T.C.

HARRAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTİNİDAZ EKSİKLİĞİ OLAN BİREYLERDE NEUROKİNİN A, S100B ve RESİSTİN PROTEİNLERİNİN SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet Burak COŞKUN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2020

T.C.

HARRAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTİNİDAZ EKSİKLİĞİ OLAN BİREYLERDE NEUROKİNİN A, S100B ve RESİSTİN PROTEİNLERİNİN SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet Burak COŞKUN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2020

Doç. Dr. İsmail KOYUNCU danışmanlığında, Mehmet Burak COŞKUN'un hazırladığı **"Biyotidinaz eksikliği olan bireylerde Neurokinin A, S100B ve Resistin proteinlerinin seviyelerinin incelenmesi"** konulu bu çalışma 10/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Doç. Dr. İsmail KOYUNCU .....

Üye : Doç. Dr. Arif PARMAKSIZ .....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖRKMEZ .....

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Doç. Dr. İsmail HİLALİ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZİLGELER DİZİNİ v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
1.GİRİŞ 1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
2.1. Biyotinidaz eksikliği 5
2.1.1. Biyotinidaz eksikliği epidemiyolojİsi 6
2.1.2. Biyotinidaz eksikliğinin biyokimyasal ve immünolojik özellikleri 7
2.1.3. Biyotinidaz metabolizması 8
2.1.4. Biyotinidaz eksikliğinin tanısı 9
2.1.5. Biyotinidaz eksikliğinin değerlendirilmesi 10
2.1.6. Biyotinidaz eksikliğinde semptomlar 10
2.1.7. Biyotinidaz eksikliğinin tedavisi 12
2.2. Biyotin mutasyonu 13
2.3. Biyotinidaz eksikliğinin hastalık taraması 15
2.4. Protein S100B 16
2.4.1. S-100 protein yapısı ve metabolizması 16
2.4.2. S-100 proteinlerinin fonksiyonu 17
2.4.3. S-100' ün saptandığı dokular 17
2.4.4. S-100 düzeyinde fizyolojik değişiklikler 18
2.4.5. S-100 düzeyinde patolojik değişiklikler 19
2.5. Resistin (RETN) 21
2.6. Nöropeptidler 23
2.6.1. Nörokinin a (NKA) 25
3.MATERYAL ve YÖNTEM 26
3.1.Çalışma gruplarının oluşturulması 26
3.1.1. Kan serumunun eldesi 26
3.1.2. Kullanılan cihaz ve malzemeler 27
3.2. Yöntem 27
3.2.1. Nörokinin A tayini 27
3.2.2. Resistin (RETN) tayini 30
3.2.4. Protein S100B tayini 32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 35
4.1. Nörokinin A bulguları 35
4.2. S100B bulguları 36
4.3. Resistin bulguları 37
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 38
KAYNAKLAR 45
ÖZGEÇMİŞ 53

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOTİNİDAZ EKSİKLİĞİ OLAN BİREYLERDE NEUROKİNİN A, S100B ve RESİSTİN PROTEİNLERİNİN SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet Burak COŞKUN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İsmail KOYUNCU
Yıl: 2020, Sayfa: 53

Biyotinidaz enzimi biyotin vitamini geri dönüştüren bir enzimdir. Biyotin yağların, karbonhidratların ve proteinlerin metabolizmasında önemli rol oynayan karboksilaz enzimlerinin kofaktörü olarak kullanılır. Biyotinidaz enzim eksikliği bu tür enzimlerin aktivitesini azaltarak, otozomal resesif kalıtımlı nörokutanöz bulgulara yol açan metabolik bir hastalığa neden olur. Biyotinidaz eksikliği, vücuda proteine bağlı şekilde alınan biyotinin bağlı olduğu proteinden serbestleşmesinin bozulması sonucu vücutta meydana gelen metabolik değişikliklerin gözlendiği bir hastalık olarakda bilinmektedir. Biyotinidaz eksikliği görülen hastalarda; nöbet, hipotoni, alopesi, eritemli deri lezyonları, gelişme geriliği, konjonktivit, görme ve işitme bozuklukları gibi ketolaktik asidoz ve organik asideminin eşlik edebileceği nörolojik ve kutanöz bulgular ortaya çıkmaktadır. Bu tür hastalara biyotin takviyesi, bu semptomları hafifletilmesine ve bazen tamamen durdurulmasını sağlar. Bu hastalığın, yeni doğan taramalarında tanısı konabilir ve bulgularının ortaya çıkması önlenebilmektedir. Türkiye biyotinidaz eksikliğinin en sık görüldüğü ülkeler arasında olup ve Şanlıurfa bu hastalığın en çok gözlendiği şehirlerarasında yer almaktadır. Bu çalışmada biyotinidaz enzim eksikliği olan çocuklarda Neurokinin A, S-100B ve Resistin moleküllerinin hastalığın patogenezindeki rolünü tespit etmek amacıyla yapıldı. Çalışmada biyotinidaz ezim aktivitesi %10'nun altında olduğu tespit edilen 30 hasta çocuk ve biyonidaz enzim aktivitesi normal seviyede olan 30 sağlıklı çocuktan kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinden elde edilen serum örneklerindeki Neurokinin A, S-100B ve Resistin seviyeleri ELİSA yöntemiyle incelendi. Yapılan çalışma sonucunda hasta bireylerde Neurokinin A, S-100B ve Resistin seviyelerinin kontrol gurubuna göre anlamlı ($P<0,05$) bir şekilde arttığı tespit edildi. Çalışma sonucunda biyotinidaz eksikliği olan çocuklarda artan enflamasyon sonucunda resistin seviyesinin artarak oksidatif stress artışına neden olduğu artan oksidatif stresin ise beyin hasarına neden olarak Neurokinin A ve S-100B artışana yol açtığı tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Biyotinidaz, Neurokinin-A, S100B, , Resistin

ABSTRACT

MSc Thesis

LEVELS OF NEUROKİNİN A, S100B and RESİSTİN PROTEİNS İN İNDİVİDUALS WİTH BİOTİNİDASE DEFİCİENCY

Mehmet Burak COŞKUN

Harran University
Graduate School of Natural andApplied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İsmail KOYUNCU
Year: 2020, Page: 53

