında ELISA ile ölçümü yapılmış ve sağlıklı kontrollerle kıyaslanmıştır. SSc hastalarının diğer bağ dokusu hastalıkları ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek anti-alfa-elastin antikörlerinin olduğu ancak bağ dokusu hastalığı olan hastalar ve otoimmün olmayan hastalıklara kıyasla daha düşük anti-tropoelastin antikör seviyelerinin olduğu gösterilmiştir. Anti- α -elastin antikörlerinin patofizyolojisini tartışmak için literatürde çok kısıtlı bilgi olduğundan, kandaki düzeyleri bir patolojinin bir parçası mı, yoksa fazla elastini dolaşımdan uzaklaştırma mekanizmasının bir parçası mı olduğu net değildir ve açıklamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

EDP'nin önemli kaynaklarından biri cilttir. Deri tutulumuyla giden romatolojik hastalıklarda da bir biyobelirteç adayı olabileceği düşünülüp SSc hastalarında EDP düzeyleri Hong ve arkadaşları [99] tarafından çalışılmıştır. Bu çalışmada kullanılan yarışmalı ELISA protokolünde aortadan elde edilen α -elastin ve antikor olarak da anti- α -elastin kullanılmıştır. SSc hastalarında serum EDP ve anti-elastin antikor düzeylerinin yaş ve cinsiyet eşleştirilmesi yapıldığında, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla SSc hastalarında yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca anti-elastin antikor düzeyinin de çalışıldığı yaygın kutanöz SSc'de ve anti-santromer antikoronun yokluğunda anti elastin antikorların arttığı gösterilmiştir. Dahası hastalık süresi arttıkça EDP düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. MIS-C'nin akut bir hastalık olması ve uygun tedavi ile ateş ve hiperinflamasyon yanıtında gerilemenin görülmesi ortalama 6 [109, 122] gündür. Bu açıdan EDP düzeyinin artışı kronisiteye atfedilebilir. Sağlıklı kontrollerde yaş ile EDP düzeyleri arasında ters korelasyon bulunması bizim hastalarımızdaki EDP'nin yaşla düşüşüne de benzerdir.

Bu bulgulardan hareketle, MIS-C'de otoinflamatuvar izlerin ve otoantikörlerin tespit edilmesi [31] nedeniyle düşük bir ihtimal de olsa anti-elastin antikörlerin MIS-C'de varlığı EDP'lerin bu otoantikörlerle bağlanmasına, epitoplara bağlanmasıyla da bizim protokolümüzde düşük ölçülmesine neden olmuş olabilir. Başka bir senaryoda ise cilt tutulumunun fibrozisle gittiği SSc'de denatüre olan α -elastinlerin yüksekliği gösterilmiş olduğundan, MIS-C gibi hem cildi hem de kardiyovaskülopulmoner sistemi tutan ani gelişen bu hiperinflamatuvar durumun kronikleşmemesi ve skar bırakmadan hızlıca iyileşmesi, α -elastinlerin yükselmeyeşine açıklık getirirse de düşüklüğünü açıklamak için elimizde ve literatürde yeterli veri yoktur. Bir diğer yandan KH'de ve MIS-C'de artan TNF- α 'ya bağlı MMP-9 aktivasyonu gerçekleşip elastolizisi indüklediğinden, koroner arter anevrizmalarında ortaya çıkan biyoaktif EDP'dir [102, 123]. Tipik bir EDP (insan tropoelastin dizisinde altı kez tekrarlanan VGVAPG) olmasına rağmen, EDP'lere biyoaktivite kazandıran motif GXXPG'dir (X: herhangi bir amino asit) [124]. Bu nedenle, bulgularımızdaki EDP düzeyinin hiperinflamatuvar durumda dipte olması, inflamasyonun çözülmesi ile yükselme trendine girmesi, elastin yıkımında ortaya çıkan bu biyoaktif elastinlerin çeşitliliğine dair bir kanıt oluşturabilir.

