

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**BİYOTİNİDAZ ENZİM EKSİKLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE
SPEKTROFOTOMETRİK VE FLOROMETRİK YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Sevgin Özlem İŞERİ-ERTEN

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA

2014

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**BİYOTİNİDAZ ENZİM EKSİKLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE
SPEKTROFOTOMETRİK VE FLOROMETRİK YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Sevgin Özlem İŞERİ-ERTEN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Z. Günnur DİKMEN

Ortak Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nuray ULUSU

ANKARA

2014

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında öncelikle, bu zorlu sürecin her saniyesini benimle birlikte yaşayan, paylaşan sevgili eşim İhsan Erten'edesteği, anlayışı ve fedakarlığı için teşekkür ederim.

Tez çalışmama yaptıkları katkılardan dolayı danışman hocalarım Prof. Dr. Nuray Ulusu ve Doç. Dr. Z. Günnur Dikmen'e, Merkez Laboratuvarı'ndaki rotasyonum sırasında sağladığı imkanlar nedeniyle Prof.Dr.Filiz Akbıyık'a ve uzmanlık eğitimimde emeği geçen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi (Proje No: 887) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

İşeri-Erten, S.Ö., Biotinidaz enzim eksikliğinin değerlendirilmesinde spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerin karşılaştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi. Ankara, 2014.

Biyotin, karboksilasyon tepkimelerine katılan enzimler tarafından kofaktör olarak kullanılınsuda çözünen vitamindir. Biyotin bağımlı karboksilazlara karboksil taşıyıcısı olarak rol oynar. Bu enzimler, glukoneojenez, yağ asit metabolizması ve amino asitkatabolizmasında ve biyotin metabolik homeostazının sağlanmasında önemli rol alır.Biyotinidaz,endojen ve diyetle alınan biyotinin dönüşümünü sağlar.

Biyotinidaz enzim eksikliği otozomal resesif geçişli olup biyotin dönüşümünde bozuklukla karakterizedir. Tedavi edilmediğindenörolojik ve kutanöz semptomlara yol açar.Akraba evliliklerinin yaygın olduğu (%26)Orta Anadolu'dabiyotinidaz enzim eksikliği sık görülmektedir.Farmakolojik dozda biyotin vitamini takviyesi ile hastalık semptomlarının azalması ve önlenmesi sağlanabilir. Yenidoğanlarda biyotinidaz enzim eksikliği taraması ülkemiz dahil pek çok ülkede uygulanmaktadır. Biyotidinaz enzimi aktivitesinin tayini spektrofotometrikve florometrik yöntemle yapılabilir. Spektrofotometrik yöntemde biyotinidaz enzim aktivitesi tayini için“n-biyotininil-p-aminobenzoat”, florometrik yöntemde ise “biyotininil-6-aminokinolin” substrat olarak kullanılır.

Bu tez çalışması kapsamında, florometrik yöntemin fakültemizde kurulması üzerinde çalışıldı. Farklı iki metodun (spektrofotometrik ve florometrik) sonuçları karşılaştırılarak avantaj ve dezavantajlarıdeğerlendirildi.

H.Ü. Çocuk Hastanesi, Metabolizma Ünitesine, 1 yıllık süre içinde, BTD enzimi eksikliği şüphesi ile başvuran ve kantitatif BTD ölçümü istenen yenidoğan, çocuklar ve ana-babaları (n=52) çalışmamıza dahil edilmiştir. Çalışmanın etik kurul izni, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 23.01.2013 tarih ve LUT 12/178-12 numara ilealınmıştır. Referans aralığı florometrik yöntemde 3,53-3,79 U/L, spektrofotometrik yöntemde ise 4,4-12 U/L olarak kabul edilmiştir.Bulgularımıza göre biyotinidaz aktivitesinin oda ısısında ve 4°C'de 2 saat, -20°C'de 2 ay ve -80°C'de aylarca stabil kalabilmektedir. Genetik ve klinik muayene sonuçlarına göre çalışma grubunun %25'i tam enzim eksikliği,

%15'i kısmi enzim eksikliği, %60'ı ise sağlamlardan oluşmaktadır. Tam enzim eksikliği olanlar 10 mg/gün biyotin, kısmi enzim eksikliği olanlar ise 5 mg/gün biyotin ile tedavi edilmektedir. Florometrik ve spektrofotometrik ölçümde ROC eğrisi altında kalan alan sırasıyla $0,960\pm0,25$ ve $0,927\pm0,41$ ölçülmüştür. Florometrik testin duyarlılığı %100, özgüllüğü %97 olarak saptanırken, spektrofotometrik yöntemin duyarlılığı %90,5; özgüllüğü %93,7 bulunmuştur. Sonuç olarak duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek bulunan florometrik yöntem, biyotinidaz eksikliği olan hastalarda doğru tanıyı koymada spektrofotometrik yöntemden daha üstündür.

Anahtar kelimeler: Biyotinidaz, spektrofotometri, florometri

Destekleyen kuruluş: HÜTF Bilimsel Araştırmalar Birimi Proje No: 887

ABSTRACT

İşeri-Erten, S.Ö., Comparisson of spectrophotometric and flourometric methods in evaluation of biotinidase deficiency. Hacettepe University Medical Faculty, Clinical Biochemistry specialty thesis. Ankara, 2014.

Biotin, a water-soluble vitamin, is used as a co-factor by enzymes involved in carboxylation reactions. It functions as the carboxyl carrier for biotin-dependent carboxylases which catalyze gluconeogenesis, fatty acid metabolism and amino acid catabolism, thus biotin plays an essential role in maintaining metabolic homeostasis. Biotinidase catalyses the recycle of biotin from endogenous and dietary sources.

Biotinidase deficiency is an autosomal recessively inherited disorder of biotin recycling that is associated with neurologic and cutaneous consequences when remain untreated. In central Anatolia where marriages between relatives are very common (26%), the insidance of biotinidase deficiency is high. Fortunately, the clinical features of the disorder can be ameliorated or prevented by administering pharmacological doses of the vitamin biotin. Neonatal screening for biotinidase deficiency is conducted in many countries including our country.

Spectrophotometric or fluorometric assays are used to measure biotinidase activity. The enzyme activity is determined spectrophotometrically by measuring the hydrolysis of “n-biotinyl-p-aminobenzoate” substrate while “biotinyl-6-aminoquinoline” is used as a substrate in the fluorometric method.

In this study, we aim to set fluorometric method in our hospital and compare the results of the colorimetric and fluorometric methods, additionally to evaluate the advantages and disadvantages of both methods.

Study group were chosen among the BTDD deficiency suspected newborn, children and parents (n=52) who applied to Hacettepe University Pediatric Metabolism Unit, for the BTDD activity check up. Ethical approval was taken from Hacettepe University Medical Faculty Clinical Research Ethics Committee (date: 23.01.2013 and number: LUT 12/178-12). Reference range for fluorometric method is 3,53-3,79 U/L and for spectrophotometric method is 4,4-12 U/L. According to our results, biotinidase activity is stable for 2 hours at room temperature and at 4°C, 2 months at -20°C and several months at -80°C. Genetic and clinical results showed that 25% of

the total patients have complete BTB deficiency and treated with 10 mg/day biotin while 15,38% of the patients have partial BTB deficiency and had 5 mg/day biotin treatment. When area under the ROC curve was measured for fluorometric and spectrophotometric method, it was found as $0,960\pm 0,25$ and $0,927\pm 0,41$ respectively. Fluorometric method showed 100% sensitivity and 97% specificity whereas spectrophotometric method showed 90,5% sensitivity and 93,7% specificity. As a result, we can conclude that fluorometric method is superior to spectrophotometric method due to higher sensitivity and specificity.

Keywords: Biotinidase, spectrophotometry, fluorometry

Supported by: Hacettepe University Medical Faculty Scientific Research Department,
Project No: 887

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xii
TABLOLAR	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Biotinidaz (EC 3.5.1.12) Enzim Eksikliği	1
1.2. Enzim Eksikliğinin Yaygınlığı	2
1.3. Enzim Eksikliğinin Tedavisi	4
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Biotinidazın Enziminin Biyokimyasal Özellikleri	6
2.1.1. Biotinidazın Doku Dağılımı, Yapısı ve Görevi	6
2.1.2. Biotinidaz Eksikliğinin Metabolik Sonuçları	6
2.2. Biotin (Vitamin B7, Vitamin H) ve Fizyolojik Fonksiyonları	8
2.3. Metodun Kalite Kontrolü ve Biotinidaz Miktar Tayini	13
2.4. Referans Aralığı	13
2.5. Test Sonuçlarının Yorumu	13
2.6. BTDEksikliğinin Derecesi Tedaviye Olan İhtiyacı Değiştirir mi?	14
2.7. Enzim Eksikliğinin Tanısında Kullanılan Yöntemler	14
2.7.1. Kolorimetrik (Spektrofotometrik) Ölçüm Yöntemi	14
2.7.2. Florometrik Ölçüm Yöntemi	15
2.7.3. Radyoiyot Ölçüm Yöntemi	15
2.7.4. Fibroblastlardan Ölçüm Yöntemi	15
2.7.5. HPLC	15
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	19
3.1. Çalışma Popülasyonu	19
3.2. Analiz Öncesi Örnek Alımı ve Transport	19

3.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler Hakkında Detaylı Bilgiler	19
3.3.1. Spektrofotometrik Enzim Ölçümü	19
3.3.2. Florometrik Enzim Ölçümü	21
3.4. İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR	23
4.1. BTD Enziminin Optimum pH Değeri ve Stabilitesi	23
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	41
7. KAYNAKLAR	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACC	Asetil-CoA karboksilaz
ANOVA	Varyans Analizi (ANalysis Of VAriance)
6-AQ	6-aminokinolin
B6-AQ	biotinil-6-aminokinolin
BC	Biyotinkarboksilaz
BCCP	Biyotin-karboksil taşıyıcı protein
B-PABA	biotinil-p-aminobenzoik asit
BTD	Biyotinidaz
CT	Karboksiltransferaz
14C-biyositin	14 karbon atomu bağlı biyositin
14C-B-PABA	14 karbon atomuna biyotinil bağlı para amino benzoik asit
DTT	Dithioerythritol
HCS	Holokarboksilaz sentaz
3-HIVA	3-hidroksiizovalerik asit
HPA	3-Hidroksipropiyonik asit
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografi
IVG	İzovalerilglisin
MCA	Metil sitrik asit
MCC	3-metilcrotonil-CoA karboksilaz
MCD	Multipl Karboksilaz Eksikliği
3-MCG3-	metilkrotonilglisin

NaNO ₂	Sodyum nitrit
OR	Otozomal Resesif
PABA	Para aminobenzoik asit
PCC	Propiyonil-CoAkarboksilaz
PC	Piruvatkarboksilaz
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
TPN	Total parenteralnutrisyon
TCA	Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Biotin döngüsü.	7
Şekil 2.2. Biotininkoenzim olarak rol aldığı piruvatınokzaloasetata dönüşüm tepkimesi.	8
Şekil 2.3. Biotin bağımlı karboksilazların biyokimyasal aktivitesi ve substratları.	10
Şekil 2.4. Biotin bağımlı karboksilazların görevleri.	11
Şekil 4.1. Serum BTD aktivitesinin pH bağımlı değişimi.	23
Şekil 4.2.Oda sıcaklığında saklanan serumdaki BTD aktivitesinde zamanla meydana gelen değişimin grafiği.	24
Şekil 4.3.4°C’de saklanan serumdaki BTD aktivitesinde(a) ve aktivite yüzdesinde (b) zamanla meydana gelen değişimin grafiği	25
Şekil 4.4. -20°C (a) ve -80°C’de (b) saklanan serumdaki BTD aktivitesinde zamanla meydana gelen azalma.	26
Şekil 4.5. Spektrofotometrik yöntem ölçümlerinde kullanılan Standart eğri grafiği.	27
Şekil 4.6.Optimizasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik yöntem ölçüm sonuçları	28
Şekil 4.7.Optimizasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik yöntem ölçüm sonuçlarının ROC eğrisi ile değerlendirilmesi.	30
Şekil 4.8. Florometrik yöntemde plak (a) ve küvet (b) ile yapılan ölçümlerde kullanılan standart eğri grafiği.	31
Şekil 4.9.Spektrofotometrik yöntem ile florometrik yöntem (mikroplak ve küvet ölçümleri) sonuçlarına ait ROC eğrisi.	32
Şekil 4.10. Yöntem karşılaştırması için çalışmaya dahil edilen hasta grubunun klinik tanılarına göre dağılımyüzdeleri.	34

TABLolar

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerin özellikleri	17
Tablo 2.2. Florometrik ve spektrofotometrik yöntemlerin referans aralıkları	18
Tablo 3.1. Spektrofotometrik metodla serum biyotinidaz aktivitesi ölçümü: normal sağlıklı serumdan elde edilen beklenen absorbans değerleri	20
Tablo 4.1. Optimizasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik yöntem ölçüm sonuçları arasındaki korelasyonun tablosu.	28
Tablo 4.2. Optimizasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik yöntem ölçüm sonuçlarının ROC eğrisi altında kalan alan (AUROC) değerleri	30
Tablo 4.3. Florometrik yöntem (Mikroplak/küvet ile yapılan ölçümler) ve spektrofotometrik yöntemlerde ROC Eğrisi altında kalan alanlar.	32
Tablo 4.4. Yaşa göre hasta dağılımı yüzdeleri.	34
Tablo 4.5. Florometrik yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü	36
Tablo 4.6. Spektrofotometrik yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü	36
Tablo 4.7. Florometrik ve spektrofotometrik yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarının karşılaştırılması.	37

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Biotinidaz (EC 3.5.1.12) Enzim Eksikliği

İnsan biotinidaz geni (OMIM609019), 1994 yılında tanımlanmıştır (Cole ve ark., 1994a; b). BTD, 543 aa'ten oluşan, tek gen (BTD geni) tarafından kodlanan ve kromozomun 3p25 bölgesinde yer alan monomerik bir enzimdir (Cole ve ark., 1994a; b). BTD geni en az 23 kb genomik DNA'dan oluşan, 4 ekson ve 3 introna sahiptir (Knight ve ark., 1998). BTD geninde hastalığa yol açan 100'ün üzerinde mutasyon tanımlanmıştır (Hymes ve ark., 2001).

Vücutta "biotin döngüsü" adı verilen bir tepkime zinciri içinde serbest biyotin oluşum basamağı için gerekli bir enzim olan biyotinidazın eksikliği ilk kez günümüzden 20 yıl önce Wolf ve ark. (1985) tarafından tanımlanmıştır. BTD (biotinidaz) enzim eksikliği otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalıktır ve organizmada biyotin döngüsünü bozar. Biotin döngüsünün bozulması ise metabolik asidoz, deri ve nörolojik muayene bulguları gibi klinik ve laboratuvar bulgularının değişmesine neden olur (Gulati ve ark., 2000; Rezvani ve Rosenblatt, 2003; Wolf, 2003). Hastalık genellikle tam enzim eksikliği (enzim aktivitesi, normal ortalama değerlerin %0-10'u arasında), veya kısmi enzim eksikliği (enzim aktivitesi, normalin %10-30'u arasında) şeklinde gözlenir. Sırasıyla tam enzim eksikliği ve kısmi enzim eksikliğinin görülme sıklığı 1:112,000 ve 1:129,000'dir (Wolf, 2001). Erken yaşta semptom veren çocuklarda genellikle tam enzim eksikliği saptanmıştır (Wolf ve ark., 1983a).

BTD enziminin tam eksikliği olan ve tedavi edilmeyen hastalarda genellikle, hipotoni, nöbet geçirme, ciltte kızarıklık, alopesi, gelişme geriliği konjonktivit, optik atrofi gibi görme problemleri, işitme kaybı ketolaktik asidoz ve organik asidemilerin eşlik ettiği nörolojik ve kutanöz semptomlar ortaya çıkar (Wolf, 2001). Tam enzim eksikliği eğer tedavi edilmezse, genellikle semptomlar kötüleşerek koma ve ölümle sonuçlanır. Ancak BTD enziminin tam eksikliği olduğu halde erişkin yaşlara kadar semptom vermeyen (Wolf ve ark., 1998) ya da tamamen asemptomatik kalan vakalar da saptanmıştır (Wolf ve ark., 1997; Moslinger ve ark., 2001; Wolf, 2003;). Heterozigot bireylerde ise enzim aktivitesi tam eksiklik ve normal değerler arasında olacak şekilde saptanabilir.