Biotinidase enzyme recycles biotin. Biotin is used as a cofactor of carboxylase enzymes, which play an important role in the metabolism of fats, carbohydrates and proteins. Biotinidase enzyme deficiency reduces the activity of such enzymes, causes an autosomal recessively inharitance metabolic disease which leads to neurocutaneous findings. Biotinidase deficiency is also known as a disease in which metabolic changes occur in the body as a result of the disruption of the release of the biotin, which is absorbed into the body bound to protein. Neurological and cutaneous findings may be accompanied by ketolactic acidosis and organic acidemia such as seizures, hypotonia, alopecia, erythematous skin lesions, developmental retardation, conjunctivitis, visual and hearing disorders may be seen in patients with biotinidase deficiency. Biotin supplementation to such patients allows these symptoms to be relieved or even stopped sometimes. This disease can be diagnosed in newborn screening and the emergence of symptoms can be prevented. Turkey is among the countries of biotinidase deficiency is most commonly seen and, Şanlıurfa is located between the cities where the disease is most frequently observed in Turkey. This study was carried out to determine the role of Neurokinin A, S-100B and Resistin molecules in the pathogenesis of the disease in children with biotinidase enzyme deficiency. In the study, blood samples were obtained from 30 patients who were found to have biotinidase enzyme activity below 10% and 30 healthy children with normal bionidase enzyme activity. Neurokinin A, S-100B and Resistin levels in serum samples obtained from blood samples were examined by ELISA method. As a result of the study, it was found that Neurokin A, S-100B and Resistin levels increased significantly ($p < 0.05$) in the patients compared to the control group. As a result of the study, it has been determined that as a result of increased inflammation in children with biotinidase deficiency, the level of resistin increases, causing an increase in oxidative stress, leading to an increase in Neurokin A and S-100B by causing brain damage.

KEYWORDS: Biotinidaz, Neurokinin-A, S100B, Resistin

TEŞEKKÜR

Araştırma, çalışmalarımız boyunca ve tezin hazırlanmasında emeği geçen, Gerek bilimsel konularda gerekse manevi anlamda benden yardımını esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. İsmail KOYUNCU'ya,

Laboratuvar çalışmalarımız süresince bizlere daima destek olan;

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Nihayet BAYRAKTAR'a,

Harran Üniveristesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Başhekim Yardımcısı Doç. Dr. Ataman GÖNEL'e,

Tez aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ, Doç. Dr. Mustafa DURGUN, Doç.Dr. Arif PARMAKSIZ, Op. Dr. Mihriban YALÇIN'a, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖRKMEZ'e,

Hak ve emekleri asla ödenmeyecek yaşamımın her aşamasında bana destek olup sevgi ilgi ve desteklerini eksik etmeyen, bugünlere gelmemi sağlayan; Durdu Mehmet COŞKUN, Fatma COŞKUN, Selma COŞKUN'a,

Bu tezin oluşmasına büyük katkı sağlayan sevgili meslektaşım ve kardeşim Özgür YÜKSEKDAĞ'a,

Son olarak hayatımın her aşamasında desteğini bulduğum Op. Dr. Veysel TOPRAK, Perf. İsmail ACAR, İnt. Dr. Abdurrahman KARATAŞ, Hatice OLUK, Yeşim BAŞ, Murat AKPINAR, Songül CEYLAN, Umut ÜNSALOĞLU, Hamza KÖYLÜ ve ODH Kalp ve Damar Cerrahisi ekibine ayrıca adını sayamadığım tüm arkadaşlarıma;

Sonsuz teşekkürler…

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Biyotinin biyokimyasal yapısı....8
Şekil 2.3. Resistin molekülünün görünümü 21
Şekil 4.1. Hasta ve kontrol guruplarının Neurokinin-A seviyeleri....35
Şekil 4.2. Hasta ve kontrol gruplarının S-100B seviyeleri....36
Şekil 4.3. Hasta ve kontrol gruplarının Resistin karşılaştırılması 37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Biyotinin özellikleri. 8
Çizelge 2.2. İnsan biyolojik sıvılarında normal biyotin değerleri 10
Çizelge 2.3. S-100 düzeyinde artışa neden olabilen patolojik durumlar 19
Çizelge 2.4. Pulpda ilk saptanan nöropeptid sp....24
Çizelge 4.1. Demografik bilgiler....26

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devleti
ADSF	Dokuya Özgü Salgı Reseptörleri
BE	Biyotinidaz Eksikliği
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BTD	Biyotinidaz Defekti
Cu^2	Bakır
EGG	Elektroensefolografi
ELİSA	Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
MBP	Miyelin Basic Protein
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MW	MolekülAğırlığı
NKA	Nörokinin A
PCC	Propionil CoA Karboksilaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
REM	Hızlı Göz Hareketi
S100B	Protein S100B
β-mcc	B-metil krotoni CoA

1. GİRİŞ

Biyotinidaz eksikliği ilk kez günümüzden 20 yıl önce Wolf ve ark'ları (Wolf ve ark., 1985) tarafından tanımlanmıştır. Biyotinidaz, vücutta biyotin döngüsü adı verilen bir reaksiyon zinciri içinde serbest biyotin oluşum basamağı için gerekli bir enzimdir. Biyotin, organizmadaki karboksilaz enzimleri için kofaktör olarak görev yapan önemli bir vitamindir. Otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalık olan biyotinidaz eksikliği organizmada biyotin döngüsünü bozarak metabolik asidoz, deri bulguları ve nörolojik belirtiler gibi değişik klinik ve laboratuvar bulgularının görüldüğü bir hastalık tablosuna yol açar (Rezvani ve Rosenblatt, 2003; Wolf , 2003). Dünya ülkeleri içinde biyotinidaz eksikliğinin en sık görüldüğü ülkenin Türkiye olduğu bildirilmiştir. Biyotinidaz eksikliği yenidoğan tarama programına 2008 yılında girmiştir (Tezel ve ark., 2014).