Elastinin üretildiği bir başka yer de akciğerlerdir. Dillon ve arkadaşlarının [125] pulmoner amfizemde EDP düzeylerini, pulmoner elastin kullanarak geliştirdikleri ELISA protokolüyle ölçtükleri çalışmalarında, EDP düzeyi pulmoner amfizemli yetişkinlerde hastaliksız gruptan anlamlı derecede yüksek bulunmuş ve bu yüksek EDP düzeylerinin toraks bilgisayarlı tomografisi ile bakılan amfizem skorlarıyla korele olduğu gösterilmiştir. Ayrıca KOAH gibi hastalık durumlarında da akciğerlerde elastin yıkımı artmakta ve bu hastalarda yüksek EDP seviyeleri görülebilmektedir [126]. EDP düzeyinin SARS-CoV-2 pnömonili çocuklardaki düşüklüğü yarışmalı ELISA'da kullanılan insan aortasından elde edilmiş α -elastinlerin protokolde kullanılıyor oluşundan da kaynaklanıyor olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmayla EDP'lerin kantitasyonunu hem serumda hem de plazmada yüksek doğrulukta ve kesinlikte yapabilen yeni bir yarışmalı ELISA protokolü tanımlanmıştır. Bu yeni tanımlanan ELISA protokolü ile düzeyi serumda tayin edilen EDP, yüksek duyarlılıkla ve özgül olarak MIS-C tanısında ve tedavi izleminde kullanıma imkan vermektedir. MIS-C'nin yanında, EDP'nin SARS-CoV-2'ye bağlı ağır pnömonilerde de anlamlı olarak sağlıklı çocuklardan düşük olduğu gösterildiğinden pnömonilerde ve KH başta olmak üzere diğer hiperinflamatuvar durumlarda da bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülebilir. EDP'nin MIS-C'de negatif akut faz yanıtına benzer davranış göstermesinin nedenlerinin aydınlatılabilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. Çocuklarda Çoklu Sistemik İnflamatuvar Sendrom (MIS-C), genellikle geçirilen SARS-CoV-2 enfeksiyonundan 2-6 hafta sonra yüksek ateş, halsizlik, cilt bulguları ve mukokutanöz değişiklikler ile kendini belli eden, sıklıkla şok ve gastrointestinal sistem bulgularının ön planda olduğu birden fazla organı tutan, hayatı tehdit eden hiperinflamatuvar bir sendromdur. Tanısı klinik ve geçirilmiş SARS-CoV-2 enfeksiyonun gösterilmesi ile konulmakta fakat hastalığa özgü tanımlanmış bir biyobelirteç bulunmamaktadır. Damar duvarının en önemli bileşeni olan elastisiteyi ve tonusu sağlayan elastinler ve elastin türevi peptidlerin (EDP) önemli bir biyobelirteç vazifesi görebileceği düşünülerek, EDP'leri tayin etmek üzere, biyobelirteç araştırmalarında sıklıkla kullanılan ucuz, pratik, hızlı ve yüksek özgünlükte sonuç verebilen *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) protokolü oluşturmayı ve MIS-C'nin tanısında ve prognozunu belirlemede bu protokolün ve EDP'nin yerini araştırmayı hedefledik.
2. Bu amaçla öncelikle EDP ölçümü için yarışmalı indirekt ELISA protokolü geliştirilmiştir. Bu optimize edilmiş protokol *intra-assay CV'si* %1,96 ve *inter-assay CV'si* %7,64 kesinlikte serum örneklerinde ölçüm yapabilmektedir. Ayrıca serumda bire sekiz dilüsyonda dahi güvenilir geri kazanım yüzdeleri ile kullanıma elverişlidir.
3. Çalışmaya toplamda 90 MIS-C tanısı olan hasta dahil edilmiştir. Klinik fenotiplerine göre ayrıldığında 19 (%23) hasta ateş - inflamasyon, 34 (%36) hasta KH benzeri klinik ve 37 (%40) hasta şok ile başvurmuştur. Kontrol grubuna sağlıklı katılımcılardan oluşan 56 çocuk ve altta yatan hastalıkları olan ve solunum desteği ihtiyacı gelişmiş SARS-CoV-2'ye bağlı ağır pnömömonisi olan 9 çocuk alınmıştır.
4. MIS-C hastalarında en sık semptom %100 ile ateş olup ardından %80 oranında konjonktival kızarıklık görülmüştür. Organ tutulumlarına bakıldığında %83 oranında ve en sık olarak gastrointestinal sistemin en sık tutulan organ olarak öne çıktığı görülmekteydi. Ardından hastaların

%79'unda kardiyak tutulumun olduğu görüldü. Ayrıca ateş & inflamasyon fenotipinde hastaların yarısında, KH benzeri fenotipte her 4 hastanın üçünde ve şokta ise tüm hastalarda kardiyak tutulum vardı.