BTD eksikliği olan hastalarda idrarla başlıca biyositin formunda biyotin atılımı olur ve dolayısıyla vücuttan idrarla biyotin kaybı olur (Suormala ve ark., 1988). Bu hastalarda ilerleyici şekilde biyotin eksikliği gelişir ve bu durum, dolaylı olarak, tüm biyotin bağımlı karboksilazların aktivitesinde azalma ile sonuçlanarak hayatı tehdit eden ciddi hastalıklara yol açar (Baumgartner ve ark., 1985; Baumgartner ve ark., 1989). Hipotoni, havale, ataksi, gelişme geriliği, cilt kızarıklığı, alopesi bu hastalıkların tipik bulgularındandır (Baumgartner ve Suormala, 1997; Wolf, 2001). Mitokondriyal karboksilaz eksikliği, BTD eksikliğine bağlı olarak ya da Holokarboksilaz sentetaz (HCS) eksikliği sonucunda gelişebilir. Her ne sebeple olursa olsun, mitokondriyal karboksilazların eksikliği, artmış 3-hidroksiizovalerik asit, 3-metilcrotonilglisin, metilsitrat ve laktat atılımıyla seyrederek ve bu atılım, tanı koymada en önemli bulgu olan, organik asidüriye neden olur. Bununla birlikte BTD eksikliğinde, karaciğer ve böbrek gibi organlara göre beyinde biyotin eksikliği, çok daha erken ve çok daha ciddi belirtilerle kendini gösterdiği için, hastalar, henüz organik asit atılımına bağlı belirtileri göstermeden, ciddi nörolojik bulgularla gelebilirler (Baumgartner ve ark., 1989).

Tam BTD eksikliği olan hastalar genellikle 3-6 ay arasında tanı alır; ancak ciddi hastalık semptomları hayatın ilk 2-3 haftasında görülmeye başlar (Haagerup ve ark., 1997). Diğer taraftan tam enzim eksikliği olup BTD enzim aktivitesi normal değerlerin %1-3'ü kadar düşük olduğu halde gözle görülen klinik belirtileri asla oluşmayan vakalar da saptanmıştır, bu vakalarda detaylı değerlendirme ile biyotin eksikliğine bağlı hafif şikayetlerinin olduğu ortaya konmuştur (Suormala ve ark., 1990; Wolf ve ark., 1997; Möslinger ve ark., 2001).

1.2. Enzim Eksikliğinin Yaygınlığı

Dünyada BTD enzim eksikliğinin en sık görüldüğü ülkeler ve aynı zamanda akraba evliliklerinin de en sık rastlandığı ülkeler, Türkiye ve Suudi Arabistan'dır (Pomponio ve ark., 2000a; Pomponio ve ark., 2000b). Baykal ve ark. (1998)'nin yaptığı bir çalışmada Türkiye' de BTD enzim eksikliğinin görülme oranının dünya ortalamasının yaklaşık 8 katı olduğu, yeni doğanlarda 1:14800 oranında görüldüğü bildirilmiştir.

Dudak köşelerinde yara ve saç dökülmesi nedeniyle Dicle Üniversitesi Hastanesi çocuk polikliniğine başvuran 6 yaşında erkek çocuk hastanın hikayesine göre, doğumda sağlıklı olduğu, yaklaşık 7 ay anne sütü aldıktan sonra ek gıdaya geçildiğinde saçlarda dökülmenin başlamış olduğu, sekiz aylık iken ateş ile beraber nöbet geçirme hikayesi bulunduğu saptanmıştır. Mevcut klinik bulgulara dayanarak yapılan tetkikler sonucunda hastaya BTM eksikliği tanısı konup, 5-10 mg/gün biyotin tedavisi başlanmıştır. Çocukta, ilacı kullanmadığı dönemde saçlarda dökülme, ağız, burun ve göz çevresinde kızarıklık, kabuklanma olduğu ve soy geçmişinde ebeveynlerin kuzen olduğu tespit edilmiştir. Laboratuvar incelemede hemogram, karaciğer fonksiyonları, serum elektrolitleri, vitamin B12, folat ile serum çinko ve bakır düzeyleri normal sınırlarda bulunmuştur. Fenilketonüri taraması için kullanılan filtre kağıdına kan emdirilerek yapılan basit kolorimetrik tarama prosedürü ile BTM düzeyi düşük olarak saptanmış ancak üniversitede biyotin kantitatif olarak ölçümü yapılamadığından sadece tarama metodu ile BTM eksikliği tespit edilmiştir. Mevcut bulgulara dayanarak hastaya biyotin 10 mg/gün dozunda başlanmış ve 5 ay sonra kontrole çağrılan hastanın saçlarının uzayıp çoğaldığı, periorifisyal lezyonların ve yanaklarındaki açık komedon benzeri papüllerin iyileştiği gözlenmiştir. Bu vakada düzensiz ve yetersiz biyotin kullanımına bağlı hastalık bulgularının ortaya çıktığı saptanmıştır (Ayhan ve ark., 2011). Bu vaka örneği, sadece kolorimetrik kantitatif yöntemle tanı koymanın yeterli olmadığını, aynı zamanda kantitatif olarak enzim miktarını saptamanın doğru tedavi verme ve tedavi takibi için son derece önemli ve gerekli olduğunu göstermektedir.

Tam enzim eksikliği olan çocuklar, genellikle hayatın ilk yıllarında havale, ataksi, hipotoni ve gelişme geriliği gibi nörolojik semptomlar, ciltte kızarıklık ve alopesi ile başvururlar (Wolf, 1991). Optik atrofiyi de kapsayan görme problemleri erken tanı alan hastalarda seyrekdir. Gecikmiş klinik bulgu ile yakalanan hastalarda, daha çok, motor bulgular gözlenir; ekstremitelerde güçsüzlüğü, spastik parezi, görme bulanıklığı, skotom gibi göz problemleri bunlar arasında sayılabilir (Wiznitzer ve Bangert, 2003). Tam enzim eksikliği olan bazı hastalar, adolesan ya da erişkin yaşlara dek asemptomatik olabilmektedir (Wolf ve ark., 1998). Asemptomatik hastaların varlığı, yeterli rezidüel enzim aktivitesinin varlığına işaret edebilir. Bu tip hastalarda, stres ya da enfeksiyon varlığında semptomlar ortaya çıkabilir.

1.3. Enzim Eksikliğinin Tedavisi

Tam BTD enzim eksikliği olan çocuklar, yaşlarından bağımsız olarak farmakolojik biyotin dozu (5-20 mg/gün) ile tedavi edilmekte ve eksiklik etkin bir şekilde önlenmektedir. Dozu yaştan bağımsız sabit tutmak tedavinin titre edilmesini sağlar, böylece sabit verilen tedavi dozu sayesinde çocuk büyüdükçe kilogram başına sürekli azalan miktarda biyotin verilmiş olur. BTD eksikliği olan tüm hastalar, biyotin tedavisine yanıt vermişlerdir. Bununla birlikte gecikmiş tedavi, sensorinöral işitme kaybı, optik atrofi ve kalıcı ataksi gibi geri dönüşü olmayan hasarlara neden olur. Biyotin tedavisi ile çoğu semptomda iyileşme görüldüğü halde işitme kaybı, görme bozuklukları ve gelişme geriliği genellikle geri döndürülemez (Wolf ve ark., 2002). Bu nedenle yeni doğanda erken tanı ve tedavi önem taşımaktadır; erken tanı koyabilmek için de, pek çok ülkede yeni doğan BTD tarama testleri rutin olarak yapılmaktadır (Wolf, 1991). Ne yazık ki ülkemizde halen çoğu bölgede taramalar yapılmamaktadır ve bu sebeple genellikle BTD eksikliği olan çocuklara ancak semptomlar ortaya çıktıktan sonra kesin tanı konulabilmektedir.

Parsiyel BTD eksikliği, genellikle eksikliği olan hastalar semptom verdikleri için değil, rutin yeni doğan taraması sırasında yakalanırlar. Parsiyel eksikliği olanlarda %10-30 arası enzim aktivitesi bulunması nedeniyle tedavinin gerekli olup olmadığı konusunda eskiden net bir bilgi bulunmamakta idi. Bu nedenle hiçbir şikayeti bulunmayan çocukların tedavi alıp almama kararı ailelerine bırakılmıştı. Yapılan takiplerde, tedavi almaya karar veren ailelerin çocuklarının halen sağlıklı olduğu tespit edilmiştir. Tedavi almama kararı alan ailelerin çocuklarında geçirilen bir enfeksiyon sonrasında hipotoni, ciltte kızarıklık, saç dökülmesi gibi tam BTD eksikliği için tipik olan bulguların ortaya çıktığı ve biyotin tedavisi sonrası, semptomlarının kaybolduğu saptanmıştır, Bu tipte artan sayıdaki vakalara dayanarak parsiyel BTD eksikliği tesbit edilen çocuklara 1-5 mg/gün dozunda biyotin tedavisi verilmesinin uygun olduğuna karar verilmiştir (McVoy ve ark., 1990).

Sonuç olarak; BTD eksikliği çok nadir görülen bir hastalık olmasına rağmen, erken tanı konulduğunda tedavisi mümkün olan ve ömür boyu biyotin kullanılmasını gerektiren bir hastalıktır. Deri lezyonları BTD eksikliğinde uyarıcı olması nedeniyle erken tanıda önemlidir. Konvansiyonel tedavilere yanıt vermeyen periorifisyal dermatitli yenidoğanlar BTD eksikliği açısından değerlendirilmelidir. Ayrıca

hastalık, enzim eksikliğinin hafif olduğu olgularda asemptomatik olabileceğinden diğer aile bireyleri de BTD eksikliği yönünden taranmalıdır. Bu bilgiler ışığında ülkemizde BTD enzim eksikliğinin tanısını koyabilmenin önemi ortaya çıkmaktadır. Biz de bu çalışmada, BTD enziminin kantitatif miktar tayininde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Metabolizma Laboratuvarı'nda halen kullanılmakta olan spektrofotometrik yöntemin optimizasyonunu ayrıca, BTD enzim ölçümü için yeni florometrik yöntemin kurulmasını ve enzim eksikliğinin tanısını koymada spektrofotometrik yöntem ile florometrik yöntemin etkinliklerinin karşılaştırılmasını amaçlamaktayız.

GENEL BİLGİLER

2.1. Biotinidaz Enziminin Biyokimyasal Özellikleri

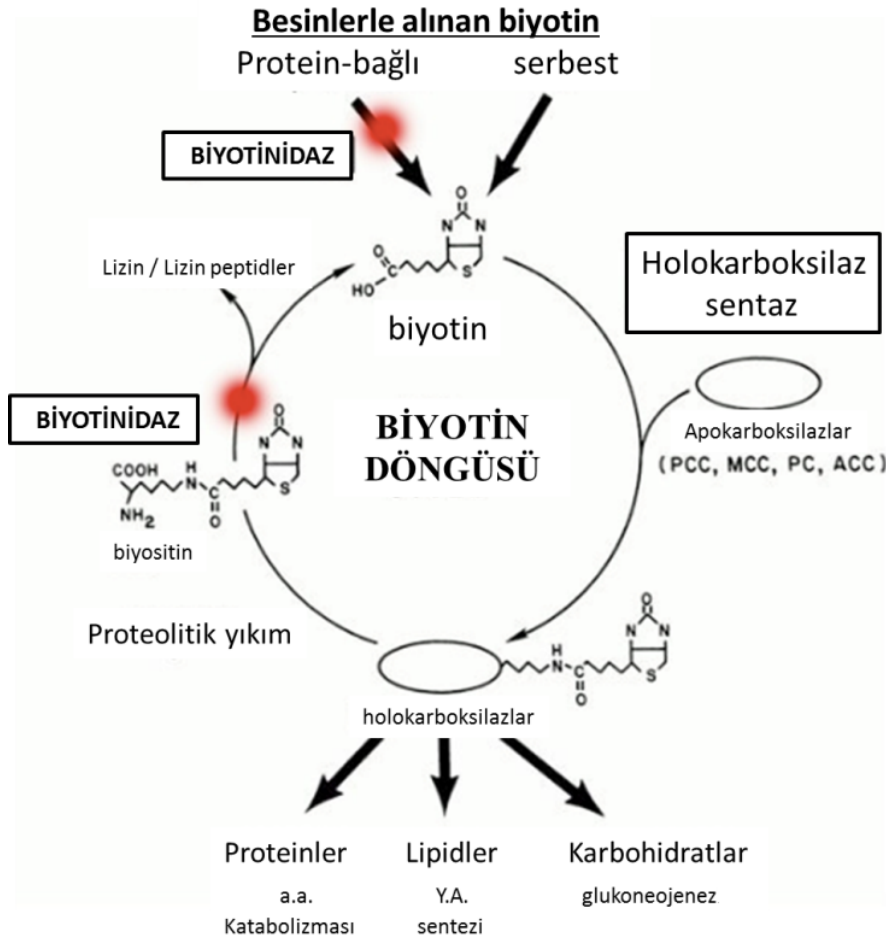
2.1.1. Biotinidazın Doku Dağılımı, Yapısı ve Görevi

Biotinidaz (EC 3.5.1.12), 70-80 kD glikoprotein yapıda olan serum, lökosit, fibroblast, karaciğer, böbrek ve adrenal bez gibi çeşitli dokularda aktivitesi saptanabilen bir enzimdir. Karaciğer, serum biotinidazının en önemli kaynağıdır (Pispa, 1965). BTD aktivitesinin mikrozom ve mitokondrideki varlığı bilinirken (Pispa, 1965) nükleustaki BTD varlığı tartışmalıdır. Stanley ve ark. (2004) tarafından nükleusta BTD enzim aktivitesinin saptanmadığı açıklanmasına rağmen, Pispa (1965) hücresele BTD aktivitesinin %26'sının nükleusta yer aldığını ileri sürer ki; immünohistokimyasal çalışmalar da bu görüşü onaylamıştır (Chew, 2007).

BTD, biyotin döngüsünde rol alan suda çözünen karboksilaz enzimlerinin kofaktörüdür (Wolf ve Feldman, 1982). BTD doğal substratı olan biyositinden ya da diyetle alınan biyotinlenmiş peptidlerden, biyotin ayrılmasını ve biyotin'in yeniden kullanılmasını sağlar. Özetle vücuttaki biyotin döngüsünü katalize eden bir enzimdir (Şekil 2.1).

2.1.2. Biotinidaz Eksikliğinin Metabolik Sonuçları

BTD aktivitesindeki eksiklik, besinlerden biyotin salınmasını ya da karboksilaz proteolizinden sonra biyotin döngüsüne giren besinlerden biyotin salınımını bloke eder. Bu durum da sekonder biyotin eksikliğine neden olarak tüm biyotin bağımlı karboksilazların [propiyonil CoA karboksilaz (PCC), β -metilkrotonil CoA karboksilaz (MCC), piruvat karboksilaz (PC), ve asetil CoA karboksilaz (ACC)] aktivitesinde kayba neden olur (Wolf ve Feldman, 1982). Bunun sonucu olarak glukoneojenez, aminoasit katabolizması ve yağ asit sentezi etkilenir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Biyotin döngüsü.

1. *Pirüvat karboksilaz*, glukoz katabolizmasında yer alan enzimdir. Sitrik asit siklusunda, pirüvatın okzaloasetata dönüşümünü katalize eder. Bu enzimin aktivitesinin azalması, laktik asit ve alanin birikimine neden olur (Şekil 2.2).

2. *Propiyonil-CoA karboksilaz*, spesifik dallı zincirli aminoasitlerin ve tek zincirli yağ asitlerinin katabolizmasında rol alır. Propiyonil-CoA'nın metilmalonil-CoA'ya dönüşümünü katalize eder. Azalmış propionil-CoA karboksilaz aktivitesi, propionat, metil sitrik asit (MCA), ve 3-hidroksipropiyonik asit (HPA) birikimiyle sonuçlanır.

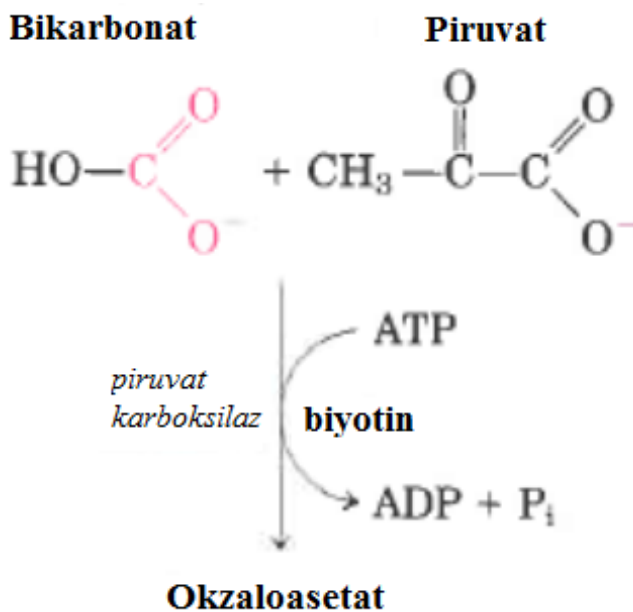
3. *3-Metilkrotonil-CoA karboksilaz*, lösin katabolizmasında görevlidir. 3-metilkrotonil-CoA'nın 3-metilglutakonil-CoA'ya dönüşümünü katalize eder. 3-metilkrotonil-CoA karboksilaz (MCC) enziminin eksikliğinde, 3-metilkrotonil-CoA alternatif metabolik yollara yönelir ve bu durum, 3-hidroksiizovalerik asit (3-

HIVA), 3-metilkrotonilglisin (3-MCG), ve izovalerilglisin (IVG) birikimiyle sonuçlanır. İnsanlarda idrarla 3-HIVA atılımı, biyotin eksikliğinin en erken ve en sensitif göstergesi olarak düşünülür (Stevenson ve ark., 1992; Mock ve ark., 2002) ancak 3-HPA ve 2- MCA atılımının böyle bir önemi yoktur (Mock ve ark., 2004).