Biyotinidaz, biyotin döngüsünde görevli bir enzimdir. Biyotin ise suda çözünen, glukoneogenez, yağ asidi sentezi ve dallı zincirli amino asit katabolizmasında görevli karboksilaz enzimlerinin kofaktörü olan bir vitamindir (Gravel ve Narang, 2005). Biyotinidaz eksikliğinde, vücuda proteine bağlı şekilde alınan biyotinin, bağlı olduğu proteinden serbestleşmesi bozularak nöbet, hipotoni, alopesi, eritemli deri lezyonları, gelişme geriliği, konjonktivit, görme ve işitme bozuklukları gibi ketolaktik asidoz ve organik asideminin eşlik edebileceği nörolojik ve kutanöz bulgular ortaya çıkar (Wolf, 2005). Biyotinidaz eksikliği hastalığından BTD gen mutasyonları sorumludur.

Biyotin, biyotine bağımlı propionil-CoA karboksilaz (PCC), P-metilkrotonil-CoA karboksilaz (MCC), piruvat karboksilaz (PC) ve asetil-CoA karboksilaz (ACC) gibi beş karboksilazın koenzimdir (Moss ve Lane, 1971). PCC, propiyonil-CoA tometilmalonil-CoA'yı dönüştürerek çeşitli dallı zincirli amino asitlerin ve tek karbonlu zincir yağ asitlerinin katabolizmasında rol oynar.

B-metilglutakonil-CoA. PC, piruvatın fosfoenolpiruvat biyosentezinde bir ara madde olan oksaloasetata ve nihayetinde glikoza dönüşümünü katalize eder. ACC, yağ asidinin biyosentezinde atılmış ilk adım olan asetil-CoA'dan malonil-CoA oluşumunu katalize eder. Karboksilazların eksiklikleri ve sonuçta anormal metabolik ara maddelerin birikimi, diğer yollar üzerinde ciddi klinik sonuçlara yol açan derin etkiye sahiptir (Wolf ve Feldman, 1982). Holokarboksilaz sentetaz (HCS), biyotinin, apokarboksilazların korunmuş lizil kalıntılarının ε-amino gruplarına kovalent bağlanmasını katalize eder; Böylece apokarboksilazların holokarboksilazlara dönüştürülmesi sağlanır (Sweetman, 1981). Holokarboksilazların proteolitik döngüsü sırasında biyosit (biyotinil-p-lizin) ve küçük biyotinil-peptitler salınır. Biyotinidaz biyositini ve küçük biyotinil-peptidleri hidrolize eder, böylece serbest biyotini geri dönüştürür (Craft ve diğerleri, 1985; Pispa, 1965). Bu nedenle, HCS veya biyotinidazda genetik kusuru olan çocuklar çoklu karboksilaz eksikliğine (MCD) neden olur.

İnsanlarda biyotin eksikliği nadirdir, çünkü biyotin biyotinidazın etkisiyle sürekli olarak geri dönüştürülmektedir. Biyotin ayrıca diyetten ekzojen olarak, ya doğrudan meyve ve sebze gibi kaynaklardan serbest biyotin olarak ya da biyotinidaz tarafından biyoyararlı hale getirilmesi gereken proteinle konjüge edilmiş bir formda elde edilir. Doğrudan diyetten gelen serbest biyotin miktarı azdır. Bu nedenle, biyotinidaz vücuttaki serbest biyotin havuzunun korunmasında önemli bir rol oynar ve yetersiz biyotinidaz aktivitesi çocuklarda geç başlangıçlı MCD ile sonuçlanır.

Biyotinidaz eksikliği, tedavi edilmezse, ciddi nörolojik ve kutanöz sonuçlara neden olabilir (Wolf, 2001; Wolf ve diğerleri, 1983). Derin biyotinidaz eksikliği (ortalama normal serum aktivitesinin% 10'undan az) olan çocuklar hipotoni, nöbetler, ataksi, optik atrofi, sensörinöral işitme kaybı, spastik paraparezi ve gelişimsel gecikme gibi nörolojik semptomlar gösterebilir (Wolf, 1992). Metabolik asidoz, hiperammonemi ve / veya organik asidemi / üria, semptomatik çocukların ortak biyokimyasal özellikleridir. Semptomatik çocukların çoğunda radyolojik inceleme sırasında merkezi sinir sistemi (MSS) anormallikleri görülmemesine rağmen, en sık bildirilen anormal bulgular CNS atrofisi, azalmış beyaz cevher kütlesi

ve ventriküler genişlemedir. Etkilenen çocuklar biyotin tedavisine belirgin şekilde cevap verir; bununla birlikte tanıdaki gecikme ve tedaviyi hızla başlatamama, işitme kaybı, görme keskinliğinde bozulma ve gelişimsel gecikme gibi yaşam boyu nörolojik defisitlerle sonuçlanabilir (Wolf, 2001). Bozukluğun geri dönüşü olmayan sonuçlarını önlemek için, biyotinidaz eksikliği için yenidoğan taraması, ABD ve dünyadaki birçok yeni doğan tarama programına dahil edilmiştir (Wolf, 1991; Wolf ve Heard, 1990).

Biyotinidaz eksikliği için yenidoğan taramasının ortaya çıkmasıyla birlikte, bozukluğu olan çocukların çoğu presemptomatik olarak tanımlanır, biyotin tedavisi başlatılır ve bozukluğun olumsuz etkileri önlenir. Yenidoğan taraması da bozukluğun doğal tarihini incelemek için fırsat penceresini kapatmıştır.