5. MIS-C'de tam kan sayımında lenfopeni ve trombositopeni görülürken, inflamatuvar belirteçlere bakıldığında CRP, ferritin, ESH, prokalsitonin ve IL-6'daki yükselmeler dikkat çekiciydi. Hastalık ciddiyetinde, şokun önemli bir prezentasyon olması nedeniyle CRP, ferritin ve prokalsitonin şok hastalarında diğer fenotiplerle kıyaslandığında anlamlı düzeyde yüksekken, ESH ve IL-6'daki yükselmelerde fenotipler arasında anlamlı bir fark yoktu.
6. MIS-C'li hastaların başvurusunda troponinin değeri yüksek olan 36 (%40) hasta ve BNP değeri yüksek olan 59 (%66) hasta vardı. Ekokardiyografik değerlendirmede hastaların hemen hemen yarısında kapak yetmezliği tespit edilirken, beşte birinde perikardiyal efüzyon görülmüştür. Kardiyak değerlendirme içinde bütün bulgular ve sonuçlar şok hastalarını anlamlı düzeyde diğer fenotiplerden ayırmaktaydı. Hastanede yatış esnasında sadece 4 hastada koroner arter anormalliği (Boston Z-skoru>2) görüldü. Hastalardan yalnızca biri ECMO'ya girdi ve bu hasta dahil hiçbir hasta eksitus olmadı. Bu hastaların ilk poliklinik kontrollerindeki ekokardiyografik değerlendirmede tüm dilatasyonların düzeldiği görüldü.
7. MIS-C tanılı hastalardan tedavi öncesi ve sonrası farklı zamanlarda alınan serum örneklerinde ve kontrol grubu olarak seçilen sağlıklı çocukların ve pnömonili çocukların serum örneklerinde EDP düzeyleri yeni geliştirilen yarışmalı indirekt ELISA protokolü ile ölçülmüştür.
8. Tüm MIS-C hastalarının EDP düzeyleri fenotipik olarak tedavi öncesi alınan serum numunelerinde her bir fenotipin sağlıklı çocuklarla arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu, fakat fenotipler arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Tedavi esnası ve poliklinik takip zamanlarında alınan serum örneklerinde EDP düzeyinin MIS-C'nin fenotipleri arasında fark gözlenmedi.

9. Hastalardaki tedavi öncesi EDP düşüklüğü ile hiçbir semptom ve organ tutulumunun ilişkilendirilememesi ve fenotipten de bağımsız olması EDP'nin MIS-C'ye özgü bir biyobelirteç olabileceği ya da spesifik bir organ tutulumunu temsil etmeyen negatif akut faz reaktanı olabileceğini düşündürmektedir.
10. MISC'lilerde EDP'deki tedavi öncesi dönemdeki düşüklüğün MIS-C tanısı koymada ayırt ediciliği yeterliydi (AUC: 0.87). Öyle ki MIS-C'li hastalardan rastgele seçilen birinin EDP düzeyindeki düşüklük %87 olasılıkla tanı koydurucudur; bu da geliştirilen ELISA protokolü ile ölçülen EDP düzeylerinin tanısal yeterliliğini ve doğruluğunu göstermektedir.
11. Çocuklarda SARS-CoV-2'ye bağlı ağır pnömonide de EDP düzeyindeki düşüklük olsa da MIS-C'deki kadar tanısal değildir, aralarında anlamlı fark vardır.
12. MIS-C hastaları önce serumların alınma zamanına göre tedavi öncesi tedavi esnası ve poliklinikte takip olarak ayrılıp, ardından da MIS-C fenotiplerine göre EDP düzeyleri yaş ekseninde değerlendirildiğinde, KH benzeri fenotip dışında ateş-inflamasyon ile şok fenotipindeki hastalarda tedavi öncesi, tedavi esnası ve poliklinikteki takiplerinde hastaların yaşla beraber EDP düzeylerinin genel MIS-C ve sağlıklı çocuk kohortundaki gibi düştüğü gözlemlendi. KH benzeri grupta ise tedavi öncesi ve tedavi esnasında EDP düzeyleri yaşla beraber artmakta iken poliklinik takiplerinde/ iyileştikten sonra diğer çocuklar gibi yaşla EDP düzeyinin düşüşü izlendi.
13. EDP düzeyindeki düşüklüğün hiperinflamatuvar durum ya da sitokin fırtınası ile mi ilişkili yoksa MIS-C'ye özgü mü olduğunun araştırılması ve klinik kullanımdaki etkinliğinin gösterilmesi için sepsis, viral enfeksiyonlara ikincil gelişen hemofagositik sendrom, KH ve KH'ye ikincil gelişen MAS'ın kontrol grubu olduğu yeni bir çalışma planlanabilir.