4. Dördüncü karboksilaz, *asetil-CoA karboksilaz*, başlıca sitozolde ve daha az miktarda mitokondride yerleşiktir. Yağ asidi sentezinde asetil-CoA'nın malonil-CoA'ya dönüşümünü katalize ederek, hız kısıtlayıcı basamağı düzenler (Şekil 2.2).

2.2. Biyotin (Vitamin B7, Vitamin H) ve Fizyolojik Fonksiyonları

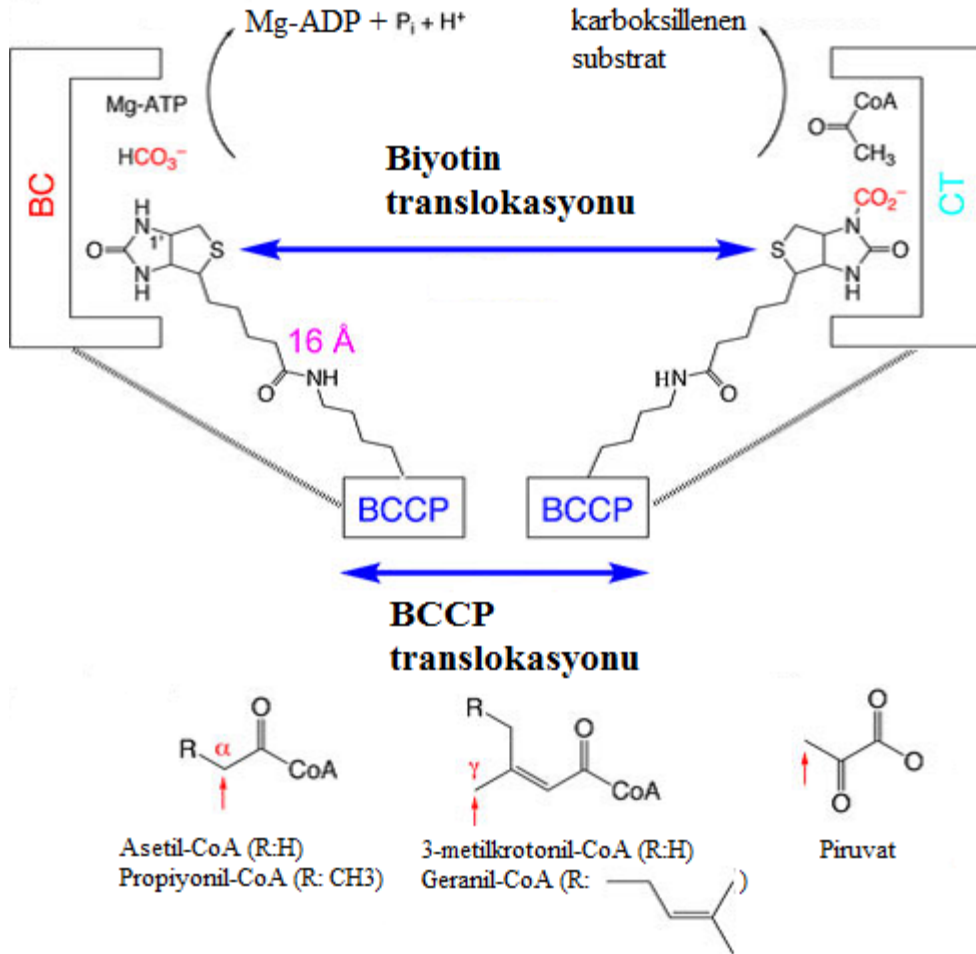
(+)-Biyotin (vitamin H ya da vitamin B7) suda çözünen, imidazol ve tetrahidrotiyofen halkalarından oluşan yapıya sahip, B vitamini üyesidir. Laktat ve piruvat metabolizmasında bikarbonat bağımlı karboksilasyon tepkimelerinde koenzim olarak rol alır (Şekil 2.2). Ayrıca lösin degradasyonunda, propiyonat metabolizmasında da görevlidir.



Şekil 2.2. Biyotin koenzim olarak rol aldığı piruvatın okzaloasetata dönüşüm tepkimesi.

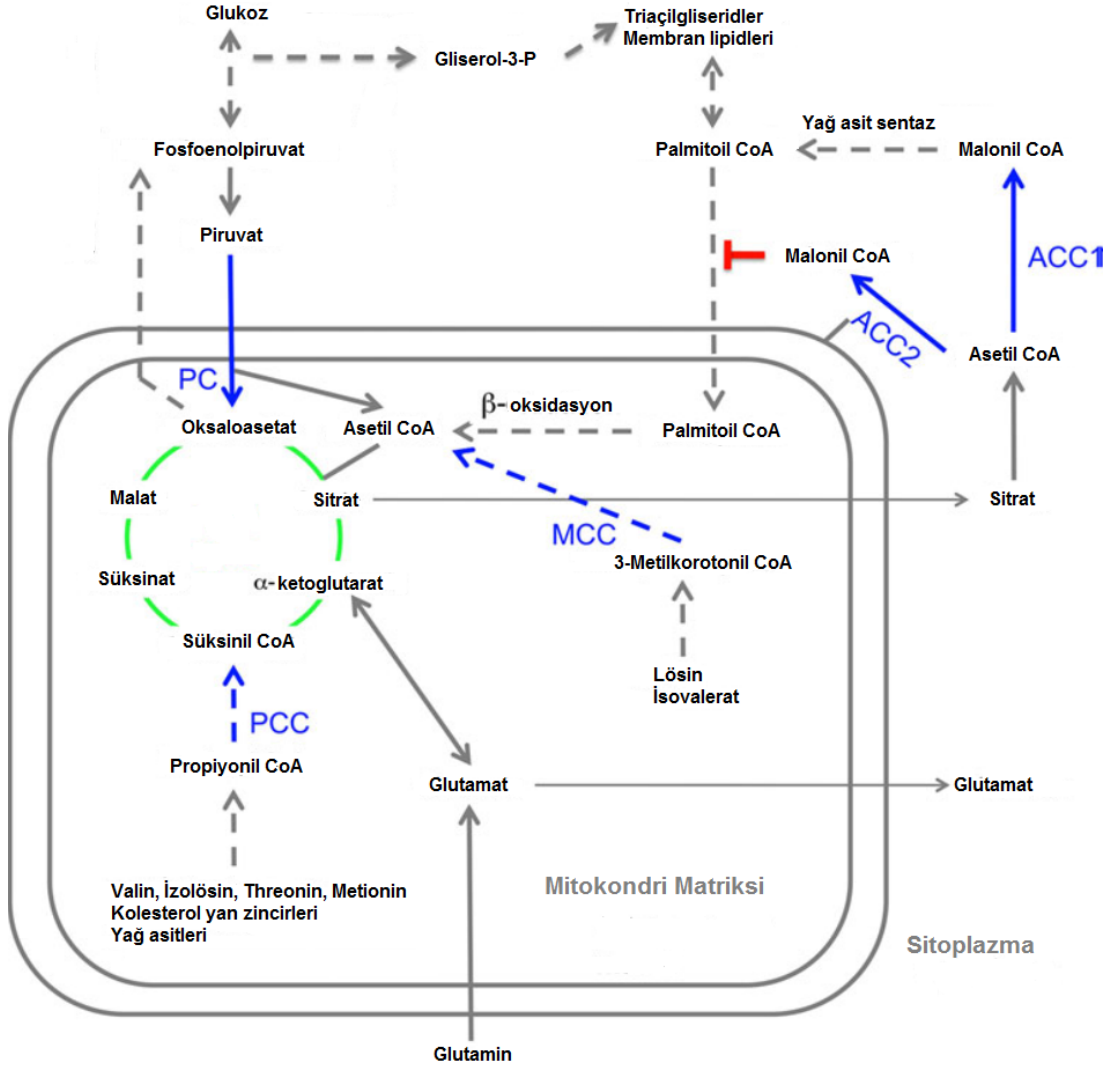
Biyotin bağımlı karboksilazlar iki farklı enzimatik aktiviteye sahiptir ve tepkimelerini iki basamakta katalize ederler. İlk tepkimede biyotin karboksilaz (BC) komponenti biyotin kofaktörünün N1'atomunun Mg⁺² ATP-bağımlı karboksilasyonunu katalizler. Bu tepkimede biyotin, CO₂ donörü olarak bikarbonatı

kullanarak, ATP hidrolizi eşliğinde, biyotin karboksilazın aktif bölgesinde karboksillenir (Şekil 2.3). Biyotin, biyotin karboksil taşıyıcı proteinin (BCCP) lizin yan zincirine, amid bağı ile kovalen olarak bağlanmıştır. Ardından ikinci tepkimede karboksiltransferaz (CT), karboksibiyotinden karboksil grup alıcısı olan substratlara CO₂ transferini katalize eder. Bu substratların çoğu, organik asitlerin koenzim A (CoA) esterleridir ve karboksilasyon bölgesi ise, doymuş asitlerin (asetil CoA, Propiyonil CoA) α karbonlarında ya da α - β doymamış asitlerin (3-metilkrotonil CoA, geranil-CoA) γ karbonlarıdır (Şekil 2.3). Ek olarak piruvat gibi küçük moleküller direk substrat olarak davranırlar. Biyotin bağımlı karboksilazların katalizi sırasında, biyotin BC ve CT'nin aktif bölgelerinde bulunmak zorundadır. Biyotinin translokasyonunun, sallanan kol modeliyle gerçekleştiği kabul edilir. Biyotin ve BCCP bağlantısı sekiz metilen grubuna ve on hareketli tek bağı sahiptir (Şekil 2.3). Sallanan kol modeli aktif bölgesine doğru yer değiştirirken buradaki CO₂ grubu alıcı substrata transfer edilir. Hareketli kol modeline göre; biyotin-karboksil taşıyıcı protein (BCCP) bölgesi sabit kalırken, biyotin, BC ve CT aktif bölgeleri arasında yer değiştirir. Ancak BC ve CT aktif bölgeleri arasındaki mesafeye biyotinin ulaşabilmesi için hareketli kol modeli yeterli değildir. "Hareketli bölge modeli" denen kataliz sırasında BCCP bölgesinin de yer değiştirdiği kabul edilir (Şekil 2.3) (Tong, 2013; Perham, 2000).



Şekil 2.3. Biotin bağımlı karboksilazların biyokimyasal aktivitesi ve substratları. (Tong, 2013).

Biyotin, insanda protein, karbonhidrat ve yağ metabolizmasında merkezi rol oynayan dört karboksilaz enziminin [mitokondrial enzimlerden propiyonil-CoA karboksilaz (E.C. 6.4.1.3), 3-metilkrotonil-CoA karboksilaz (E.C. 6.4.1.4) ve piruvat karboksilaz (E.C. 6.4.1.1) ile sitozolik asetil-CoA karboksilaz (E.C. 6.4.1.2)] prostetik grubu olarak görev yapar ve böylece glukoneojenez, yağ asit sentezi ve dallı zincirli aminoasitlerin katabolizmasında önemli rol oynar (Şekil 2.4) (Baumgartner ve Suormala, 1997; Wolf, 2001).



Şekil 2.4. Biyotin bağımlı karboksilazların görevleri (Tong, 2013).

Biyotin, HCS enzimi tarafından karboksilazların (PCC, MCC, PC, ACC) lizin rezidülerine kovalent olarak bağlanmıştır. Karboksilazlar proteolitik olarak yıkıldığı zaman biyotin, biyositin ya da biyotinlenmiş peptidler olarak salınır. Bu molekül parçaları, BTD enziminin substratlarıdır ve BTD bu yapılardan amid bağlarını uzaklaştırarak serbest biyotin ve lizin ya da lizinlenmiş peptidlerin açığa çıkmasını sağlar, böylece biyotin döngüsü devam eder. Endojen enzimlerin doğal döngüleri sırasındaki proteolitik yıkımları sonrasında, ya da besinlerin sindirimi sırasında, biyotin bu lizin rezidülerine biyositin (biotinil-ε-lizin) ya da kısa biyotinil-peptidler oluşturacak şekilde bağlı kalır. BTD ise vücutta bu bağları yıkararak biyotini serbestleştirir ve biyotini vücudun kullanabilmesi için hazır hale getiren tek

enzimdir (Bkz Şekil 2.1) (Thoma ve Peterson, 1954; Pispas, 1965; Heard ve ark., 1984).

Biyotin eksikliği ilk olarak uzun süre çiğ yumurta beyazı tüketenlerde ve biyotin desteği olmadan total parenteral nutrisyon (TPN) tedavisi alanlarda tanımlanmıştır. BTD eksikliğinin karakteristik bulguları dermatit, konjonktivit, alopesi, santral sinir sistemi anormallikleridir. Yetişkin bir bireyin, yaklaşık olarak günlük 0,03–0,1 mg biyotine ihtiyacı vardır.

Yapılan araştırmalar sonucunda biyotin eksikliğinin protein malnütrisyonu ile de bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür (Velazquez ve ark., 1989; Velazquez, 1997) ve hamilelerde marjinal biyotin eksikliğinin teratojenik olabileceği yönünde çalışmalar mevcuttur (Zempleni ve Mock, 2000). Yapılan çalışmalarla biyotin ne kadar önemli ve gerekli bir besin kaynağı olduğu ortaya konmakla birlikte, biyotin hücredeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır.

Biyotin, karboksilasyon tepkimelerinde karboksil grubu taşıyıcısıdır (Wolf, 2001). Karboksilazların arasında 4 karboksilaz enziminin her birine bağlı gelişen genetik hastalıklar tanımlanmıştır (Wolf, 2001). MCD'de, biyotinyolasyondaki patolojiye bağlı, tüm karboksilaz aktiviteleri birlikte etkilenmiştir. Buna yol açan iki belirgin genetik sebep ise HCS'daki ya da BTD'daki mutasyondur. HCS eksikliğinde, apokarboksilazlara biyotin transferi bozulmuştur. BTD eksikliğinde ise, karboksilazların proteoliz ürünü olan biyositinden (biyotinillizinden) biyotin serbestleşemediği için biyotin, biyotin siklusuna tekrar giremez ve kullanılamaz. Yenidoğanlarda HCS eksikliği hayati tehlike yaratacak derecede şiddetli iken BTD eksikliği göreceli olarak daha hafif seyreder (Wolf, 2001). Her iki hastalıkta, farmakolojik biyotin takviyesi ile tedavi edilebilir. HCS eksikliği olan pek çok hastada biyotin affinitesi azalmıştır. HCS'ın biyotin bağlayan bölgesinde mutasyonların varlığı gösterilmiştir (Burri ve ark., 1981; Burri ve ark., 1985). Ayrıca, HCS eksikliği olan hastalarda, önemli derecede azalmış biyotinillenmiş histon varlığı saptanmıştır. Bu da biyotin hücresel homeostazisde ve gelişmede henüz tam olarak açıklanmasa da çok önemli role sahip olabileceğini göstermektedir (Gravel ve Narang, 2005).

2.3. Metodun Kalite Kontrolü ve Biotinidaz Miktar Tayini

BTD eksikliğinin tanısında en yaygın kullanılan metod, biyositin ve biyotin-4-amidobenzoik asidin substrat olarak kullanıldığı enzimatik yöntemdir (Koivusalo ve Pispala; 1963; Wolf ve ark., 1983; Heard ve ark., 1984). Biotinidaz eksternal kalite kontrol programlarına henüz dahil edilmemiştir ve ticari kontrol örnekleri bulunmamaktadır. Kalite kontrolü için yapılabilen tek şey her ölçümde, normal biyotinidaz aktivitesine sahip olduğu bilinen bir serum örneğini kullanmaktır. Bu kontrol serumu, -80°C'de 2 ay süreyle küçük hacimlerde saklanabilir ve her ölçüm için sadece bir kez çözülür. Biotinidazın miktar tayininin doğru yapılması için PABA standartlarının kullanılması önemlidir. Her ölçümde taze hazırlanan veya -20°C'de saklanan stok çözeltiden dilüsyon yapılarak hazırlanan PABA standartlarının ölçümü ve standart eğrinin çizilmesi gereklidir.