Biyotinidaz eksikliğinin nöropatofizyolojisini incelemek için derin biyotinidaz eksikliğine sahip transgenik bir knock-out fare ile ççalışma yapılmıştır (Pindolia ve ark., 2011). Biyotinidaz eksikliği olan farelerde semptomal nörolojik eksiklikler, benzer bozukluğa sahip çocuklarda da izlenir. Bir fonksiyonel nörolojik değerlendirme test pili kullanarak, semptomatik fareler vahşi tip farelere kıyasla zayıf performans göstermiştir. Demiyelinizasyon, aksonal dejenerasyon, ventrikülomegali ve korpus kallozum kompresyonu, tedavi edilmemiş, semptomatik enzim eksikliği olan farelerin beyinlerinde bulunmuştur. Biyotin tedavisi ile semptomatik fareler nörolojik olarak iyileşmiş ve beyaz cevher anormallikleri düzelmiştir. Bu fonksiyonel ve anatomik bulguların biyotin tedavisi ile iyileşmesi tedavi edilmeyen biyotidinaz eksikliği olan bireylerde benzer etkilerin görüleceği düşünülmüştür. Bu çalışma göz önüne alındığında biyotinidaz eksikliği olan fare çalışmalar için uygun görünmektedir. Bu çalışmalarda biyotinidaz eksikliği yaşayan fareler benzer şekilde biyotidinaz hastası olan kişilerle ortak biyokimyasal parametre ve klinik tablo özellikleri göstermektedir. Bu anlamda iki grupta benzer şekilde biyotin tedavisine anlamlı yanıt vermektedir. Bu çalışmada norolojik defekt gösteren fareler, biyotin tedavisi ile nörolojik hasarın geri döndürülebilir olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada ise ilk defa biyotinidaz eksikliği olan çocuklarda enzim eksikliğinin beyin hasarı ve enflamasyon markırları olan nörokinin A, S100B ve resistin seviyeleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Nörokinin A, nöropeptit nörotransmitterlerinin taşikinin ailesinin bir üyesi olarak bilinmektedir. Taşikininler, nosiseptif işleme, tokluk ve düz kas kasılmasına önemli katkıda bulunmaktadırlar. Taşikininlerin, majör merkezi nöral sistemlerde yüksek oranda uyarıcı nörotransmiterler olduğu bilinmektedir (Nakanishi ve Shigetada, 2006). Nörokinin A, hem merkezi hem de periferal memeli sinir sistemlerinde her yerde bulunur ve ağrı ve inflamatuar yanıtlara karşı reaksiyonlarda rol oynadığı bilinmektedir. S100 proteinleri ise çok çeşitli hücrelerin sitoplazmasında ve çekirdeğinde lokalize olup hücre döngüsü ilerlemesi ve farklılaşması gibi bir dizi hücresel işlemin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (Wang ve Bordey, 2008).

S100B proteinin bozukluğu alzheimer hastalığı, down sendromu, epilepsi, amiyotrofik lateral skleroz, schwannoma, melanoma ve Tip-I diyabet dahil olmak üzere birçok nörolojik, neoplastik ve diğer hastalık türlerinde rol oynamaktadır (Clozel ve ark., 2004). Resistin olarak da bilinen adipoz dokuya özgü salgı faktörü (ADSF) bir sistein açısından zengin yağ kaynaklı peptid hormonu insanlarda RETN gen ile kodlanır (Wang ve ark., 2002).

Bu çalışma ile ilk defa literatürde biyotinidaz eksikliğinin beyin hasarı üzerindeki patofizyolojisi üzerindeki olası etkileri incelemiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Biyotinidaz Eksikliği

Biyotin, dört karboksilaza (propionil-CoA karboksilaz, piruvat karboksilaz, asetil CoA karboksilaz ve metilkrotonil-CoA karboksilaz) kovalent bağlanan ve koenzim görevi gören suda çözünür bir vitamindir. Bu enzimler glukoneogenezde, amino asit katabolizmasında ve yağ asidi sentezinde rol oynarlar (Raha ve Udani, 2011; Canda ve ark., 2018).

Biyotinidaz eksikliği ilk kez 1985'te Wolf ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Wolf ve ark., 1985). Biyotinidaz eksikliği kalıtımsal olarak otozomal resesif geçiş gösteren, hayatın ilk haftalarından itibaren semptomlarını gösteren bir metabolik bozukluktur (Rezvani ve Rosenblatt, 2004; Haagerup ve ark., 1997). Bu hastalarda, biyotin vitamininin serbest hale geçmesini sağlayan biyotinidaz enziminde eksiklik vardır.

Biyotinidaz enzimi, biyotinin diyet proteinlerinden ayrılarak sebest hale gelmesinde ve bu sayede emilmesinde ve aktif holokarboksilazlar gibi biyotinil peptidlerden serbest bırakılarak tekrardan biyotin döngüsüne katılmasında kritik bir role sahip bir enzimdir.

Apokarboksilaz enzimlerinin aktivasyonunda kofaktör olarak görev alan biyotinin serbest hale geçmemesi sonucu, karboksilazlar aktivite gösteremezler. Biyotinidaz eksikliğinde biyotin, idrarda biositin halinde kaybedilir ve karboksilazların sorumlu olduğu reaksiyonların gerisinde kalan ürünlerin birikmesi sonucu giderek ilerleyen düzeyde bir biyotin eksikliği gelişir ve hastalık belirtileri gelişir (Borsatto ve ark., 2017; Desai ve ark., 2008).

Eksikliğin derecesine göre metabolik asidoz veya ketozis gelişebilir, vücut sıvılarında laktat, propiyonik asit ve glisin bileşiği, 3-hidroksiizovalerik asit birikimi görülebilir.

Konvülsiyon, ataksi, hipotoni, optik atrofi, sensoryal işitme kaybı, dermatit, alopesi gibi nörolojik ve deri bulguları, tekrarlayan fungal ve viral enfeksiyonlar, apne ve stridor gelişebilir (Rezvani ve Rosenblatt, 2004; Wolf ve ark., 1985; Tokatlı ve ark., 1992). Ağır eksiklik durumları tedavi edilmediğinde nörolojik sekellere sebep olabileceği gibi, ölüme de sebebiyet verebilir.

Multipl karboksilaz eksikliği biyotin döngüsündeki bir defektin sebep olduğu bir organik asit metabolizma bozukluğudur. Klinik olarak, neonatal form (halokarboksilaz sentetaz eksikliği) ve infantil/juvenil form (biyotinidaz eksikliği) olmak üzere iki şekilde görülebilir (De Castro ve ark., 2015).