7. KAYNAKÇA

1. Li, Q., et al., *Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia*. N Engl J Med, 2020. 382(13): p. 1199-1207.
2. Ouldali, N., et al., *Association of Intravenous Immunoglobulins Plus Methylprednisolone vs Immunoglobulins Alone With Course of Fever in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children*. JAMA, 2021. 325(9): p. 855-864.
3. Organization, W.H. *Coronavirus disease (COVID-19) pandemic*. 2023 [cited 2023 Dec 17, 2023]; Available from: <https://www.who.int/europe/emergencies/situations/covid-19>.
4. Chan, J.F.-W., et al., *A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster*. The Lancet, 2020. 395(10223): p. 514-523.
5. Ozsurekci, Y., et al., *Methylprednisolone use in children with severe pneumonia caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*. Pediatr Int, 2023. 65(1): p. e15603.
6. Cokugras, H. and P. Onal, *SARS-CoV-2 infection in children*. Turk Pediatri Ars, 2020. 55(2): p. 95-102.
7. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor*. Cell, 2020. 181(2): p. 271-280 e8.
8. van Eijk, L.E., et al., *COVID-19: immunopathology, pathophysiological mechanisms, and treatment options*. J Pathol, 2021. 254(4): p. 307-331.
9. Mortaz, E., et al., *The Immune Response and Immunopathology of COVID-19*. Front Immunol, 2020. 11: p. 2037.
10. Jiang, L., et al., *COVID-19 and multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents*. The Lancet Infectious Diseases, 2020. 20(11): p. e276-e288.
11. Gustine, J.N. and D. Jones, *Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19*. Am J Pathol, 2021. 191(1): p. 4-17.
12. Yang, H., Y. Lyu, and F. Hou, *SARS-CoV-2 infection and the antiviral innate immune response*. J Mol Cell Biol, 2020. 12(12): p. 963-967.
13. Yuan, C., et al., *The role of cell death in SARS-CoV-2 infection*. Signal Transduct Target Ther, 2023. 8(1): p. 357.
14. Ravelli, A., et al., *2016 Classification Criteria for Macrophage Activation Syndrome Complicating Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis: A European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology/Paediatric Rheumatology International Trials Organisation Collaborative Initiative*. Arthritis Rheumatol, 2016. 68(3): p. 566-76.
15. Gautret, P., et al., *Natural history of COVID-19 and therapeutic options*. Expert Rev Clin Immunol, 2020. 16(12): p. 1159-1184.

16. Ozsurekci, Y., et al., *Predictive value of cytokine/chemokine responses for the disease severity and management in children and adult cases with COVID-19*. Journal of Medical Virology, 2020. 93(5): p. 2828-2837.
17. Rodriguez, Y., et al., *Autoinflammatory and autoimmune conditions at the crossroad of COVID-19*. J Autoimmun, 2020. 114: p. 102506.
18. D'Alessandro, A., et al., *Serum Proteomics in COVID-19 Patients: Altered Coagulation and Complement Status as a Function of IL-6 Level*. J Proteome Res, 2020. 19(11): p. 4417-4427.
19. Saji, B.T., et al., *Kawasaki Disease Current Understanding of the Mechanism and Evidence-Based Treatment*. Springer Japan, 2017.
20. McCrindle, B.W., et al., *Diagnosis, Treatment, and Long-Term Management of Kawasaki Disease: A Scientific Statement for Health Professionals From the American Heart Association*. Circulation, 2017. 135(17): p. e927-e999.
21. Chaudhary, H., et al., *Biomarkers for Kawasaki Disease: Clinical Utility and the Challenges Ahead*. Front Pediatr, 2019. 7: p. 242.
22. Rife, E. and A. Gedalia, *Kawasaki Disease: an Update*. Curr Rheumatol Rep, 2020. 22(10): p. 75.
23. Riphagen, S., et al., *Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic*. Lancet, 2020. 395(10237): p. 1607-1608.
24. Prevention, C.f.D.C.a. *CDC/CSTE Standardized Case Definition for Surveillance of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Associated with SARS-CoV-2 Infection*. January 3, 2023; Available from: https://www.cdc.gov/mis/mis-c/hcp_cstecdc/index.html.
25. Organization, W.H. *Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents with COVID-19: Scientific Brief*. 15 May 2020; Available from: <https://www.who.int/publications-detail/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>.
26. Sharma, C., et al., *Multisystem inflammatory syndrome in children and Kawasaki disease: a critical comparison*. Nat Rev Rheumatol, 2021. 17(12): p. 731-748.
27. Noval Rivas, M. and M. Arditi, *Kawasaki disease: pathophysiology and insights from mouse models*. Nat Rev Rheumatol, 2020. 16(7): p. 391-405.
28. Ramaswamy, A., et al., *Immune dysregulation and autoreactivity correlate with disease severity in SARS-CoV-2-associated multisystem inflammatory syndrome in children*. Immunity, 2021. 54(5): p. 1083-1095 e7.
29. Porritt, R.A., et al., *HLA class I-associated expansion of TRBV11-2 T cells in multisystem inflammatory syndrome in children*. J Clin Invest, 2021. 131(10).
30. Gruber, C., et al., *Mapping Systemic Inflammation and Antibody Responses in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C)*. medRxiv, 2020.
31. Consiglio, C.R., et al., *The Immunology of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children with COVID-19*. Cell, 2020. 183(4): p. 968-981 e7.