2.4. Referans Aralığı

Klinikte enzim testi ile ölçümler yapılmadan önce, laboratuvarlar ortalama BTD aktivitesini normal bireylerde, tam veya kısmi BTD enzim eksikliği ile heterozigot BTD eksikliği olan bireylerde saptamalıdır. Bu sonuçlar, her grup için o laboratuvarın referans aralığı olarak kullanılmalıdır. Laboratuvarlar, yeni verileri de ekleyerek referans aralıklarını periyodik olarak değerlendirmeli ve güncellemelidir (Heard ve ark., 1986).

2.5. Test Sonuçlarının Yorumu:

BTD aktivitesinin <10 olması, *tam enzim eksikliği* olarak tanımlanır. Normal aktivitenin %10 ve 30'u arasındaki BTD aktivitesi *kısmi enzim eksikliği* olarak tanımlanır. Her laboratuvar, ortalama normal enzim aktivitesi olarak, kendi referans aralıklarının yazılı olduğu kılavuzları hazırlamalıdır. Bu normal aktivite değerleri ile çocukların aktivitelerini karşılaştırarak sonuçları yorumlamalıdır. Ancak, prematurite ya da karaciğer yetmezliğinin de BTD aktivitesinde azalmaya neden olabileceği bilinmelidir. (Grier ve ark., 1990; Pabuccuoglu ve ark., 2002) Termde yenidoğan BTD aktivitesi, genellikle hayatın ilk gün ve haftalarında normal ortalamanın %50 - 70'i arasında ölçülür.

2.6. **BTD Eksikliğinin Derecesi Tedaviye Olan İhtiyacı Değiştirir mi?**

Tam enzim eksikliği olan çocuklarda enzim aktivitesi normal değere göre %1'in altında ve %1'in üstünde olanların ayırıcı tanısının konması önerilmektedir (Wolf ve ark., 1983). Enzim aktivitesi %1'den fazla olan çocukların tedavi edilmesi gerekmeyebilir. Enzim aktivitesi %1'in altında olan çocukların, birkaç aya ya da birkaç yaşına kadar semptom göstermedikleri, normal ortalamaya göre %1-%10 arası aktiviteye sahip çocukların ise hayatın ilk birkaç ayında semptom gösterdikleri tespit edilmiştir. Toplam enzim aktivite kaybı daha fazla olan çocukların semptomatik olma riskinin yüksek olması beklendiği halde, %1-%10 arası aktiviteye sahip çocuklar da aynı oranda semptomatik hale gelme riskine sahiptirler. Bu nedenle tam enzim eksikliğine sahip tüm çocukların biyotin ile tedavi edilmesi önerilmektedir (Wolf, 2002).

2.7. **Enzim Eksikliğinin Tanısında Kullanılan Yöntemler:**

BTD'nin doğal substratı biyositindir, ancak BTD enzimi, biyotin ve farklı yapılar arasındaki amid bağlarını da kesme özelliğindedir. Bu özelliğinden yola çıkarak BTD aktivitesini ölçmek amacıyla yapay substratlar geliştirilmiştir. BTD aktivitesini ölçmede en sık tercih edilen metod Knappe ve ark. (1963) tarafından tanımlanan kolorimetrik ölçüm yöntemidir; bu yöntemde substrat olarak biyotinitil-p-aminobenzoik asit (B-PABA) kullanılır (Knappe, 1963; Wolf ve ark., 1983).

2.7.1. **Kolorimetrik (Spektrofotometrik) Ölçüm Yöntemi**

Serum ya da plazma BTD aktivitesi, yapay substrat olan B-PABA kullanılarak kolorimetrik yöntemle saptanabilir. BTD, B-PABA'nın amid bağını yıkarak serbest biyotin ve PABA oluşmasını sağlar. PABA, mor azo boyasına döndürülür ve spektrofotometrik olarak ölçülerek miktar tayini yapılır. BTD aktivitesi yok ise renk oluşumu gözlenmez. Böylece tam eksikliği olanlarda, BTD aktivitesinin hızlı bir şekilde saptanmasını sağlar. Kolorimetrik metodun dezavantajı ise, sensitivitesinin düşük olmasıdır. Bu yöntemde en düşük saptanabilir BTD aktivitesi, normal plazma BTD aktivitesi ortalamasının %3'ü kadardır (Suormala ve ark., 1990). %3'ün altında BTD aktivitesine sahip hastaların, tam enzim eksikliği olan hastalardan ayırt edilebilmesi için, ayrıca dokular, fibroblastlar, lökositler ve

vücut sıvılarındaki BTB aktivitesinin saptanabilmesi için daha hassas metodlara ihtiyaç vardır.

2.7.2. Florometrik Ölçüm Yöntemi

Kinetik çalışmalar için geliştirilmiş, B-6AQ'in (biyotinin-6-aminokinolin)'in substrat olarak kullanıldığı methoddur (Wastell ve ark., 1984). Hem florometrik, hem kolorimetrik metod, filtre kağıdına emdirilmiş kan damlasından çalışmaya uygun olacak şekilde adapte edilmiştir ve yenidoğan taramalarında kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Heard ve ark., 1984; Broda ve ark., 2001).

2.7.3. Radyoizotop Ölçüm Yöntemi

Hassas 14C-biyositin (Thuy ve ark., 1985), 14C-B-PABA (Wolf ve Secor McVoy, 1983) ya da radyoizotoplanmış biyotininamid analoglarının (Livaniou ve ark., 1987) kullanıldığı radyoimmün yöntemler geliştirilmiştir ancak hiçbir substrat ticari olarak satılmamaktadır.

2.7.4. Fibroblastlarda Ölçüm Yöntemi

Fibroblastlardaki apokarboksilazların serbestleşen biyotin tarafından aktifleşmesine dayalı serbest biyotin miktarını ölçen metodlar (Weiner ve ark., 1985) ya da biyotin bağımlı bakteri ya da protozoaların üremesine göre enzim aktivitesinin hesaplandığı yöntemler de tanımlanmıştır (Wright ve ark., 1954; Baker ve ark., 1989; Kumasaka ve ark., 2001).

2.7.5. HPLC

Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) ile biyositin substratından serbestleşen biyotin ayrılmış ve radyoizotopik avidin-bağlayan metod ile toplanan fraksiyonlardan miktar tayini yapılmıştır ve bu metod hassas ve tam enzim eksikliğini, %0,5 enzim aktivitesinin varlığından ayıracak derecede hassas ve tanı koymada güvenilirdir ancak çok zaman alıcı olduğu için rutin kullanıma uygun bulunmamıştır (Suormala ve ark., 1990).

İnsan serum BTB, karaciğer kaynaklıdır (Grier ve ark., 1989) ve en az 9 farklı izoformu saptanmıştır (Hart ve ark., 1991). Asidik pH'da maksimum hidrolaz

aktivitesi göstermesinin yanında, fizyolojik pH'da histon gibi nükleofilik yapıların biyotinlenmesinde görev alır (Hymes ve ark., 1995).

BTD eksikliği olan hastalarda, hem hidrolaz hem de transferaz aktivitesi etkilenir (Hymes ve ark., 1995). Tüm doku ve vücut sıvılarında BTD aktivitesi gösterilmiş olmakla birlikte (Pispa, 1965; Cole ve ark., 1994a) en yüksek aktivite böbrek, karaciğer, adrenal bez ve plazmada saptanmıştır.

BTD enzim eksikliğinin tanısında en yaygın kullanılan yöntem substrat olarak biotin-4-amidobenzoik asitin kullanıldığı kolorimetrik ölçüm yöntemidir (Koivusalo ve Pispa, 1963; Heard ve ark., 1984). Bu test yenidoğan BTD enzim eksikliği taramalarında da kullanılan temel yöntemdir (Heard ve ark., 1984). Ancak, BTD aktivitesi, B6-AQ'in substrat olarak kullanıldığı florometrik ölçüm yöntemi ile daha hassas ölçülebilir (Wastell ve ark., 1984) (Tablo 2.1). Florometrik yöntemde kullanılan substrat, kolorimetrik yöntemde kullanılanlara göre daha pahalıdır ancak yenidoğan taramalarına uygundur, bu nedenle florometrik yöntem, kurutma kağıdındaki kan damla örneklerini test etmek üzere modifiye edilmiştir (Broda ve ark., 2001). Her iki yöntemin özellikleri Tablo 2.1'de ve referans aralıkları Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerin özellikleri

	Spektrofotometrik Yöntem	Florometrik Yöntem
Örnek tipi	Serum	Plazma
Ölçüm prensibi	Enzimatik	Enzimatik
Sonuçların hesaplanması	Kalibrasyon eğrisi ile	Kalibrasyon eğrisi ile
Test prensibi	2 basamaklı enzimatik tepkime: Örnekteki BTD, “B-PABA” substratından “PABA” oluşturur. PABA diazotize edilip naftol ile bağlanarak, mor renkli kromofor oluşturur.	Tek basamaklı enzimatik tepkime: Örnekteki BTD, “B6-AQ” substratını kullanarak floresan özellikte “6-AQ” ürününü oluşturur.
Ölçüm tekniği	Kolorimetrik	Florometrik
Tepkime inkübasyon süresi	30´	120´
Ölçümde kullanılan cihaz	Spektrofotometre (546 nm)	Florometre (Eksitasyon 350, emisyon 550 nm dalga boyunda)
Referans değerler	Normal: 4,4-12 nmol/dk/mL Heterozigot: 2,2-5,2 nmol/dk/mL Parsiyel: 0,7-2,1 nmol/dk/mL Tam Eksiklik: <0,7 nmol/dk/mL	Normal: 62–143 nkat/L (3,7-8,6 U/L) (3,7-8,6 µmol/dk/L) (3,7-8,6 nmol/dk/mL) *(1U: 16,7 nkat)
Gerekli olan ek malzeme	-	Siyah küvet, filtre kağıdı ölçümleri için siyah mikroplate, mikroplate okuyucu, mikroplate çalkalayıcı

Tablo 2.2. Florometrik ve spektrofotometrik yöntemlerin referans aralıkları

%BTD aktivitelerine göre BTD eksikliği grupları	BTD AKTİVİTESİ ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ	
	FLOROMETRİK*	SPEKTROFOTOMETRİK **
Normal (>%30)	3,63 U/L (3,53-3,79)	7,1 U/L (4,4-12)
Kısmi eksiklik (%10-%30)	0,36-1,09 U/L	0,7-2,1 U/L
Tam eksiklik (<%10)	<0,36 U/L	<0,7 U/L

*Wastell ve ark. (1984)

**Wolf ve ark. (1983)

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışma Populasyonu

Bu çalışmaya Şubat 2013 tarihinden itibaren 1 yıllık süre içinde, Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi, Metabolizma Ünitesine başvuran, BTM enzimi eksikliği şüphesi ile kantitatif BTM ölçümü istenen yenidoğan, çocuklar ve anne-babaları olmak üzere toplam 52 kişi dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen biyotinidaz eksikliği şüphesi olan hastaların yaşları 6 gün-9 yaş arasında, anne babaların yaşları ise 25-40 yaş arasında değişmekteydi.

Çalışmanın etik kurul izni, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 23.01.2013 tarih ve LUT 12/178-12 numara ile alındı. Etik kurul onayı alındıktan sonra araştırmalara başlandı.

3.2. Analiz Öncesi Örnek Alımı ve Transport

BTM aktivitesinin florometrik yöntemle ölçümü için 1 mL heparinli kandan elde edilen 3X75 µL plazma kullanıldı. Spektrofotometrik ölçüm için ise 2 mL kandan elde edilen 3X100 µL serum örneği kullanıldı. Hastanın biyotin tedavisi altında olması BTM ölçüm sonuçlarını etkilememektedir (Wolf ve ark., 1983). Plazma ve serum BTM aktivitesinin azalmaması için heparinli tüpe veya serum seperatörlü tüpe alınan kan, 4-6 saat içinde laboratuvara ulaştırıldı ve ayrılan plazma veya serum hemen çalışıldı veya -80°C'de saklandı.

3.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler Hakkında Detaylı Bilgiler

3.3.1. Spektrofotometrik Enzim Ölçümü

BTM enzim aktivitesi, spektrofotometrik olarak Wolf ve ark. (1990)'nın metodu referans alınarak ölçüldü. Bu metodda BTM, N-biotinil-p-aminobenzoat substratının hidrolizi ölçülerek değerlendirilir (Wolf ve ark., 1990).

1,9 ml tepkime karışımı [200 µmol, pH 6,0 Potasyum-fosfat tamponu, 20 µmol EDTA, 0,5 mg serum albumini, 0,3 µmol biyotinidaz substratı (N-biotinyl-p-aminobenzoate)], üzerine 100 µL serum eklendi. Toplam hacim 2 mL olacak şekilde 1,9 mL tepkime karışımı, pH 6,0 100 mM Potasyum-fosfat tamponu, 10,53 mM

EDTA, 0,5 mg serum albumini, 0,157 mM biyotininidaz substratı (N-biotinyl-p-aminobenzoate) içerecek şekilde hazırlandı (Tablo 3.1). 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. Ardından 100 µL trikloroasetik asit (TCA) ile tepkime durduruldu. Tepkime sırasında hasta serumundaki LTD enziminin aktivitesi sonucunda açığa çıkan p-aminobenzoik asit (PABA) 100 µL sodyum nitrit kullanılarak diazotize edildi ve nitritin fazlası da 100 µL amonyum sülfat eklenerek uzaklaştırıldı (Tablo 3.1). Son olarak diazotize PABA 100 µL N-1-naftil-etilen-diamin dihidroklorid ile tepkimeye girerek renkli ürün oluştu. Oluşan ürün 546 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Net absorbans salınan PABA miktarı dolayısıyla örnekteki LTD aktivitesi ile orantılı olarak ölçüldü. Enzim aktivitesi serumda açığa çıkan PABA’ın nmol dak⁻¹ mL⁻¹ değeri olarak ifade edildi. Bu test yeni doğan LTD enzim eksikliği taramalarında da kullanılan temel yöntemdir (Heard ve ark., 1984).

Tablo 3.1. Spektrofotometrik Metolla Serum Biyotininidaz Aktivitesi Ölçümü: Normal Sağlıklı Serumdan Elde Edilen Beklenen Absorbans Değerleri

Tüpler	Distile su (µL)	Tampon µL (200 mM Potasyum fosfat pH 6 + 0,5 mg BSA + 21,06 mM EDTA)	PABA (µL)	B-PABA (µL)	Serum (µL)	Absorbans*
Std. Kör	1200	800	-	-		0,005
Std. 1	1100	800	100	-		0,067
Std. 2	1100	800	100	-		0,132
Std. 3	1100	800	100	-		0,336
Örnek Kör	1100	800	-	-	100	0,036
Örnek	910	800	-	190	100	0,37

* Normal serumdan ve standartlardan elde edilmesi beklenen absorbans değerleri. (λ : 546 nm)

3.3.2. Florometrik Enzim Ölçümü

BTD aktivitesi B6-AQ substratı kullanılarak semikantitatif florometrik yöntemle saptanır (Wastell ve ark., 1984).

a. Kurutma Kağıdına Emdirilen Kan Damlasında Ölçüm:

Kurutma kağıdındaki kan damlasından alınan 3 mm çapta örnek, 50 μ l tepkime karışımı [0,15 M potasyum fosfat tamponu (pH 6,5), 1,5 mM dithioerythritol (DTT) ve 0,075 mM biyotinidaz substratı (B6-AQ)] ile koyu renkteki mikro kuyucuk içinde 37°C’de, 5 saat inkübe edilir. 250 μ l etanol eklendikten sonra kuyucuk içindeki örnekler, oda sıcaklığında 1 saat daha inkübasyona bırakılır. Ardından örnekler 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir. “Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter” ile eksitasyon dalga boyu 355 nm ve emisyon dalga boyu 535 nm olacak şekilde floresans ölçümü yapılır. Eşik değeri %20 olarak alınır.

Pozitif bulunan örneklerin varlığında hastalar tekrar çağırılır. İkinci kez kurutma kağıdına damlatılmış kan ile test tekrar edilir. Aynı zamanda heparinize plazma örneği de alınarak kantitatif ölçüm yapılmak üzere saklanır.

b. Plazma Biyotinidaz Aktivitesi Ölçümü:

Plazma BTD aktivitesi B6-AQ substratı kullanılarak Wastell ve ark. (1984)’nın kullandığı florometrik metoda göre kantitatif olarak ölçüldü. Florometrik metod ile BTD ölçümü Shimatzu ve Spektromax Model florometreler kullanılarak yapıldı.

Her hastadan yaklaşık 1 mL alınan, soğuk zincir ile transfer edilmiş olan heparinize kan örneği 3000 rpm’de 5 dk. santrifüj edildi. Her hasta için 3 tüp hazırlandı. Kör ve 2 tekrarlı örnek çalışmak için 3 X 75 μ L plazma kullanıldı. Su banyosu 37°C olacak şekilde ısıtıldı. 2475 μ L tepkime karışımına [0,15 M, pH 6,5 Na-fosfat tamponu, 0,1 mM DTT ve 0,05 mM biyotinidaz substratı Biyotini-6-aminokinolin (B6-AQ)], 75 μ L plazma eklendi. Toplam 2,55 mL hacim, 37°C’de 120 dakika inkübe edildi. Kör için inkübasyon yapılmadı.