2.1.1. Biyotinidaz eksikliğinin epidemiyolojisi

1984'ten 1990'a kadar 14 ülkede 8.532.617 yenidoğan BE eksikliği yönünden taranmış ve 142 bebekte eksiklik saptanmıştır. Bunlardan 76'sında belirgin BE (enzim aktivitesi %10'dan az) ve 66'sında kısmi BE (enzim aktivitesi %10-30 arasında) saptanmıştır. Belirgin BE sıklığı 1:112.271 (1:85.000 ile 1:145.000 arasında) ve kısmi BE 1:129.292 (1:112.700 ile 1:177.000 arasında) olarak ve toplam insidans 1:60.089 (1:49.500 ile 1:73.100 aralığında) olarak bildirilmiştir (Wolf, 1991).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1:72.000-1:126.000 arasında değişmektedir. 1992 yılında yayınlanan ve 17 eyaleti kapsayan bir raporda 1.224.018 yenidoğan taranmış 14 vaka saptanmıştır (1:87.000) (American, 1996). Macaristan'da 1989-2001 yılları arasında 1.336.145 yeni doğan taranmış, 58 hasta tespit edilmişti. Bunlardan klinik ve biyokimyasal bulguları olan 20 hastanın 11'inde belirgin BE, 7'sinde parsiyel BE, 2'sinde heterezigot BE tespit edilmiştir (Loszlo ve ark., 2003).

2004 yılında yapılan bir çalışmada Brezilya'da 225.136 yenidoğan taranarak dünyada en sık değer olan 1:9000 oranı bildirilmiştir (Neto ve ark., 2004).

Türkiye'de biyotinidaz eksikliğinin görülme sıklığını ortaya koyan ülke çapında çalışma yoktur. İstanbul İli Yenidoğan Tarama Programı çerçevesinde Ağustos 1991 ve Mayıs 1999 tarihleri arasında 466.192 yenidoğan'dan alınan kan örnekleri incelenmiş 29 yenidoğanda belirgin, 14 yenidoğanda da kısmi olmak üzere toplam 43 bebekte biyotinidaz eksikliği saptanmıştır. Bu rakamlar dikkate alındığında belirgin BE oranı 1:16.079, kısmi biyotinidaz eksikliği oranı 1:33.307 ve toplam biyotinidaz eksikliği oranı 1:11.763 olarak bulunmuştur. İstanbul İli'nde elde edilen bu sıklık dünya genelinde bildirilen en yüksek ikinci sıklıktır. Erkek/kız oranı eşit olup, taşıyıcı sıklığı 1:175'tir.

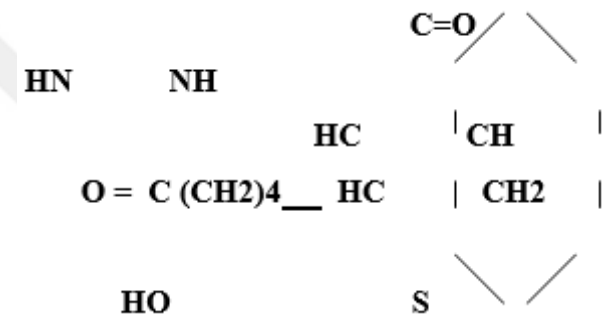
2.1.2. Biyotinidaz eksikliğinin biyokimyasal ve immünolojik özellikleri

İnsan serum biyotinidazı, izoelektrik jel elektroforezde α 1 bölgesine göç eden, moleküler ağırlığı 67-76 kDa arasında olan, tek bir polipeptit içeren glikoproteindir. Kimyasal olarak, esansiyel tiyol halkası ve aktif bölgesinde serin bileşiğinden oluşmuştur (Hoyakawa ve Oizumi, 1998; Oizumi ve ark., 1994). %20-22 oranında karbonhidrat içerir. Serum biyotinidazın, izoelektrik jel elektroforezde çok fazla mikroheterojenite gösterdiğini ve pH 4.15 ve 4.35'de en azından 4 majör ve 5 minör izoformu olduğunu bildirmiştir. Majör izoformlar total enzim aktivitesinin %75'ini oluşturur. Saptanan bu mikroheterojenitenin nedeninin sializasyon derecesi ile ilgili olduğu ileri sürülmüştür (Hart ve ark., 1991).

Hart ve ark. (25)'nın yaptığı diğer bir çalışmada, ağır BE saptanan 68 olgu ve anne babasında biyotinidaz enziminin özellikleri araştırılmış, spesifik poliklonal anti serum kullanarak, insan biyotinidazına karşı crooss-reacting materyal (CRM) denilen immünolojik yapıda iki protein tanımlanmıştır. Belirgin BE saptanan olgularda yapılan çalışmada CRM'nin varlığına göre 9 biyokimyasal fenotip belirlenmiştir. Belirgin ve kısmi BE gösteren olgularda bu biyokimyasal tiplerin farkı, başlangıç yaşı ve semptomların şiddeti ile ilişkileri gösterilememiştir (Hart ve ark., 1992).

2.1.3. Biyotin metabolizması

Biyotin tüm yaşayan organizmalar için esansiyel, suda eriyen B grubundan bir vitamindir. Çünkü karboksilasyon ve dekarboksilasyonda kofaktör olarak görev alır. Bütün canlıların biyotine gereksinimi olduğu halde sadece bakteriler, maya, küf mantarları ve su yosunları biyotin sentezleme yeteneğine sahiptir (Wolf, 2001). Biyokimyasal olarak 7 karbonlu dikarboksilik asit olan pimelik asitten sentezlenir (Sweetman ve Nyhan, 1986; Wolf ve ark., 1985).



Şekil 2.1. Biyotinin biyo kimyasal yapısı (Wolf ve ark., 1985)

Çizelge 2.1. Biyotin özellikleri

Diğer isimleri	Hexahydro-2-oxo1 H-thieno[3,4-d] imidazole-4-pentanoik acid
(+)- Biyotin	Vitamin B7; Vitamin H
Biyokimyasal formülü	C10H16N2O3S
Molekül ağırlığı	244.32
Ergime noktası	232oC
Çözünürlüğü	Beyaz renkte tozdur. Su ve etanolde çok az çözünür.

İnsan hücresinde 4 biyotin bağımlı karboksilasyon reaksiyonu vardır. Bu reaksiyonlar glukoneogenez, aminoasit katabolizması ve yag asidi sentezindedir. Bu karboksilazlardan üçü mitokondride, biri sitozolde yer alır. Mitokondridekiler pirüvat karboksilaz (PC), propionil Co A karboksilaz (PCC) ve β-metil krotonil Co A

karboksilaz (β-MCC)'dır. Sitozolde yer alan ise asetil Co A karboksilaz (ACC)'dır (Wolf, 2001; Wolf, 1994; Pacheco ve ark., 2002).