32. Porritt, R.A., et al., *The autoimmune signature of hyperinflammatory multisystem inflammatory syndrome in children*. J Clin Invest, 2021. 131(20).
33. Whittaker, E., et al., *Clinical Characteristics of 58 Children With a Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated With SARS-CoV-2*. JAMA, 2020. 324(3): p. 259-269.
34. Santos, M.O., et al., *Multisystem inflammatory syndrome (MIS-C): a systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, treatment, and outcomes*. J Pediatr (Rio J), 2022. 98(4): p. 338-349.
35. Ozsurekci, Y., et al., *Multisystem inflammatory syndrome in children during the COVID-19 pandemic in Turkey: first report from the Eastern Mediterranean*. Clin Rheumatol, 2021. 40(8): p. 3227-3237.
36. Feldstein, L.R., et al., *Characteristics and Outcomes of US Children and Adolescents With Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Compared With Severe Acute COVID-19*. JAMA, 2021. 325(11): p. 1074-1087.
37. Son, M.B.F., et al., *Multisystem Inflammatory Syndrome in Children - Initial Therapy and Outcomes*. N Engl J Med, 2021. 385(1): p. 23-34.
38. Watanabe, A., et al., *Extracorporeal Membrane Oxygenation in Children With COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Pediatr Crit Care Med, 2023. 24(5): p. 406-416.
39. Lishman, J., et al., *Acute Appendicitis in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children With COVID-19*. Pediatr Infect Dis J, 2020. 39(12): p. e472-e473.
40. Boybeyi-Turer, O., et al., *Management of acute abdomen during the active disease course of COVID-19 and multisystem inflammatory syndrome in children*. Surg Today, 2022. 52(9): p. 1313-1319.
41. Kanmaniraja, D., et al., *Review of COVID-19, part 1: Abdominal manifestations in adults and multisystem inflammatory syndrome in children*. Clin Imaging, 2021. 80: p. 88-110.
42. Tripathi, A.K., et al., *Acute kidney injury following multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 infection in children: a systematic review and meta-analysis*. Pediatr Nephrol, 2023. 38(2): p. 357-370.
43. Sethi, S.K., et al., *Kidney involvement in multisystem inflammatory syndrome in children: a pediatric nephrologist's perspective*. Clin Kidney J, 2021. 14(9): p. 2000-2011.
44. Deep, A., et al., *Acute Kidney Injury in Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Pandemic: Experience From PICUs Across United Kingdom*. Crit Care Med, 2020. 48(12): p. 1809-1818.
45. Aronoff, S.C., A. Hall, and M.T. Del Vecchio, *The Natural History of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Related Multisystem Inflammatory Syndrome in Children: A Systematic Review*. J Pediatric Infect Dis Soc, 2020. 9(6): p. 746-751.

46. Ghezzi, M., et al., *Lung involvement in children with COVID-19 multisystem inflammatory syndrome*. *Pediatr Pulmonol*, 2023. 58(2): p. 615-618.
47. Young, C.C., et al., *Clinical Course Associated with Aseptic Meningitis Induced by Intravenous Immunoglobulin for the Treatment of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children*. *J Pediatr*, 2023. 257: p. 113372.
48. Laçinel Gürlevik, S., et al., *Neurologic manifestations in children with COVID-19 from a tertiary center in Turkey and literature review*. *Eur J Paediatr Neurol*, 2022. 37: p. 139-154.
49. Diorio, C., et al., *Proteomic profiling of MIS-C patients indicates heterogeneity relating to interferon gamma dysregulation and vascular endothelial dysfunction*. *Nat Commun*, 2021. 12(1): p. 7222.
50. Kumar, R., M.J. Rivkin, and L. Raffini, *Thrombotic complications in children with Coronavirus disease 2019 and Multisystem Inflammatory Syndrome of Childhood*. *J Thromb Haemost*, 2023. 21(9): p. 2313-2326.
51. Lacinel Gurlevik, S., et al., *Hemophagocytosis in bone marrow aspirates in multisystem inflammatory syndrome in children*. *Pediatr Blood Cancer*, 2021. 68(6): p. e28931.
52. Buda, P., et al., *Clinical characteristics of children with MIS-C fulfilling classification criteria for macrophage activation syndrome*. *Front Pediatr*, 2022. 10: p. 981711.
53. Naka, F., et al., *A dermatologic perspective on multisystem inflammatory syndrome in children*. *Clin Dermatol*, 2021. 39(2): p. 337-343.
54. Young, T.K., et al., *Mucocutaneous Manifestations of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children During the COVID-19 Pandemic*. *JAMA Dermatol*, 2021. 157(2): p. 207-212.
55. Toraih, E.A., et al., *Multisystem inflammatory syndrome in pediatric COVID-19 patients: a meta-analysis*. *World J Pediatr*, 2021. 17(2): p. 141-151.
56. Zhao, Y., et al., *The inflammatory markers of multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and adolescents associated with COVID-19: A meta-analysis*. *J Med Virol*, 2021. 93(7): p. 4358-4369.
57. Palabiyik, F., et al., *Imaging of Multisystem Inflammatory Disease in Children (MIS-C) Associated With COVID-19*. *Acad Radiol*, 2021. 28(9): p. 1200-1208.
58. Ardicli, B., et al., *Favourable outcomes of conservatively managed acute abdomen associated with multisystem inflammatory syndrome in children during the COVID-19 pandemic*. *ANZ J Surg*, 2023. 93(1-2): p. 108-114.
59. Chen, M.R., et al., *Phenotype, Susceptibility, Autoimmunity, and Immunotherapy Between Kawasaki Disease and Coronavirus Disease-19 Associated Multisystem Inflammatory Syndrome in Children*. *Front Immunol*, 2021. 12: p. 632890.
60. Harwood, R., et al., *A national consensus management pathway for paediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with COVID-19*