Floresans ölçümü için eksitasyon dalga boyu 350 nm ve emisyon dalga boyu 550 nm olacak şekilde ayarlama yapıldı. Floresan unit ölçümleri nmol’e çevrildi. Her plazma örneği için kör ölçümü, tepkime karışımına 75 μ L plazma eklenir eklenmez

hemen yapıldı, 120 dk.lık inkübasyon süresi beklenmedi. Örnek ölçümünden kör ölçüm sonucu çıkarıldı.

6 AQ (6 Aminoquinolin) için farklı derişimlerde (40 μ M/ 20 μ M/ 10 μ M/ 5 μ M) standard hazırlanarak ölçüm yapıldı ve standart eğri çizildi. Örneklerdeki enzim aktivitesi, floresan unit okuma sonuçları nmol'e çevrildikten sonra, kaç nmol 6 Aminokinolin oluştuğuna göre değerlendirildi.

Deney Yapılışı Sırasında Solüsyonların Hazırlanması:

0,150 M Na-fosfat tamponu (pH 6,5):

140 mL 0,2 M Na₂HPO₄X12 H₂O ve 235 mL 0,2 M NaH₂PO₄X12 H₂O distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. -20°C'de saklandı.

75 μ M B6-AQ (BTD substrat) :

2 mg B6-AQ, 72 mL 0,150 M Na-fosfat tamponu (pH 6,5) içinde 5 saat oda sıcaklığında karıştırılarak çözüldü. Substrat, oda sıcaklığında 5 gün saklanabilir. Buzdolabına konulmamalıdır.

1,4-Ditiotreitol (DTT):

Sigma'dan temin edildi. +4°C'de saklandı.

40 μ M 6-aminoquinolin (%98) :

2,89 mg 6-AQ, 500 mL 0,150 M Na-fosfat tamponu (pH 6,5) içinde çözüldü. +4°C'de saklandı.

6-AQ standart çözelti referans alınarak oluşan ürünün birimi Floresans ünitesinden, nanomole çevrilerek kaydedildi (Wastell ve ark., 1984).

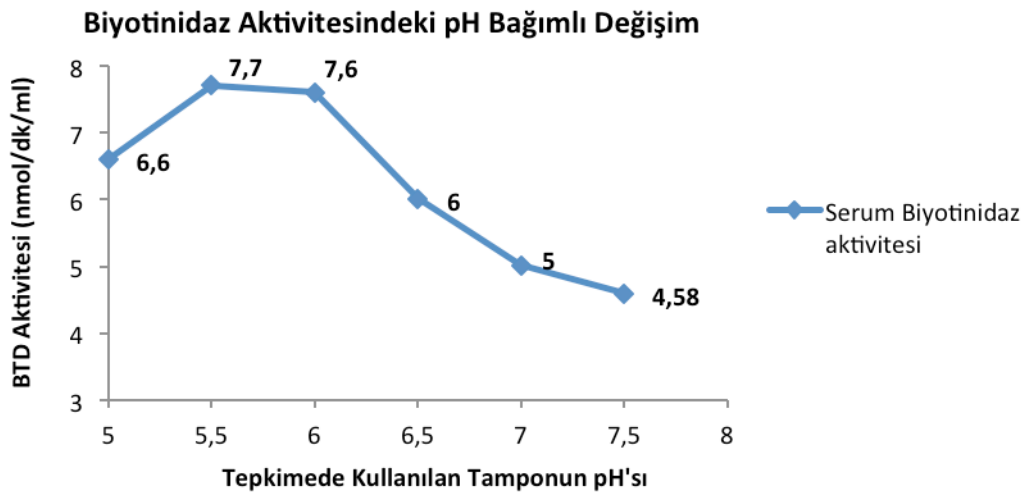
3.4. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama \pm SD olarak yazıldı. Gruplar arasındaki farklar ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. P<0,05 istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi. Metodlar arası farklılıklar, tanı koyma yeteneği, ROC (Receiver Operating Characteristic) analizi yapılarak değerlendirildi. İstatistiksel değerler % 95 güven aralığında verildi. Bu istatistikler, IBM SPSS Statistic programı 21 sürümü kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

4.1. BTD Enziminin Optimum pH Değeri ve Stabilitesi

Spektrofotometrik ölçüm yönteminin optimizasyonu amacıyla, sağlıklı bireylerden alınarak oluşturulan serum havuzu kullanılarak, pH 6-7,5 aralığında yapılan seri aktivite ölçüm deneylerine göre, literatürle de uyumlu olarak (Wolf ve ark., 1983a) serum BTD aktivitesi en yüksek pH 6 ve PH 5,5'ta (optimum pH) sırasıyla pH 6'da 7,6 nmol/dk/mL ve pH 7'de 7,7 nmol/dk/mL olarak ölçüldü. Serum enzim aktivitesinin artan pH değerlerinde sırasıyla pH 6,5'ta 6 nmol/dk/mL, pH 7'de 5 nmol/dk/mL ve pH 7,5'ta 4,58 nmol/dk/mL olarak orantılı şekilde azalırken pH 5'te de 6,6 nmol/dk/mL saptandı (Şekil 4.1). Spektrofotometrik ölçüm yöntemi ile aktivitenin en yüksek ölçüldüğü pH değeri, optimum pH olarak kabul edildi. BTD aktivitesi, pH artışıyla ters orantılı olarak azaldığı gözlemlendi.

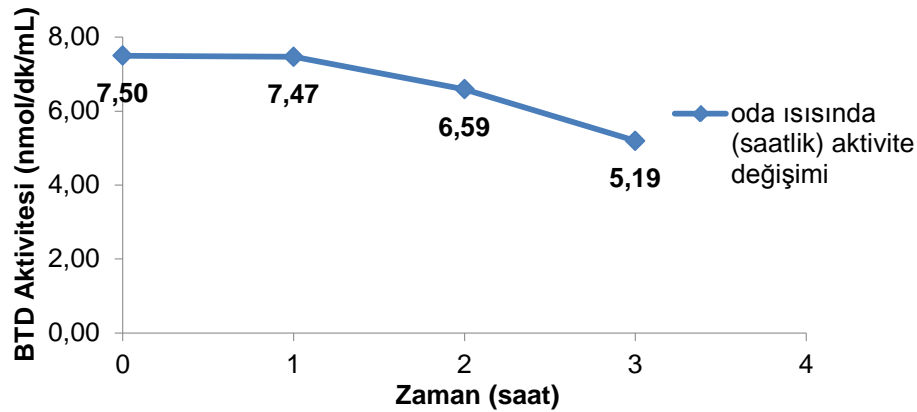


Şekil 4.1. Serum BTD aktivitesinin pH bağımlı değişimi.

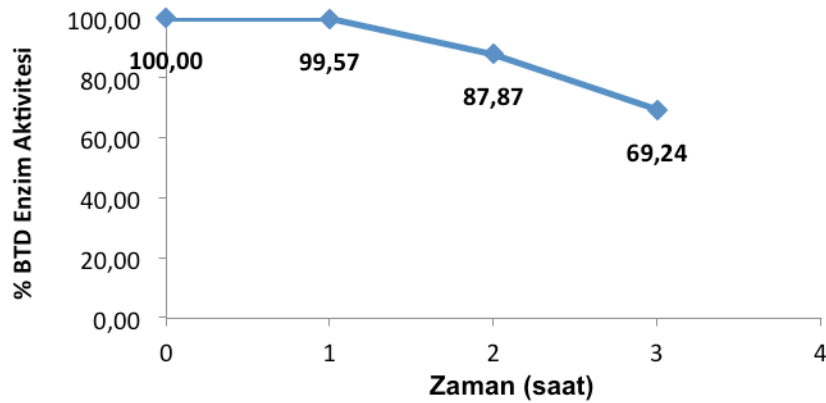
BTD enziminin stabilite deneyleri, sağlıklı bireylerden alınan kanlar ile hazırlanan serum havuzu kullanılarak yapıldı. Spektrofotometrik yöntemle 0. dakikada 7,5 nmol/dk/mL olarak ölçülen enzim aktivitesinin stabilitesi oda ısısında 1. 2. ve 3. saatte, 4°C'de 1. 2. 3. saat ve 1. 2. 3. gün ve 1. 2. 3. haftalarda, -20°C ve -80°C'lerde ise 1. 2. 3. haftalar ve 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. aylarda tekrarlanarak ölçüldü ve enzimin stabilitesi değerlendirildi. Deney sonuçlarına göre, oda ısısında bekletilen serumda, 2. saatten itibaren aktivitenin azalmaya başladığı gözlemlendi. Enzim aktivitesi

oda ısısında bekletilen serumlarda 1. 2. ve 3. saatlerde sırasıyla 7.47, 6.59 ve 5.19 nmol/dk/mL olarak ölçüldü. Diğer bir ifadeyle 0. dakikada %100 ölçülen BTM aktivitesinin, ikinci saatte %12 azalarak %87,9'a, 3. saatte ise %30,8 kayıba uğrayarak %69,24'e düştüğü saptandı (Şekil 4.2).

a) Oda Sıcaklığında Bekletilen Örneklerde BTM Aktivitesindeki Saatlik Değişim



b) Oda Sıcaklığında Biotinidaz Aktivitesindeki % Değişim

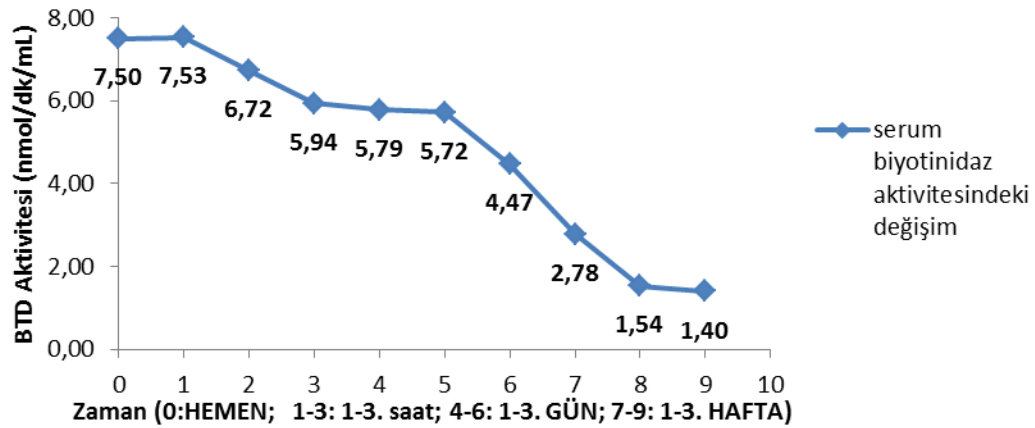


Şekil 4.2. Oda sıcaklığında saklanan serumdaki BTM aktivitesinde zamanla meydana gelen değişimin grafiği.

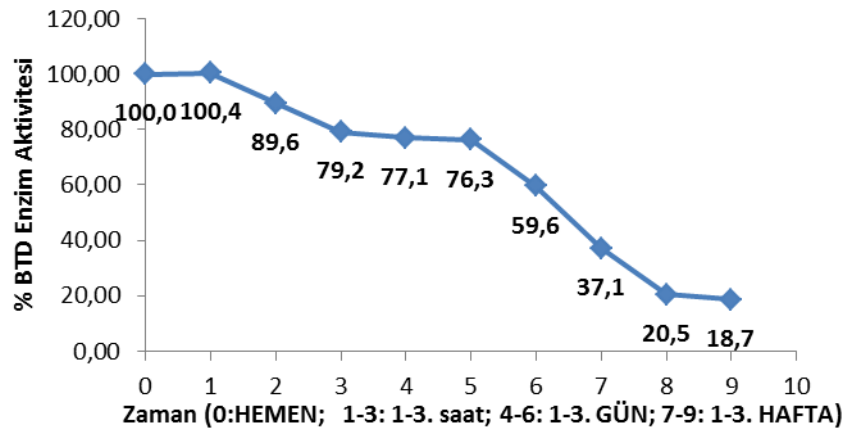
Serumlar 4°C'de saklandığında ise, 7,5 nmol/dk/mL olan BTM aktivitesi sırasıyla 1. 2. 3. saatlerde 7,53; 6,72 ve 5,94; 1. 2. 3. gün ve 1. 2. 3. haftalarda sırasıyla 5,79; 5,72; 4,47 ve 2,78; 1,54; 1,40 nmol/dk/mL olarak ölçüldü. 4°C'de saklanan serum örneğinde 2. saatten itibaren BTM aktivitesinin %10,4 oranında

azalmaya başlayarak 1. günde %22,9 azaldığı; 3. haftanın sonunda ise %81,3 azalarak 1,40 nmol/dk/mL'ye (%18,7) düştüğü kaydedildi (Şekil 4.3).

a) 4°C'de Biotinidaz Aktivitesindeki Değişim



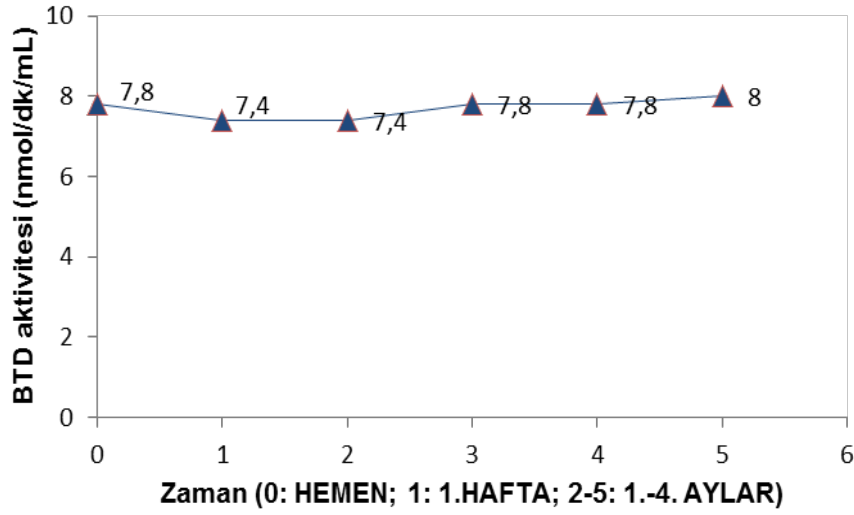
b) 4°C'de Biotinidaz Aktivitesindeki % Değişim



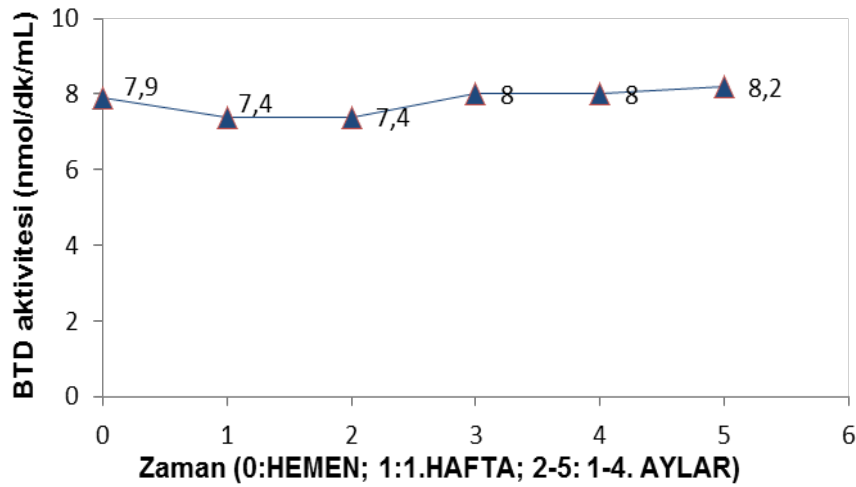
Şekil 4.3. 4°C'de saklanan serumdaki BTD aktivitesinde (a) ve aktivite yüzdesinde (b) zamanla meydana gelen değişimin grafiği.