Biyotin siklus süresince 3 ayrı proteine bağlanır. Hepatosit içinde siklustaki ilk protein Na bağımlı multivitamin taşıyıcısıdır ki bu protein biyotinin hücre membranından geçişini sağlar (Wolf, 2001; Pacheco ve ark., 2002; Baur ve ark., 2002). İkinci basamağı holokarboksilaz sentaz ile katalizlenir. Bu enzim biyotinin biotinil-5-AMP(B-5-AMP)'ye dönüşümünden sorumludur (Wolf, 2001; Pacheco ve ark., 2002). Son basamakta biyositin, biyotin ve lizin olarak ayrılır. Serbest biyotin ya siklusa yeniden katılır ya da intestinal kanal yoluyla atılır.

2.1.4. Biyotinidaz eksikliğinin tanısı

Biyotinidaz eksikliğinde erken tanı ve tedavi çok önemli olup tanı ve tedavide herhangi bir gecikme nörolojik sekellere ve/veya ölüme sebep olabilir (Rezvani, 2003). Biyotinidaz eksikliğinde hastalığın tanısı plazmada biyotinidaz enzim aktivitesinin kolorimetrik yöntemle ölçülmesi ile konulur. Tam biyotinidaz eksikliği olanlarda normal enzim aktivitesi %10'dan daha azken kısmi biyotinidaz eksikliği olanlarda enzim aktivitesi %10 ile %30 arasındadır. HT2 Biyotinidaz eksikliğinin kesin tanısı serum, lenfositler veya fibroblast kültüründe enzim aktivitesinin yokluğunun gösterilmesine dayanır (Lyon ve ark., 1996). Amniyon hücre kültürü ve koryon villüs hücrelerinde biyotidinaz enzim düzeyi ölçümü ve mutasyon araştırılması da prenatal tanıya olanak sağlar (Pomponio ve ark., 1998).

Biyotinidaz eksikliğinde genotip-enzim aktivitesi ilgileşimi yeterli seviyede yapılamamıştır. Enzim aktivitesi genetik sebepler dışında yaş, prematürite, yenidoğan sarılığı, numunenin taşıma veya depolama sırasındaki sıcaklık düzeyi gibi genetikdışı bir takım faktörlerden de etkilenir. Bu sebeple tanı birden fazla plazma biyotinidaz enzim aktivitesi ölçümüne dayandırılmalıdır. BTD geninin dizi analizinin yapılması tanıyı doğrulamak ve tedaviye zamanında ve uygun şekilde müdahale etmek için kullanılan ilave bir yöntemdir (Canda ve ark., 2018).

2.1.5. Biyotinidaz eksikliğinin değerlendirilmesi

Kan, serum ve idrar örneklerinde biyotin düzeyleri ölçülebilir(tablo 4). Biyotin durumunun değerlendirmesinde, idrar biyotin düzeyi analizinin daha anlamlı olduğu bildirilmektedir. Biyotin eksikliğinde idrarla atılan biyotin miktarı azalırken, 3-hidroksi izovalerik asit atımı artmaktadır (<195 mmol/gün, normal 77-195 mmol/L) (Thoene ve ark., 1998).

Çizelge 2.2. İnsan biyolojik sıvılarında normal biyotin değerleri(Thoene ve ark., 1998)

Biyolojik sıvı	Ortalama	Değişim aralığı
Kan (pg/ml)	485	215-750
Serum (pg/ml)	400	200-700
İdrar(mg/24 saat)	400	6-50

2.1.6. Biyotinidaz eksikliğinde semptomlar

Biyotinidaz eksikliğinin genel popülasyonda taşıyıcılık sıklığı 1:120'dir. Ağır biyotinidaz eksikliğinde semptomlar eksikliğin derecesine göre erken veya geç dönemde ortaya çıkmakta veyahut yaşam boyunca görülmeyebilmektedir (Haagrup ve ark., 1997; Wolf ve ark., 1998; Wolf ve ark., 1997). Biyotinidaz aktivitesi sıfır veya %1'in altında olan bireyler semptom gelişmesi yönünden oldukça yüksek risk grubundadırlar (Kohmanaee ve ark., 2015; Kiykim ve ark., 2015). Enzim aktivitesi %1-10 arası görülen kişilerde semptomların gelişme riski vardır. Enzim aktivitesi %1'in altında olan hastaların çoğunda belirtiler hayatın ilk haftalarından itibaren görülmeye başlamaktadır.

Bazı hastalar tek semptom gösterirken bazıları da birden fazla nörolojik ve deri bulguları göstermektedir. Bebeklerde beslenme güçlüğüyle beraber takipne ve apne gibi solunum sistemi sorunları da olabilir. Hastalarda huzursuzluk, letarji ve hatta koma gelişebilmekte ve bu durum hastanın ölümüyle sonuçlanabilmektedir (Rezvani ve Rosenbaltt, 2004).

BTD genindeki insersiyonlar, delesyonlar veya nonsense mutasyonlar biyotinidaz aktivitesinde genel olarak tam fonksiyon kaybına sebep olmaktadır (Canda ve ark., 2018). Tam biyotinidaz eksikliğinin belirtileri hayatın ilk haftalarından itibaren hayatı tehdit edici şekilde ortaya çıkabilmektedir (Kohmanaee ve ark., 2015). Bununla birlikte genellikle anneden alınan serbest biyotinin yeterli olmasından dolayı yaklaşık 3 aylıkken ortaya çıkar (Shoaib ve ark., 2016). Biyotinidaz eksikliği için klinik bulgular nörolojik, metabolik, solunumsal ve dermatolojik olmak üzere beş kategoriye ayrılabilir (Demirtürk ve ark., 2016). İlave olarak biyotinidaz eksikliği olan çocuklarda düşük T-hücre sayısı sebebiyle kandidiyazis geliştiği ve hastalığın primer immün yetmezliği taklit edebildiği görülmüştür (Shoaib ve ark., 2016; Kiykim ve ark., 2015). Hastalık, beyinde lökoensefalopatiye neden olabilir, ventriküller genişler, BOS'un dolaştığı ekstraserebral alanlarda genişleme ve myelin oluşumunda gecikmeler olur (Grunewald ve ark., 2004). Başlangıçta en sık görülen bulgular, miyoklonik konvülziyon, psikomotor gelişme geriliği, hipotoni, ataksi gibi nörolojik bulgulardır. Karboksilaz aktivitesi olan sinir sistemi hücrelerinin bir kısmı (nöronlar, oligodentroglialar ve keratinositler) biyotine duyarlı hücrelerdir ve bu durumun da klinik bulguların patogenezinde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Stridor, apne ve hiperventilasyon atakları gibi solunum problemleri de sık görülür ve nörolojik kaynaklı olabilir (Sivri ve ark., 2007).