- (PIMS-TS): results of a national Delphi process. *Lancet Child Adolesc Health*, 2021. 5(2): p. 133-141.
61. Bakanlığı, T.C.S. *COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Çocuk Hasta Yönetimi ve Tedavi*. 2020; Available from: <https://covid19.saglik.gov.tr/TR-66342/cocuk-hasta-yonetimi-ve-tedavi.html>.
 62. Suratannon, N., et al., *COVID-19 in children: Heterogeneity within the disease and hypothetical pathogenesis*. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2020. 38(3): p. 170-177.
 63. Gruber, C.N., et al., *Mapping Systemic Inflammation and Antibody Responses in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C)*. *Cell*, 2020. 183(4): p. 982-995 e14.
 64. Zhang, J., K.M. Tecson, and P.A. McCullough, *Endothelial dysfunction contributes to COVID-19-associated vascular inflammation and coagulopathy*. *Rev Cardiovasc Med*, 2020. 21(3): p. 315-319.
 65. Henderson, L.A., et al., *American College of Rheumatology Clinical Guidance for Multisystem Inflammatory Syndrome in Children Associated With SARS-CoV-2 and Hyperinflammation in Pediatric COVID-19: Version 3*. *Arthritis Rheumatol*, 2022. 74(4): p. e1-e20.
 66. Panel, C.-T.G., *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines*. 2020, National Institutes of Health.
 67. Bennisroune, A., et al., *Elastic fibers and elastin receptor complex: Neuraminidase-I takes the center stage*. *Matrix Biol*, 2019. 84: p. 57-67.
 68. Powell, J.T., N. Vine, and M. Crossman, *On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta*. *Atherosclerosis*, 1992. 97(2-3): p. 201-8.
 69. Hinek, A. and M. Rabinovitch, *67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin*. *J Cell Biol*, 1994. 126(2): p. 563-74.
 70. Heinz, A., *Elastases and elastokines: elastin degradation and its significance in health and disease*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2020. 55(3): p. 252-273.
 71. Ozsvar, J., et al., *Tropoelastin and Elastin Assembly*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021. 9: p. 643110.
 72. Schmelzer, C.E.H., et al., *Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)-mediated cross-linking of tropoelastin*. *FASEB J*, 2019. 33(4): p. 5468-5481.
 73. Chao, Y.-H., et al., *Elastin-Derived Peptides Induce Inflammatory Responses through the Activation of NF- κ B in Human Ligamentum Flavum Cells*. *Connective Tissue Research*, 2012. 53(5): p. 407-414.
 74. Mecham, R.P., et al., *Ligand affinity of the 67-kD elastin/laminin binding protein is modulated by the protein's lectin domain: visualization of elastin/laminin-receptor complexes with gold-tagged ligands*. *J Cell Biol*, 1991. 113(1): p. 187-94.