-80°C ve -20°C'lerde beklenen serumların BTD aktivitelerinin ise 4 aylık sürede değişmediği tekrarlanan haftalık ve aylık ölçümler ile saptandı (Şekil 4.4).

a) -20°C'de biyotinidaz aktivitesi değişimi



b) -80°C'de biyotinidaz aktivitesi değişimi

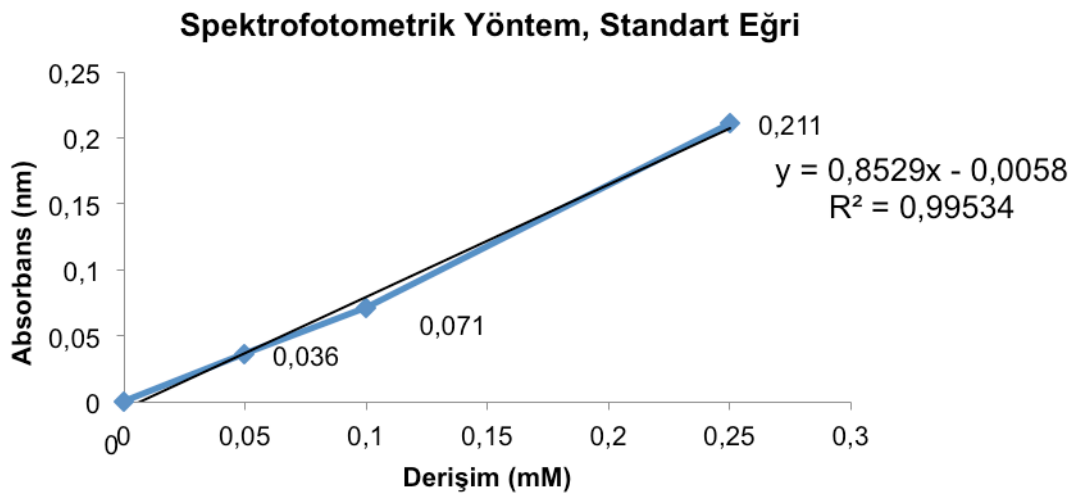


şekil 4.4. -20°C (a) ve -80°C'de (b) saklanan serumdaki BTDA aktivitesinde zamanla meydana gelen azalma.

Bulgularımız, BTDA aktivitesi tayini için ayrılan ve oda ısısında bekletilen serumların en geç 2 saat içinde, 4°C'de bekletilen serumların ise en geç 1 gün içinde çalışılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Ölçümün bu süreler içinde yapılması planlanmıyor ise, serum örneği -20°C ve -80°C'de 4 ay süreyle saklanabilir.

Tez çalışması kapsamında spektrofotometrik BTD ölçüm yöntemi, aşağıdaki koşullar değiştirilerek optimize edilmiştir:

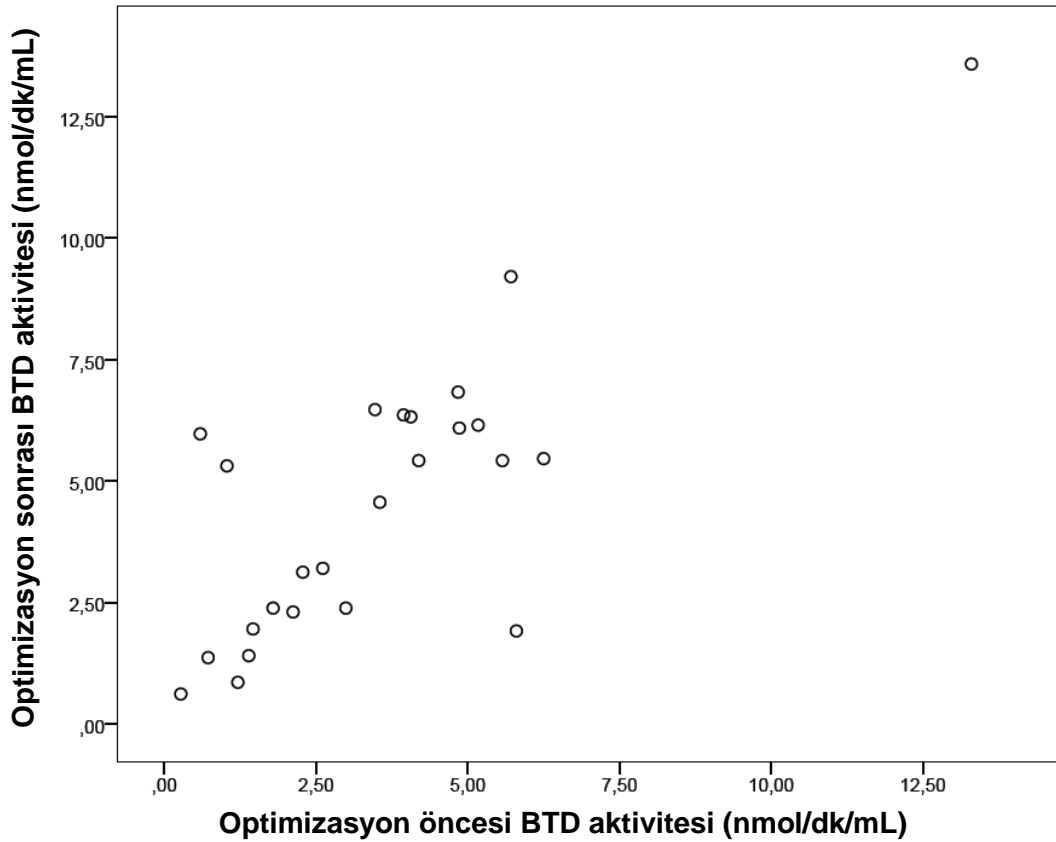
- 1) Tek standart kullanılarak hesaplanan enzim aktivitesininin, 3 standart kullanılarak hesaplanması sağlandı.
- 2) Optimum pH koşullarında çalışabilmek için düzeltici önlemler alındı. (pH-metre kalibrasyonu, istenen pH'da tampon hazırlanması için gerekli asit-baz oranlarının hesaplanması vs.)
- 3) Sodyum nitrit ve Naftil etilen diaminin günlük taze hazırlanması sağlandı.
- 4) Her örnek için stabilite koşullarına uyulması sağlandı (örnek oda ısısında 2 saatten fazla bekletilmemeli, hemen çalışılmayacaksa -20°C ya da -80°C 'de saklanmalı).
- 5) N-biotinil-PABA substratının -20°C 'de saklanması sağlandı.
- 6) 0,05 mM, 0,1 mM ve 0,25 mM derişimlerdeki PABA standartlarının absorbansları ölçülerek standart eğri çizildi ve sonuçların standart eğri üzerinden hesaplanması sağlandı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Spektrofotometrik yöntem ölçümlerinde kullanılan standart eğri grafiği.

Spektrofotometrik yöntemin optimizasyonu sonrası yapılan ölçümler ile optimizasyon öncesi çalışılan örneklerin sonuçları 25 hastada karşılaştırıldı (Şekil 4.6). Testin optimizasyon sonrası sonuçlarının, optimizasyon öncesi bulunan sonuçlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde değiştiği gözlemlendi ($p < 0,01$) (pearson korelasyon katsayısı: 0,794) (Tablo 4.1).

Spektrofotometrik Yöntemin Optimizasyonu Öncesi ve Sonrası Ölçülen BTD Aktivitelerinin Karşılaştırılması



Şekil 4.6. Optimizasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik yöntem ölçüm sonuçları

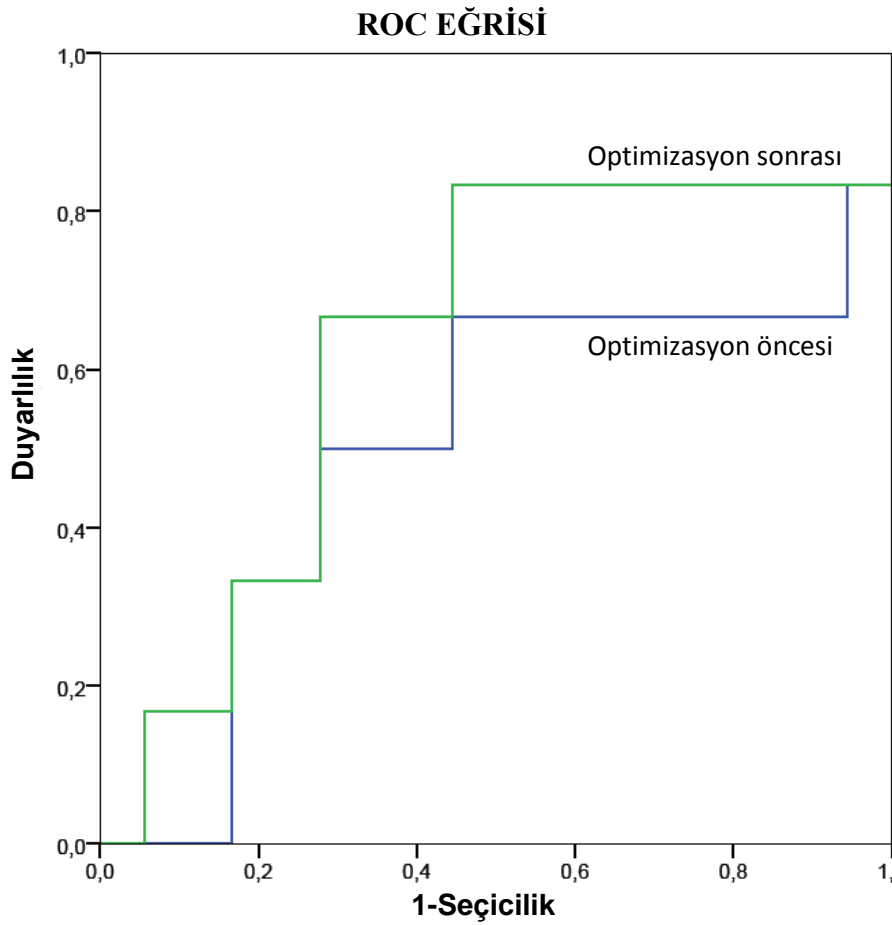
Tablo 4.1. Optimizasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik yöntem ölçüm sonuçları arasındaki korelasyonun tablosu.

		Optimizasyon öncesi	Optimizasyon sonrası
Optimizasyon öncesi	Pearson Korelasyon Anlamlılık (2-tailed)	1	,794**
	N	53	25
Optimizasyon sonrası	Pearson Korelasyon Anlamlılık (2-tailed)	,794**	1
	N	25	25

** Korelasyon 0,01 olduğunda istatistiksel olarak anlamlıdır (2-tailed).

Optimizasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik ölçüm sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasının ($p < 0,01$) nedeni, optimize edilen deney koşulları olabilir. Farklı olan sonuçlar arasında tanısal doğruluk bakımından anlamlı

fark olup olmadığını anlamak için klinik ve genetik tanıları referans alınarak optimizasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına ait ROC Eğrisi çizildi. ROC Eğrisinde eğri altında kalan alan, optimizasyon öncesi $0,500\pm 0,156$ iken optimizasyon sonrası $0,630\pm 0,143$ olarak bulundu. Bu sonuçlara göre optimizasyon sonrası tanısal doğruluk oranında artış olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.7) (Tablo 4.2).



Şekil 4.7. Optimizasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik yöntem ölçüm sonuçlarının ROC eğrisi ile değerlendirilmesi.

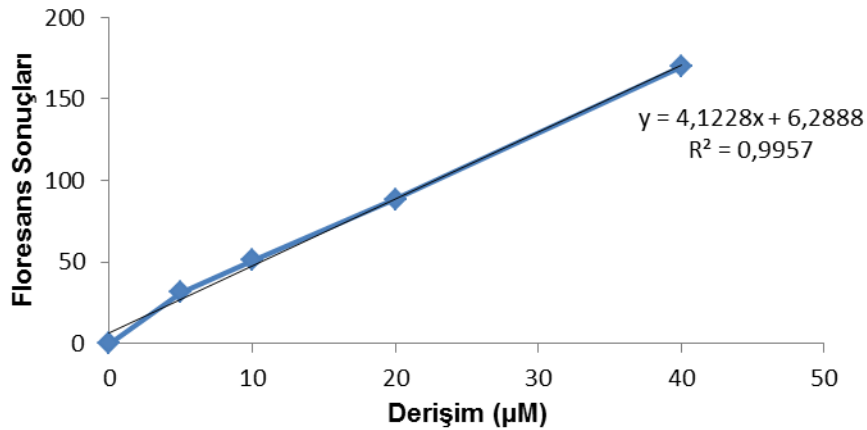
Tablo 4.2. Optimizasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik yöntem ölçüm sonuçlarının ROC eğrisi altında kalan alan (AUROC) değerleri

	ROC Eğrisi Altında Kalan Alan	Standart Hata	P	%95 Güven Aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
Optimizasyon öncesi	,500	,156	1,000	,195	,805
Optimizasyon sonrası	,630	,143	,351	,349	,910

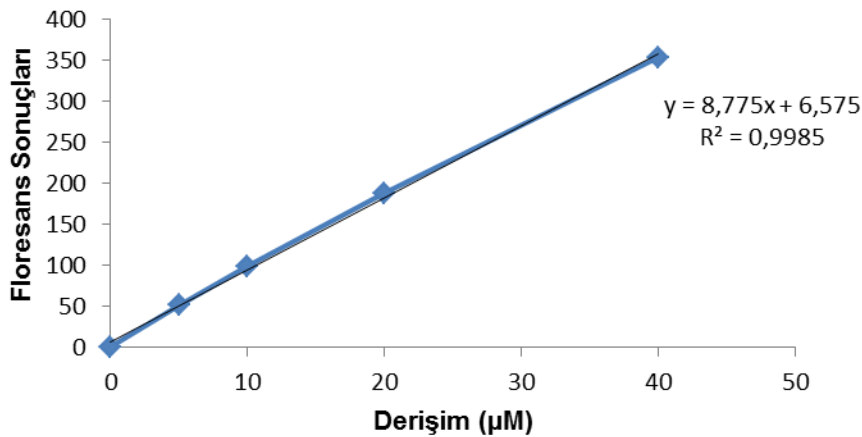
Yeni kurulan florometrik metod ile yapılan ölçümlerde farklı derişimlerdeki 6-Aminokinolin standartlarının (20 μ M, 10 μ M, 5 μ M) ölçümü yapıldı ve standart eğri çizilerek sonuçlar standart eğri üzerinden hesaplandı (Şekil 4.8). Florometrik

metodun mikropalak ve küvet kullanılarak yapılan ölçüm sonuçları ile optimize edilmiş spektrofotometrik metod ölçüm sonuçlarının klinik ve genetik tanı sonuçları ile uyumluluğu için ROC analizi yapıldı (Şekil 4.9).

a) Plak okuma için 6-Aminokinolin standart eğrisi

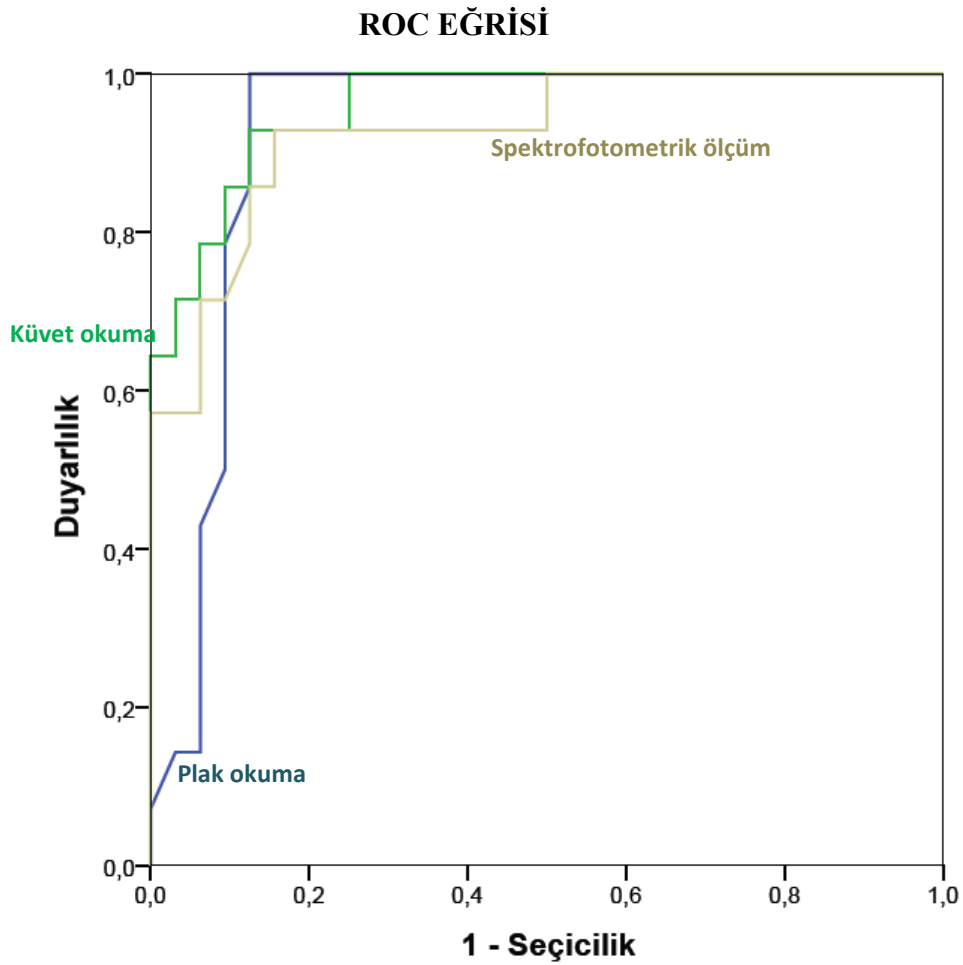


b) Küvet okuma için 6-Aminokinolin standart eğrisi



Şekil 4.8. Florometrik yöntemde plak (a) ve küvet (b) ile yapılan ölçümlerde kullanılan standart eğri grafiği.