Konvülsiyonlar semptomların görüldüğü hastalarda tek başına veya diğer nörolojik veya deri semptomlarıyla birlikte en sık karşılaşılan başlangıç belirtisi olur. Yapılan bir çalışmada bu durumun hastaların yarısından çoğunda (%55) gözlenmiş olup, %38'inde de başlangıç belirtisi olmuştur.

BOS'ta biyotinidaz aktivitesi özellikle seruma ve diğer dokulara göre çok daha düşük seviyelerde bulunmuştur. Böylece beyinde daha fazla miktarda laktat birikimi olur. Muhtemel olarak bu duruma bağlı olarak nörolojik bulgular daha da erken ortaya çıkmaktadır. Konvülsiyonlar genellikle tonik-klonik veya jeneralize klonik şekilde görülmektedir. Bazen hastalarda infantil spazm veya myoklonik şekilde olur. Hastaların çoğunda EEG bozuk çıkarken, sadece %16'sında normal bulunmuştur

(Salbert ve ark., 1993). Bebeklik dönemini geçmiş olan daha büyük hastalarda ataksi, nörolojik gelişim gecikmesi, sensorinöral işitme kaybı ve optik atrofi gelişebilmektedir (Wolf ve ark., 2002; Rahman ve ark., 1997).

Nörolojik semptomlar; hipotoni, gelişim geriliği, nöbet, ataksi, konvülziyonlar, psikomotor gelişme geriliği duyusal semptomlar; optik atrofi, görme ve işitme kaybı, uyuşukluk gibi problemler metabolik semptomlar; laktik asidoz, hiperamonyemi, organik asidüri solunumsal semptomlar; hiperventilasyon, laringeal stridor, apne, respiratuar distres dermatolojik semptomlar; oral moniliazis, tekrarlayan bebek bezi dermatiti, ekzematöz döküntüler, alopesi, konjonktivit, seboreik dermatit (Demirtürk ve ark., 2016).

Bunların dışında da hepatomegali, splenomegali, beslenme güçlüğü, kusma, ishal, konuşma bozukluğu, koma ve ani bebek ölüm sendromu görülebilir. Biyotinidaz eksikliğinin vücutta ilk önce beyinde ortaya çıktığı, bundan dolayı hastaların kraniyal bulgularla semptomatik hale geldiğine dair yayınlar mevcuttur. Tedavi başlandıktan sonra oluşan hasarın ilerlemesi durur, fakat oluşmuş mevcut hasar tedavi ile düzeltilemez (Suchy ve ark., 1985).

2.1.7. Biyotinizidaz eksikliğinin tedavisi

Hastalarda biyotin tedavisi oldukça faydalı olmaktadır. Özellikle de erken dönemde başlanırsa tüm semptomlar kaybolmakta ve her hangi bir sekel gelişmemektedir. İyileşme çok kısa süre içinde gerçekleşmektedir (Rezvani ve Rosenblatt, 2004; Wolf ve ark., 1985; Salbert ve ark., 1993). Ancak kalıcı zedelenmenin mevcut olduğu hastalarda geri dönüşüm olmamaktadır. Bu nedenden dolayı tanı konan ağır biyotinidaz eksikliği olan tüm hastalara tedavinin hemen başlanması önerilmektedir (Şenses ve ark., 2006; Kavasoğlu ve ark., 2014).

Bu sebeple gelişmiş ülkelerde yenidoğan döneminde hastalığın tarama testi yapılmaktadır. Kısmi biyotinidaz eksikliği olan hastalarda semptom geliştiğine dair pek yayın var olmasa da biyotinin bilinen toksisitesi olmadığından bu kişilere de

miktarı günde 1-10 mg arasında değişmek üzere tedavi önerilmektedir (Rezvani ve Rosenblatt, 2004; Şense ve ark., 2006; Kavasoğlu ve ark., 2014).

Uygun dozda biyotin tedavisiyle (yaklaşık 10-30 mg/gün) tüm olgularda düzelme sağlandığı bildirilmektedir. Tedavi ile konvülzyonlar, hipotoni, deri döküntüleri, allopesi gibi sık görülen belirtiler hızla düzelir. İşitme ve görme bozuklukları ise tedaviye daha dirençlidir. İşitme görme bozuklukları, nöromotor retardasyon tamamen düzeltilemez olsa da ilerlemesi durdurulabilir (Kavasoğlu ve ark., 2014). Tam biyotinidaz eksikliğinin tedavi edilmemesi durumunda meydana gelen optik atrofi, işitme kaybı ve kognitif defisit gibi semptomlar genelde irreversibledir.

2.2. Biyotin Mutasyonu

Biyotinidaz eksikliği, biyotinidaz üretiminden sorumlu BTD (Biyotinidaz) genindeki patojenik mutasyonlardan kaynaklanan, geç başlangıçlı biyotin duyarlı multipl karboksilaz eksikliği olarak da bilinen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır (Strovel ve ark., 2017). BTD geni üçüncü kromozomun kısa kolu (3q25) üzerinde bulunur ve dört ekzon içerir (79 bp, 265 bp, 150 bp ve 1502 bp boyutlarında) 543 amino asit kodlar. İnsanda karaciğer, akciğer, iskelet kası, pankreas, böbrek, beyin, kalp ve plasentada ifade edilir. Bugüne kadar BTD geni tüm ekzon dizi analizi ile 150'nin üzerinde farklı mutasyon tipleri tanımlanmıştır (Canda ve ark., 2018). Bu mutasyonlar insersiyon, delesyon, kriptik yapışma bölgesi oluşma mutasyonu, tek nükleotit insersiyonu ve nokta mutasyonları gibi promotor dur kodonu oluşturan ya da amino asit değişikliklerine sebep olan mutasyonlardır. Gende gelişim gösteren ve düzelmeyen çok sayıdaki farklı mutasyon oluşumu sonucu enzim eksikliği oluşur. Her iki allelde de mevcut olan mutasyon sonucu hastalık ortaya çıkmaktaysada bazı mutasyon tiplerinde belirtiler ömür boyu ortaya çıkmaz. Bazı hastalarda da semptomların görülme zamanı değişkenlik göstermektedir. Heterozigotlarda ise bu hastalık gelişmemektedir. Homozigot veya her iki allelde de farklı mutasyon gösteren bireylerde enzim eksikliği gelişmekte, ancak yine de enzim aktivitesi değişkenlik gösterebilmektedir (Kavasoğlu ve ark., 2014).