75. Le Page, A., et al., *The role of elastin-derived peptides in human physiology and diseases*. Matrix Biol, 2019. 84: p. 81-96.
76. Jariwala, N., et al., *Matrikines as mediators of tissue remodelling*. Adv Drug Deliv Rev, 2022. 185: p. 114240.
77. Maurice, P., et al., *Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: the elastokine concept*. Trends Cardiovasc Med, 2013. 23(6): p. 211-21.
78. Schmelzer, C.E.H. and L. Duca, *Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease*. FEBS J, 2022. 289(13): p. 3704-3730.
79. Robinet, A., et al., *Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP*. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 2): p. 343-56.
80. Nackman, G.B., et al., *Elastin degradation products induce adventitial angiogenesis in the Anidjar/Dobrin rat aneurysm model*. Surgery, 1997. 122(1): p. 39-44.
81. Faury, G., et al., *Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells*. Circ Res, 1998. 82(3): p. 328-36.
82. Katsuda, S. and T. Kaji, *Atherosclerosis and extracellular matrix*. J Atheroscler Thromb, 2003. 10(5): p. 267-74.
83. Phinikaridou, A., et al., *Tropoelastin: A novel marker for plaque progression and instability*. Circ Cardiovasc Imaging, 2018. 11(8).
84. Chow, M.J., et al., *Progressive structural and biomechanical changes in elastin degraded aorta*. Biomech Model Mechanobiol, 2013. 12(2): p. 361-72.
85. Lau, A.C., et al., *Matrix metalloproteinase 9 activity leads to elastin breakdown in an animal model of Kawasaki disease*. Arthritis Rheum, 2008. 58(3): p. 854-63.
86. Wang, K., X. Meng, and Z. Guo, *Elastin Structure, Synthesis, Regulatory Mechanism and Relationship With Cardiovascular Diseases*. Front Cell Dev Biol, 2021. 9: p. 596702.
87. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. 8(9): p. 871-4.
88. Hosseini, S., et al., *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): From a to Z*. 1st 2018 edition. ed. 2018, Singapore: Singapore: Springer Singapore Pte. Limited.
89. Wild, D. and R. John, *The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques / edited by David Wild associate editors, Rhys John and others*. 4th ed. 2013, Oxford: Oxford: Elsevier.
90. Lin, A.V., *Indirect ELISA*, in *ELISA: Methods and Protocols*, R. Hnasko, Editor. 2015, Springer New York: New York, NY. p. 51-59.

91. Caifeng Zhao, H.Z., M.Q. Swapan Roy, and A.A. Amenah, *AlbuVoid* Coupled to On-Bead Digestion - Tackling the Challenges of Serum Proteomics. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 2015. 08(09).
92. Crowther, J.R., *The ELISA guidebook*. *Methods Mol Biol*, 2000. 149: p. III-IV, 1-413.
93. Güler Temizkan, N.A., *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri*. 2018, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
94. Borman, P. and D. Elder, *Q2(R1) Validation of Analytical Procedures*, in *ICH Quality Guidelines*. 2017. p. 127-166.
95. Bagri, N.K., et al., *Outcomes of multisystem inflammatory syndrome in children temporally related to COVID-19: a longitudinal study*. *Rheumatol Int*, 2022. 42(3): p. 477-484.
96. Örnemark, B.M.a.U., *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 2nd ed. 2014.
97. Group, R.C., *Immunomodulatory therapy in children with paediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with SARS-CoV-2 (PIMS-TS, MIS-C; RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial*. *Lancet Child Adolesc Health*, 2024. 8(3): p. 190-200.
98. Rajna, M. and Z. Irena, *Optimization, Validation and Standardization of ELISA*, in *Norovirus*, M. Gyula, Editor. 2020, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 2.
99. Hong, Y.J., et al., *Serum elastin-derived peptides and anti-elastin antibody in patients with systemic sclerosis*. *J Korean Med Sci*, 2012. 27(5): p. 484-8.
100. Petersen, E., et al., *Serum levels of elastin-derived peptides in patients with ruptured and asymptomatic abdominal aortic aneurysms*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2001. 22(1): p. 48-52.
101. Sivaprasad, S., N.V. Chong, and T.A. Bailey, *Serum elastin-derived peptides in age-related macular degeneration*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005. 46(9): p. 3046-51.
102. Fisch, A., *Elastin-Derived Peptides in the Pathogenesis of Kawasaki Disease*, in *Department of Immunology*. 2019, University of Toronto.
103. Berard RA, T.H., Scuccimarri R, Haddad E, Morin MP, Chan KJ, Dahdah NS, McCrindle BW, Price VE, Yeung RSM, Laxer RM, Acute Care Committee. *Paediatric inflammatory multisystem syndrome temporally associated with COVID-19 (spring 2021 update)*. 2020 03.05.2021 [cited 2024 02.02.2024]; Available from: <https://cps.ca/documents/position/pims#ref33>.
104. Petersen, E., F. Wagberg, and K.A. Angquist, *Serum concentrations of elastin-derived peptides in patients with specific manifestations of atherosclerotic disease*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2002. 24(5): p. 440-4.
105. Hassanzad, M. and K. Hajian-Tilaki, *Methods of determining optimal cut-point of diagnostic biomarkers with application of clinical data in ROC analysis: an update review*. *BMC Med Res Methodol*, 2024. 24(1): p. 84.