Florometrik küvet kullanılarak yapılan ölçümde $0,960 \pm 0,025$ bulunan eğri altında kalan kalan alan, mikropalak ölçümünde $0,923 \pm 0,042$, spektrofotometrik ölçümlerde ise $0,927 \pm 0,041$ olarak bulundu (Şekil 4.9) (Tablo 4.3). Küvet kullanılarak yapılan florometrik ölçümün tanı değerinin, spektrofotometrik ve mikropalak kullanılarak yapılan florometrik ölçümden daha yüksek olduğu saptandı. Ancak bu bulgu, istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4.3).



Şekil 4.9. Spektrofotometrik yöntem ile florometrik yöntem (mikroplak ve küvet ölçümleri) sonuçlarına ait ROC eğrisi.

Tablo 4.3. Florometrik yöntem (Mikroplak ve küvet ile yapılan ölçümler), spektrofotometrik yöntemlerde ROC eğrisi altında kalan alanlar.

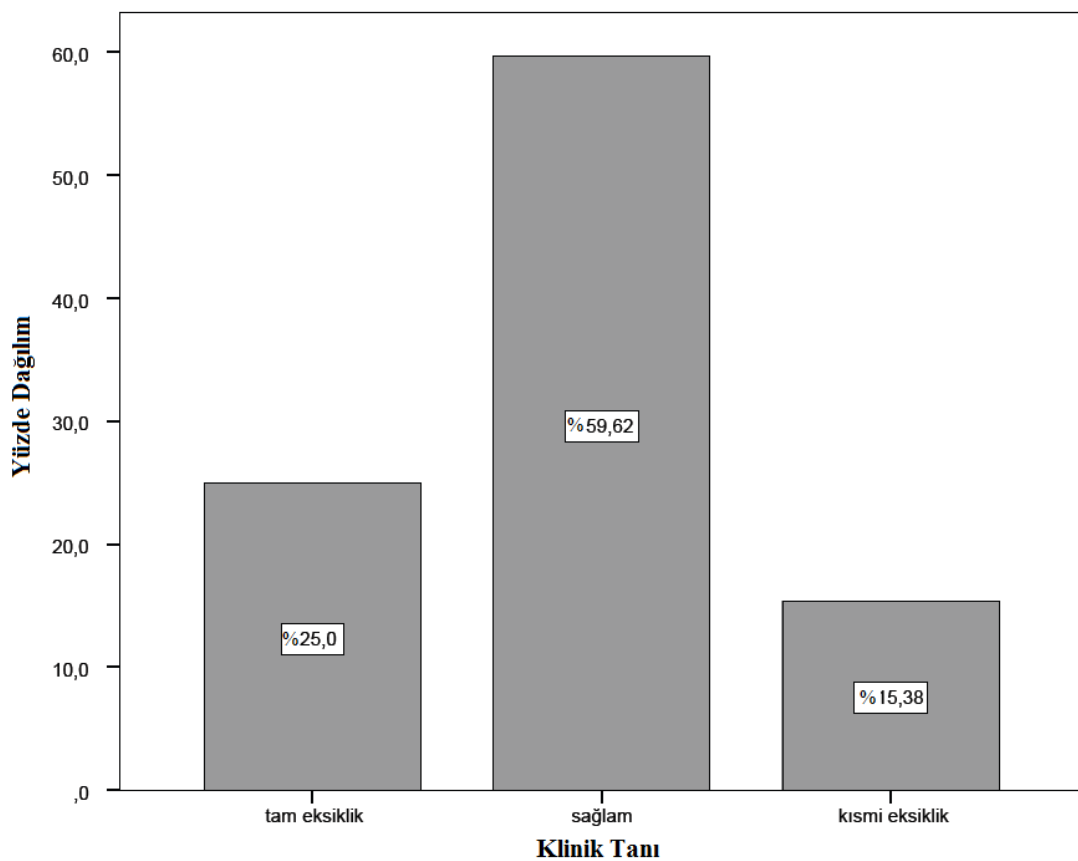
Test değişkenleri	ROC Eğrisi Altında Kalan Alan	Standart Hata	P	%95 Güven Aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
Plak okuma	,923	,042	,000	,841	1,000
Küvet okuma	,960	,025	,000	,910	1,000
Spektrofotometrik ölçüm	,927	,041	,000	,847	1,000

Metabolizma laboratuvarında 1 yıl boyunca yaptığımız ölçümlerde, spektrofotometrik ölçüm ile BTĐ aktivitesi değerlendirilen 145 yenidoğan, çocuk ve ebeveynden 3 kişide tam eksiklik saptandı, enzim aktivitesi: $0,19 \pm 0,34$ U/L olarak ölçüldü, 2 kişide ise parsiyel eksiklik saptandı ve enzim aktivitesi $0,83 \pm 0,06$ U/L olarak ölçüldü. Bununla birlikte 27 kişide ise enzim aktivitesi ortalama $4,26 \pm 1,45$ U/L olarak bulundu. Ebeveyn grubu 15 kadın, 17 erkekten oluşmak ve yaş ortalaması $30,4 \pm 5,4$ olarak değişmektedir. Yaş ortalaması $4,7 \pm 3,7$ olan 12 kız, 16 erkek toplam 28 çocukta ölçülen BTĐ aktiviteleri ortalaması $4,9 \pm 3,7$ olarak bulundu. Ortalama 2 gün-96 gün arası 85 yenidoğanda BTĐ aktivitesi: $3,9 \pm 2,8$ U/L olarak ölçüldü ve bu yenidoğanlardan 9'unda (3 kız, 6 erkek) tam enzim eksikliği ($0,34 \pm 0,25$ U/L), 24'ünde (9 kız, 15 erkek) parsiyel enzim eksikliği ($1,58 \pm 0,40$ U/L), 52'sinde (23 kız, 29 erkek) ise normal sınırlarda BTĐ aktivitesi ($5,53 \pm 2,27$ U/L) saptandı. Bir yıl içinde gelen hastalardan (6 gün - 40 yaş) klinik, genetik ve laboratuvara göre tam eksiklik (%25), sağlam (%59,62) ve kısmi eksiklik (%15,38) tanısı almış 52 kişinin serum ve plazma örnekleri alınarak hem spektrofotometrik yöntem hem de florometrik yöntemle BTĐ ölçümleri yapıldı. 52 kişilik çalışma grubunda, 10 yenidoğan ve çocuk, 3 ebeveyn olmak üzere toplam 13 tam enzim eksikliği tanısı alan hasta ile 8 kişilik kısmi enzim eksikliği tanısı alan çocuk bulunmaktadır, ayrıca 31 sağlıklı bireyin 17'si çocuk, 14'ü ebeveynlerden oluşmaktadır (şekil 4.10). Yaşa göre hasta dağılım yüzdeleri Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Yaşa göre hasta dağılımı yüzdeleri.

			Klinik tanı*			Toplam
			0	1	2	
Yaş Ebeveyn	sayı		3	14	0	17
	%		%17,6	%82,4	%0,0	%100,0
Yenidoğan-çocuk	sayı		10	17	8	35
	%		%28,6	%48,6	%22,9	%100,0
Toplam	sayı		13	31	8	52
	%		%25,0	%59,6	%15,4	%100,0

*0:hasta, 1:sağlam, 2:kısmi eksikliği olan hastalar. 17 yetişkin 35 bebek toplam 52 hasta çalışmaya dahil edildi.



Şekil 4.10. Yöntem karşılaştırması için çalışmaya dahil edilen hasta grubunun klinik tanılarına göre dağılım yüzdeleri.

13 kişi klinik olarak tam enzim eksikliği tanısı almış ve 10 mg Biotin/gün ile tedavi edilmekte olan hastalardır. Bu hasta grubundan ileri tanı testi olarak genetik test istenen 2 kişi compound heterozigot hasta, 1 kişi homozigot hasta tanısı olarak tam enzim eksikliği tanısı doğrulanmıştır. Spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre, tam enzim eksikliği olan 13 hasta içinden 6 kişide tam enzim eksikliği saptanırken, 7 kişi kısmi eksiklik olarak değerlendirilmiştir. Florometrik ölçüm sonuçlarına göre ise tam eksiklik tanısıyla tedavi edilen gruptan (n=14) 13 kişi tam enzim eksikliği, 1 kişi kısmi eksiklik olarak değerlendirilmiştir. Kısmi eksiklik tanısı alıp 5 mg/gün biyotin ile tedavi edilmekte olan 8 hasta, spektrofotometrik yöntemle incelendiğinde 1 kişi sağlam, 7 kişi kısmi eksiklik olarak tanı almıştır; florometrik yöntemle ise 4 kişi kısmi, 4 kişi tam eksiklik olarak değerlendirilmiştir. Tam eksiklik olarak değerlendirilen 4 kişiden 2'si ileri genetik test sonucuna göre de Compound heterozigot ve homozigot mutasyon tanıları ile tam enzim eksikliği olarak tanı almıştır.

Kağıt kanı ölçüm sonucu eser tam eksiklik olup kliniğinden şüphelenilerek genetik test istenen 8 kişiden 2'si compound heterozigot, 3'ü homozigot hasta, 3'ü ise sağlam taşıyıcı tanısı almıştır. Taşıyıcı olan hastalardan bir kişi spektrofotometrik yöntem ve florometrik yöntemle göre hasta olarak değerlendirilmiş ve kliniğe göre hasta kabul edilerek 5 mg Biotin/gün ile tedavi başlanmıştır.

Elimizdeki hasta bilgilerine ve ölçüm sonuçlarına dayanarak florometrik yöntemin %100 duyarlılık (sensitivite) ve %97 özgülüğe (spesifiteye) sahip olduğu sonucuna varıldı. Florometrik testin pozitif prediktif değeri %95,5 bulunurken, negatif prediktif değeri %100 olarak hesaplandı; yani elde ettiğimiz sonuçlara göre hastalık varken testin negatif çıkma olasılığı %0'dır. Klinik ve genetik test sonuçlarına göre hasta tanısı alan bireyleri gerçekte hasta, diğerlerini de sağlam olarak kabul ederek yani klinik ve genetik test sonuçlarını referans olarak, hasta olmayanlar arasında, florometrik test sonucu negatif çıkanların toplam hasta olmayanların sayısına oranı olan tanısız özgülük oranı %97 olarak hesaplandı (Tablo 4.5). Spektrofotometrik ölçümün ise duyarlılığı %90,5 özgülüğü %93,7 bulundu, bu değerler florometrik yöntemle göre daha düşüktür (Tablo 4.6).

Tablo 4.5. Florometrik Yöntemin Duyarlılık ve Özgüllüğü

		HASTALIK		
		VAR	YOK	
FLOROMETRİK TEST	Pozitif	21	1	(+) prediktif değer: %95,5
	Negatif	0	31	(-) prediktif değer : %100
		%100 Duyarlılık	%97 Özgüllük	

Tablo 4.6. Spektrofotometrik yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü

		HASTALIK		
		VAR	YOK	
SPEKTROFOMETRİK TEST	Pozitif	19	2	(+) prediktif değer: %90,5
	Negatif	2	30	(-) prediktif değer : %93
		%90,5 Duyarlılık	%93,7 Özgüllük	

Tablo 4.7. Florometrik ve Spektrofotometrik yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarının karşılaştırılması.

	Spektrofotometrik Yöntem		Florometrik Yöntem	
	AVANTAJ	DEZAVANTAJ	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Örnek hacmi		100 µL	75µL	
Test maliyeti	10 TL/test			100 TL/test
Substrat hazırlama/saklama	-20°C’de aylarca saklanabilir.			5 saat içinde çözülerek hazırlanır. 5 gün oda sıcaklığında saklanır.
İnkübasyon süresi	30 dk.			120 dk.
Manuel deney yapılışı		Uzun yorucu	Daha kolay	
Günlük, taze hazırlanan maddeler		NaNO ₂ ve Naftil etilen diamin	-	

TARTIŞMA

BTD eksikliği de dahil olmak üzere otozomal resesif (OR) kalıtsal metabolik hastalıkların çoğu Türkiye’de yüksek frekansta gözlenmektedir (Coskun ve ark., 1994). Avrupa’da BTD eksikliği nadir (yaklaşık 1/60000 yenidoğanda) gözlenmektedir (Wolf, 2001). Bu ülkelerde yakalanan hastaların çoğu akraba evliliğinin yaygın olduğu ülkelere gelen göçmenlerdir. Ülkemizde maalesef bu ülkeler arasında yer almaktadır. Baykal ve ark.’larının 1991-2005 yılları arasında yaptıkları yenidoğan taramasında 66 tam enzim eksikliği, 36 kısmi enzim eksikliği olmak üzere toplam 102 hasta tanısı konmuştur (Baykal ve ark., 1998). Bizim verilerimize göre de 1 yıl içinde incelediğimiz 52 hastada %25 oranında tam eksiklik, %15,38 oranında kısmi eksiklik gözlenmiştir. Bölgesel ve kültürel geleneklere bağlı yüksek sayıda akraba evliliklerinin varlığından dolayı bu şaşırtıcı olmayan bir sonuçtur. Bizim oranlarımızın bu kadar yüksek olmasının diğer nedeni de, hastanemize gelen örneklerin, T.C. Sağlık Bakanlığı Hıfzısıhha kurumunda Gutri kağıdı ile topuk kanından alınan kanda yapılan tarama testinde şüpheli bulunarak tekrar kalitatif ve kantitatif ölçüm için Hacettepe Üniversitesi Metabolizma Laboratuvarı’na gönderilmiş olmasıdır. Hacettepe Üniversitesi Metabolizma Laboratuvarı’nda kalitatif ölçümle eser ya da hasta olduğu tesbit edilenler kantitatif değerlendirilmektedir. Verilerimiz, toplum taramasına ait veriler değil, hastalık şüphesi olan topluluğa ait veriler olduğu için hastalık görülme oranlarımız yüksektir.

Literatüre baktığımızda, 5, 10 ve 11 yaşlarında olup, ilk kez hastaneye akut görme kaybı şikayetiyle gelip BTD eksikliği tanısı alan 3 hasta tanımlanmıştır (Lott ve ark., 1993; Rahman ve ark., 1997). Bununla birlikte, 3, 15, 1,5 ve 2 yaşlarında olup kızarıklık, ataksi ve paraparezi ile hastaneye gelmiş ve BTD eksikliği tanısı almış hastalar da bulunmaktadır (Diamantopoulos ve ark., 1986; Wastell ve ark., 1988; Wiznitzer ve Bangert, 2003). Tüm bu klinik araştırmaların sonuçlarına dayanarak, BTD eksikliği olup geç bulgu veren vakaların da olabileceği göz önüne alınarak, asemptomatik olan ancak eksiklik saptanan hastaların da, tedavi edilmesinin ve takibinin çok önemli ve gerekli olduğunu söyleyebiliriz. Bunun için hasta semptomatik olmadığı halde enzim eksikliği tanısını koymayı sağlayacak duyarlılığı yüksek testlere ihtiyaç vardır.

BTD eksikliği bulunan çocuklar, hızla azalan dokularındaki biyotin depolarını yerine koymak için, sürekli dışarıdan alacakları biyotin tedavisine bağımlıdır. Karaciğer biyotin depo havuzunda, 1 yaşındaki çocukta tahminen 120 pg biyotin bulunurken (Baker ve ark., 1962), erişkinde bu miktar yaklaşık 675 pg'dır. Kandaki toplam biyotin miktarı ise 1 yaş çocuklarda sadece 0,95 pg ve erişkinlerde ise 2,4 pg kadardır. Plazma biyotinine oranla, karaciğer depolarındaki 126 kat ve 280 katlık yüksek biyotin miktarları, normal biyotin kullanımı için biyotin döngüsünün gerekliliğini vurgulamaktadır. Karaciğer biyotin depolarındaki sürekli azalmanın, normal diyetle alınan az miktardaki biyotin ile yerine koyulabilmesi mümkün değildir. Eksikliği olan hastalarda ancak belirlenen farmakolojik doz biyotin takviyesi ile (kısmi eksiklikte 5 mg biyotin/gün, tam eksiklikte 10 mg biyotin/gün) hızlı klinik iyileşme sağlanabilmektedir. Her hastanın tedavi dozunun belirlenmesinde ve tedavi takibinde ise BTD enzim aktivitesinin ölçülmesi gerekmektedir.

Spektrofotometrik yöntem kullanılarak BTD ölçümünün yapıldığı farklı araştırmalarda, N-biyotinin PABA substratı kullanılarak insan serum biyotinidaz aktivitesi 4,68-6,75 (Wastell ve ark., 1984) ya da 4,30-7,54 (Wolf ve ark., 1983a) ve 5,70-11,2 (Pispa, 1965) arasında saptanmıştır. Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak, spektrofotometrik yöntemle sağlıklı gruptan elde edilen normal serum biyotinidaz enzim aktivitesi 3,26-7,8 U/L aralığında bulundu.

Daha önce yapılan araştırmalara göre spektrofotometrik yöntemle, diyalize edilmiş serumda BTD değerlerinin, diyalizsiz serum BTD değerlerinden 2,7 kat daha yüksek ölçüldüğü bulunmuştur. Sonuçlardaki bu farklılığın da serumda bulunan ve diyalizle uzaklaştırılan endojen inhibitör olan biyotin metabolitinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Chauhan ve Dakshinamurti, 1988). Rutin uygulamada kullanılan spektrofotometrik yöntemde, deneyi zorlaştırmamak için diyalizsiz serum tercih edilmektedir. Florometrik metotla ise diyalize edilmemiş serumda ölçüm yapmak, serumdaki küçük peptidlerin ve amino asitlerin interferansından dolayı mümkün değildir (Ebrahim ve Dakshinamurti, 1986). Florometrik yöntem ile sadece diyalize edilmiş serumda ve plazmada ölçüm yapılabilir.

Literatür bilgilerini referans olarak çalışmamızda florometrik ölçümlerde plazma, spektrofotometrik ölçümlerde ise diyalize edilmemiş serum kullanıldı.

Çalışmamızın sonuçları gösteriyor ki, spektrofotometrik yöntemin duyarlılığı %90,5 iken florometrik yöntemin duyarlılığı %100'dür. Florometrik yöntem gerçek hastayı hatasız yakalayabilmektedir, bununla birlikte spektrofotometrik yöntem ile hasta olanlara %9,5 oranında sağlam tanısı koyma riski vardır. Bu oran çok yüksek görünmeyebilir ancak bu kadar basit tedavi edilebilecek bir hastalıkta sadece tanı koymadaki yetersizlik nedeniyle kalıcı komplikasyonların gelişmesi ve hatta ölüm kabul edilemeyeceği için tanısal duyarlılığı yüksek testlerin kullanılması önemlidir.

Spektrofotometrik yöntemin duyarlılığı düşük olmasına rağmen en sık kullanılan tanı testi olmaya devam etmektedir. Bunda maliyetin ucuz olmasının büyük payı vardır. Spektrofotometrik yöntem uzun süren ve yapılış aşamasında hata oranı yüksek olan, florometrik yöntemle göre zor bir manuel testtir. Florometrik yöntemin inkübasyon süresinin, spektrofotometrik yöntemden daha uzun olması, ve substratının oda ısısında 5 saatte çözünmesi ve sadece oda ısısında 5 gün saklanabilmesi, buzdolabında bozulması ve aynı zamanda bu substratın çok pahalı olması florometrik yöntemin dezavantajlarıdır (Bkz. Tablo 4.7). Bu sorunlar çözüldüğünde florometrik yöntem, hata oranı daha düşük ve daha hassas olduğu için spektrofotometrik yöntemle göre tercih edilen bir yöntemdir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Serum BTD enzimi oda sıcaklığında 2 saat içinde, 4°C’de 1 günde, -20°C ve -80°C’de ise aylarca stabilitesini korur. Örnek alımı ve nakil sırasında mutlaka stabilite koşullarına dikkat edilmelidir.

Çalışmaya dahil olan hastalardan elde ettiğimiz ölçüm sonuçlarına göre florometrik yöntemin %100 duyarlılığa sahip olduğunu spektrofotometrik yöntemin ise %90,5 duyarlılıkta olduğunu saptadık (Bkz. Tablo 4.2). Duyarlılıklar arasında her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da BTD eksikliğinin tanısında kullanılacak olan testin duyarlılığının daha yüksek olması tercih edilmelidir. Çünkü hastalık eğer erken tanı konmazsa tedavisi mümkün olmayan sekeller bırakmakta ve hatta ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Bulgularımıza göre duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek bulunan florometrik yöntem, biyotinidaz eksikliği olan hastalarda doğru tanıyı koymada spektrofotometrik yöntemden daha üstündür.

BTD eksikliğinin ülkemizdeki sıklığı ve doğru tanı koymanın hayati öneme sahip olduğu göz önüne alınarak, hassasiyeti daha yüksek florometrik yöntem tanı testi olarak kullanılmalı ancak florometrik yöntemin maliyet ve maliyeti etkileyen substrat saklama koşulları gibi dezavantajlarını azaltmaya yönelik ileri araştırmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

Ayhan E, Kıvrak A, Aytekin S (2011) Saç Değişiklikleri ve Periorifisyal Lezyonlarla Seyreden Biotinidaz Eksikliği: Olgu Sunumu. *Turk J Dermatol* 5:79-81.

Baker H, DeAngelis B, Frank O (1989) Plasma biotinidase assay using the protozoan *Ochromonas danica*. *Nutr Rep Int* 39:243–251.

Baker H, Frank O, Matovich VB et al. (1962) A new assay method for biotin in blood, serum, urine, and tissues. *Anal Biochem* 3:31-39.

Baumgartner ER, Suormala T (1997) Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism. *Int J Vitam Nutr Res* 67:377–384.

Baumgartner ER, Suormala T, Wick H, Bausch J, Bonjour JP (1985) Biotinidase deficiency associated with renal loss of biocytin and biotin. *Ann N Y Acad Sci* 447:272–287

Baumgartner ER, Suormala TM, Wick H, Probst A, Blauenstein U, Bachmann C, Vest M (1989) Biotinidase deficiency: a cause of subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh Syndrome) Report of a case with lethal outcome. *Pediatr Res* 26:260–266.

Baykal T, Huner G, Sarbat G, et al. (1998) Incidence of biotinidase deficiency in Turkish newborns. *Acta Paediatr* 87(10):1102-1103.

Broda E, Baumgartner ER, Scholl S, Stopsack M, Horn A, Rhode H (2001) Biotinidase determination in serum and dried blood spots—high sensitivity fluorometricultramicro-assay. *Clin Chim Acta* 314:175–185.

Burri BJ, Sweetman L, Nyhan WL (1981) Mutant holocarboxylase synthetase: evidence for the enzyme defect in early infantile biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *J Clin Invest* 68:1491–1495.

Burri BJ, Sweetman L, Nyhan WL (1985) Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 37:326– 337.

- Chauhan, J, Dakshinamurti K (1988) Role of human serum biotinidase as biotin-binding protein. *Biochem J* 256:265-270.
- Chew YC, Sarath G, Zempleni J (2007) An avidin-based assay for quantification of histone debiotinylase activity in nuclear extracts from eukaryotic cells. *J Nutr Biochem* 18: 475-481.
- Cole H, Reynolds TR, Lockyer JM, Buck GA, Denson T, Spence JE, Hymes J, Wolf B (1994a) Human serum biotinidase. cDNA cloning, sequence, and characterization. *J Biol Chem* 269:6566–6570.
- Cole H, Weremowicz S, Morton CC, Wolf B (1994b) Localization of serum biotinidase (BTD) to human chromosome 3 in band p25. *Genomics* 22:662–663.
- Coskun T, Tokatli A, Ozalp I (1994) Inborn errors of biotin metabolism. Clinical and laboratory features of eight cases. *Turk J Pediatr* 36: 267-278.
- Diamantopoulos N, Painter MJ, Wolf B, Heard GS, Roe C (1986) Biotinidase deficiency: accumulation of lactate in the brain and response to physiologic dose of biotin. *Neurology* 36:1107–1109.
- Ebrahim H, Dakshinamurti K (1986) A fluorometric assay for biotinidase. *Analytical Biochemistry* 154:282-286.
- Gravel RA, Narang MA (2005) Molecular genetics of biotin metabolism: old vitamin, new science. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16:428–431.
- Grier RE, Heard GS, Watkins P, Wolf B (1989) Low biotinidase activities in the sera of patients with impaired liver function: evidence that the liver is the source of serum biotinidase. *Clin Chim Acta* 186:397–400.
- Gulati S, Passi GR, Kumar A, et al. (2000) Biotinidase deficiency a treatable entity. *Indian J Pediatr* 67(6):464-466.
- Haagerup A, Andersen JB, Blichfeldt S, Christensen MF (1997) Biotinidase deficiency: two cases of very early presentation. *Dev Med Child Neurol* 39:832–835.

Hart PS, Hymes J, Wolf B (1991) Isoforms of human serum biotinidase. *Clin Chim Acta* 197:257–264.

Heard GS, Secor McVoy JR, Wolf B (1984) A screening method for biotinidase deficiency in newborns. *Clin Chem* 30:125–127.

Heard GS, Wolf B, Jefferson LG, et al. (1986) Neonatal screening for biotinidase deficiency: results of a 1-year pilot study. *J Pediatr* 108:40–46.

Heard GS, Wolf B, Reddy JK (1984) Pancreatic biotinidase activity: the potential for intestinal processing of dietary protein-bound biotin. *Pediatr. Res.* 18 198A.

Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B (1995) Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem Mol Med* 56:76–83.

Hymes J, Stanley CM, Wolf B (2001) Mutations in BTBD9 causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat* 200:375–381.

Knappe J, Brümmer W, Biederbick K (1963) Reinigung und Eigenschaften der Biotinidase aus Schweinenieren und *Lactobacillus casei*. *Biochem Z* 338:599–613.

Knight HC, Reynolds TR, Meyers GA, Pomponio RJ, Buck GA, Wolf B (1998) Structure of the human biotinidase gene. *Mamm Genome* 9:327–330.

Koivusalo M, Pispä J (1963) Biotinidase activity in animal tissue. *Acta Physiol Scand* 58:13–19.

Kumasaka K, Muratsugu M, Fukui T, Kimura M, Takagi Y, Hashizume N (2001) A new quantitative analytical method of serum biotinidase activity using biocytin as a substrate and its clinical significance in Japan. *Clin Chim Acta* 306:71–77.

Livaniou E, Evangelatos GP, Ithakissios DS (1987) Biotin radioligand assay with an ¹²⁵I-labeled biotin derivative, avidin, and avidin double-antibody reagents. *Clin Chem* 33:1983–1988.

Lott IT, Lottenberg S, Nyhan WL, Buchsbaum MJ (1993) Cerebral metabolic changes after treatment in biotinidase deficiency. *J Inher Metab Dis* 16: 399–407.

McVoy JR, Levy HL, Lawler M, Schmidt MS, Ebers DD, Hart PS, Pettit DD, Blitzer MG, Wolf B (1990) Partial biotinidase deficiency: clinical and biochemical features. *J. Pediatr.* 116:78–83.

Mock DM, Heinrich CL, Carnell N, Mock NI (2002) Indicators of marginal biotin deficiency and repletion in humans: validation of 3-hydroxyisovaleric acid excretion and a leucine challenge. *Am.J.Clin.Nutr* 76:1061-1068.

Mock DM, Henrich-Shell CL, Carnell N, Stumbo P, Mock NI (2004) 3-Hydroxypropionic acid and methyl citric acid is not reliable indicators of marginal biotin deficiency in humans. *J. Nutr* 134: 317-320.

Möslinger D, Stöckler-Ipsiroglu S, Scheibenreiter S, Tiefenthaler M, Mühl A, Seidl R, Strobl W, Plecko B, Suormala T, Baumgäther ER (2001) Clinical and neuropsychological outcome in 33 patients with biotinidase deficiency ascertained by nationwide newborn screening and family studies in Austria. *Eur J Pediatr* 160:277–282.

Pabuccuoglu A, Aydogdu S, Bas M (2002) Serum biotinidase activity in children with chronic liver disease and its clinical implications. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 34:59–62.

Perham RN (2000) Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Ann Rev Biochem* 69:961–1004

Pispa J (1965) Animal biotinidase. *Ann Med Exp Biol Fenn* 43:5–39.

Pomponio RJ, Ozand PI, Al Essa M, Wolf B (2000b) Novel mutations in children with profound biotinidase deficiency from Saudi Arabia. *J Inherit Metab Dis* 23:185–187.

Pomponio RJ, Coskun T, Demirkol M, et al. (2000a) Novel mutations cause biotinidase deficiency in Turkish children. *J Inherit Metab Dis* 23:120 –128.

Rahman S, Standing S, Dalton RN, Pike MG (1997) Late presentation of biotinidase deficiency with acute visual loss and gait disturbance. *Dev Med Child Neurol* 39: 830–831.

Rezvani I and Rosenblatt DS (2003) Valine, leucine, isoleucine, and related organic acidemias. In: Behrman RE, Kleigman R, Jenson HB, editors. *Nelson textbook of pediatrics* 17th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p.409-418.

Stanley CM, Hymes J, Wolf B (2004) Identification of alternatively spliced human biotinidase mRNAs and putative localization of endogenous biotinidase. *Mol Genet Metab* 81:300-312.

Stevenson DE, Feng R, Dumas F, Groleau D, Mihoc A, Storer AC (1992) Mechanistic and structural studies on *Rhodococcus* ATCC 39484 nitrilase. *Biotechnol Appl Biochem* 15:283-302.

Suormala TM, Baumgartner ER, Bausch J, Holick W, Wick H (1988) Quantitative determination of biocytin in urine of patients with biotinidase deficiency using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Clin Chim Acta* 177:253–270.

Suormala TM, Baumgartner ER, Wick H, Scheibenreiter S, Schweitzer S (1990) Comparison of patients with complete and partial biotinidase deficiency: biochemical studies. *J Inherit Metab Dis* 13:76–92.

Thoma RW, Peterson WH (1954) The enzymatic degradation of soluble bound biotin. *J. Biol. Chem* 210 569–579.

Thuy LP, Zielinska B, Sweetman L, Nyhan WL (1985) Determination of biotinidase activity in human plasma using (14C)-biocytin as substrate. *Ann N Y Acad Sci* 447:434.

Tong L (2013) Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell. Mol. Life Sci* 70:863-891.

Velazquez A (1997) Biotin deficiency in protein-energy malnutrition: implications for nutritional homeostasis and individuality. *Nutrition* 13:991–992.

Velazquez A, Martin-del-Campo C, Baez A, Zamudio S, Quiterio M, Aguilar JL, et al. (1989) Biotin deficiency in protein-energy malnutrition. *Eur J Clin Nutr* 43:169-173.

Wastell H, Dale G, Bartlett K (1984) A sensitive rate assay for biotinidase using a new derivative of biotin, biotinyl-6-aminoquinoline. *Anal Biochem* 140:69-73.

Wastell HJ, Bartlett K, Dale G, Shein A (1988) Biotinidase deficiency: a survey of 10 cases. *Arch Dis Child* 63:1244-1249.

Weiner DL, Grier RE, Wolf B (1985) A bioassay for determining biotinidase activity and for discriminating biocytin from biotin using holocarboxylase synthetase deficient cultured fibroblasts. *J Inherited Metab Dis* 8:101-102.

Wiznitzer M, Bangert BA (2003) Biotinidase deficiency: clinical and MRI findings consistent with myelopathy. *Pediatr Neurol* 29:56-58.

Wolf B (2001) Disorders of biotin metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly VS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp 3935-3962

Wolf B, Norrgard KJ, Pomponio RJ, Mock DM, McVoy JRS, Fleischhauer K, Shapiro S, Blitzer MG, Hymes J (1997) Profound biotinidase deficiency in two asymptomatic adults. *Am J Med Genet* 73:5-9

Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL (1983a) Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta* 131:273-281.

Wolf B, Pomponio RJ, Norrgard KJ, et al (1998) Delayed-onset profound biotinidase deficiency. *J Pediatr* 132: 362-365.

Wolf B (2003) Biotinidase deficiency: new directions and practical concerns. *Curr Treat Options Neurol* 5: 321-328.

Wolf B (2001) Disorders of biotin metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York:McGraw-Hill p. 3935-3962.

Wolf B (1991) Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 14:923–927.

Wolf B, Heard GS, Weissbecker KA, et al. (1985) Biotinidase deficiency: initial clinical features and rapid diagnosis. *Ann Neurol* 18:614-617.

Wolf B, Secor McVoy J (1983) A sensitive radioassay for biotinidase activity: deficient activity in tissues of serum biotinidase-deficient individuals. *Clin Chim Acta* 135:275–281.

Wolf B, Spencer RF, Gleason AT (2002) Hearing loss is common in symptomatic children with profound biotinidase deficiency. *J Pediatr* 140: 242-246.

Wolf B, Hymes J, Heard GS. (1990) Biotinidase. *Methods Enzymol* 184:103–111.

Wolf B (2002) Children with profound biotinidase deficiency should be treated with biotin regardless of their residual enzyme activity. *Eur. J. Pediatr* 161 167–168.

Wolf B, Feldman GL (1982) The biotin-dependent carboxylase deficiencies. *Am J Hum Genet* 34:699–716.

Zempleni J, Mock DM (2000) Marginal biotin deficiency is teratogenic. *Proc Soc Exp Biol Med* 223:14– 21.