106. Unal, I., *Defining an Optimal Cut-Point Value in ROC Analysis: An Alternative Approach*. *Comput Math Methods Med*, 2017. 2017: p. 3762651.
107. Wei, S.M., et al., *Epitope specificity of monoclonal and polyclonal antibodies to human elastin*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998. 115(1): p. 33-41.
108. McArdle, A.J., et al., *Treatment of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children*. *N Engl J Med*, 2021. 385(1): p. 11-22.
109. Channon-Wells, S., et al., *Immunoglobulin, glucocorticoid, or combination therapy for multisystem inflammatory syndrome in children: a propensity-weighted cohort study*. *Lancet Rheumatol*, 2023. 5(4): p. e184-e199.
110. Ghazizadeh Esslami, G., et al., *Systematic review and meta-analysis on the serological, immunological, and cardiac parameters of the multisystem inflammatory syndrome (MIS-C) associated with SARS-CoV-2 infection*. *J Med Virol*, 2023. 95(7): p. e28927.
111. Jiang, L., et al., *Epidemiology, Clinical Features, and Outcomes of Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) and Adolescents-a Live Systematic Review and Meta-analysis*. *Curr Pediatr Rep*, 2022. 10(2): p. 19-30.
112. Grimaud, M., et al., *Acute myocarditis and multisystem inflammatory emerging disease following SARS-CoV-2 infection in critically ill children*. *Ann Intensive Care*, 2020. 10(1): p. 69.
113. Brisca, G., et al., *Timely Recognition and Early Multi-Step Antinflammatory Therapy May Prevent ICU Admission of Patients With MIS-C: Proposal for a Severity Score*. *Front Pediatr*, 2021. 9: p. 783745.
114. Reiff, D.D. and R.Q. Cron, *Timely Resolution of SARS-CoV-2-Related Multi-System Inflammatory Syndrome in Children*. *Viruses*, 2022. 15(1).
115. Porritt, R.A., et al., *Interleukin-1 Beta-Mediated Sex Differences in Kawasaki Disease Vasculitis Development and Response to Treatment*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020. 40(3): p. 802-818.
116. Canna, S.W. and R.A. Marsh, *Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis*. *Blood*, 2020. 135(16): p. 1332-1343.
117. Rodriguez-Smith, J.J., et al., *Inflammatory biomarkers in COVID-19-associated multisystem inflammatory syndrome in children, Kawasaki disease, and macrophage activation syndrome: a cohort study*. *Lancet Rheumatol*, 2021. 3(8): p. e574-e584.
118. Diorio, C., et al., *Proteomic profiling of MIS-C patients indicates heterogeneity relating to interferon gamma dysregulation and vascular endothelial dysfunction*. *Nature Communications*, 2021. 12(1): p. 7222.
119. Dale, M.A., et al., *Elastin-Derived Peptides Promote Abdominal Aortic Aneurysm Formation by Modulating M1/M2 Macrophage Polarization*. *J Immunol*, 2016. 196(11): p. 4536-43.
120. Nicoloff, G., et al., *Relationship between elastin-derived peptides and the development of microvascular complications: a longitudinal study in children*

- with Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus.* Gen Pharmacol, 2000. 35(2): p. 59-64.
121. Colburn, K.K., et al., *Serum anti-tropo:anti-alpha-elastin antibody ratio assessing elastin turnover in scleroderma.* Clin Rheumatol, 1992. 11(2): p. 206-10.
 122. El Tal, T., et al., *Paediatric inflammatory multisystem syndrome in Canada: population-based surveillance and role of SARS-CoV-2 linkage.* Pediatr Res, 2023. 94(5): p. 1744-1753.
 123. Sacco, K., et al., *Immunopathological signatures in multisystem inflammatory syndrome in children and pediatric COVID-19.* Nat Med, 2022. 28(5): p. 1050-1062.
 124. Brassart, B., et al., *Conformational Dependence of Collagenase (Matrix Metalloproteinase-1) Up-regulation by Elastin Peptides in Cultured Fibroblasts*.* Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(7): p. 5222-5227.
 125. Dillon, T.J., et al., *Plasma elastin-derived peptide levels in normal adults, children, and emphysematous subjects. Physiologic and computed tomographic scan correlates.* Am Rev Respir Dis, 1992. 146(5 Pt 1): p. 1143-8.
 126. Schriver, E.E., et al., *Comparison of elastin peptide concentrations in body fluids from healthy volunteers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease.* Am Rev Respir Dis, 1992. 145(4 Pt 1): p. 762-6.