Semptomları gösteren hastaların hemen yarısında en az bir allelde G98:d7i3 (7 baz delesyonu/3 baz insersiyonu) mutasyonu belirlenmiştir. Bu mutasyondan sonra da en sık R538C nokta mutasyonu tespit edilen bozukluktur. Yapılan yenidoğan taramalarında da en sık tespit edilen mutasyonlar Q456H missens mutasyonu ile A171T:D444H çift mutasyonu olmuştur (Şenses ve ark., 2006; Kavasoğlu ve ark., 2014). D444H ise ağır biyotinidaz eksikliği mutasyonu değildir çünkü bu mutasyonun homozigotluğunda enzim aktivitesi %50 civarındadır. Ağır eksiklik mutasyonlarının heterozigotluğuna benzer. Ayrıca bir allelde ağır eksiklik mutasyonu taşıyıp, diğer allelde D444H mutasyonu taşıyanlarda da %20-25 civarında enzim aktivitesi görülülmüş olup kısmi biyotinidaz eksikliği gelişir. Aynı şekilde ülkemizden yapılan bir çalışmada da semptomların görüldüğü vakalarda G98:d7i3, yenidoğan tarama grubunda da T532M sık karşılaşılan mutasyonlar olmuştur (Morglava ve ark., 1994).

Bunların yanı sıra literatüre göre p.Cys186Tyr, p.Gln456His ciddi biyotinidaz eksikliği ile, p.Asp444His ise parsiyel biyotinidaz eksikliği ile ilişkilidir (Canda ve ark., 2018; Wolf ve ark., 1985).

ABD'nde semptomatik bulguları olan çocukların %35'inde en sık saptanan mutasyon c.98-104del7ins3 olarak bildirilmiştir. Neonatal taramalarda ciddi biyotinidaz eksikliği olan çocukların %52'sinde özellikle üç mutasyonun sık görüldüğü bildirilmiştir. Bu mutasyonlar, Q456H, A171T;D444H, D252G (sırasıyla %27,9, %17,3, %6,7)'dir. Hedeflenmiş mutasyon analizinde p.Cys33Phefs*36 (p.C33Ffs*36), p.Gln456His (p.Q456H), p.Arg538Cys (p.R538C), p.Asp444His (p.D444H), p.[Ala171Thr;Asp444His] (p.a171T; D444H) mutasyonlarına bakılarak biyotinidaz eksikliğinden şüphelenilen olguların yaklaşık %60'ına tanı konulabilmektedir. Türkiye'de ise R157H mutasyonunun %27 oranında olduğunu gösteren bir çalışmanın yanı sıra; R79C, c.98-104del7ins3, T532M, Q456H ve A171T:D444H mutasyonlarının da Türkiye'de görüldüğünü belirten çalışmalar vardır. Genotip-fenotip ilgileşimi, aynı aile içinde aynı mutasyon için bile zor tespit edilmektedir. Çünkü bazı ciddi biyotinidaz eksikliği olan çocuklar geç çocukluk ya da adölesan döneme dek belirti vermezken, aynı mutasyona sahip bazı çocuklar

erken çocukluk döneminde bulgu verebilmektedirler. Ancak D444H mutasyonunun parsiyel biyotinidaz eksikliğine yol açabileceği, trans pozisyonda bir başka mutasyonla birlikte olması durumunda ciddi biyotinidaz eksikliğine yol açabileceği bildirilmektedir. Ayrıca Avrupa'da en sık görülen mutasyonun da D444H mutasyonu olduğu bilinmektedir. BTD gen mutasyonlarının aynı allelde birden fazla olması nedeniyle ebeveynlerde de çalışmanın önemi dikkat çekmektedir (Kavasoğlu ve ark., 2014; Morglava ve ark., 1994).

2.3. Biyotinidaz Eksikliğinin Hastalık Taraması

Bir hastalığın erken taranması ve tedavisi fikri esasen çok basittir. Fakat bunun başarılı bir şekilde yürütülmesi, yani bir yandan daha önceden saptanmamış bir hastalığı olanlara tedavi başlatıp, diğer yandan tedaviye ihtiyaç duymayan gruba zarar gelmesinin önlenmesi bazen fevkalede zor olabilmektedir (Bakor, 2012).

Etkin bir yenidoğan tarama sistemi, tarama kanının alınmasının yanısıra dört ek bileşene de ihtiyaç duyar: Sonuçların takibi, tanının kesinleştirilmesi, uygun merkezlere gönderilerek tedavinin planlanması ve bütün tarama sisteminin aralıklı olarak değerlendirilerek programdaki ekibin eğitimidir (Bakor, 2012).

Yenidoğan taraması; bebeklerin tedavi edilebilir endokrinolojik, genetik, metabolik ve hematolojik hastalıklar açısından test edilerek bu hastalıkların erken saptanmasını, ve böylece gelişebilecek mortalite ve morbiditenin önlenmesini amaçlayan ve sağlayan önemli bir halk sağlığı programıdır. Taranan hastalıkların çoğu yaşamın ilk iki haftası içinde ortaya çıkar ve erken saptanıp tedaviye başlanmadığı takdirde metabolik asidoz, nöbet, koma, nörolojik bozukluk, hatta ölüme yol açar. Ancak hayatın ilk iki haftası içinde tarama programları ile erken tanınıp diyet, hormon veya diğer medikal tedaviler başlandığında bu bireyler daha iyi bir yaşam kalitesine sahip olurlar (Bakor, 2012).

Dünyada biyotinidaz eksikliği hastalığının en sık görüldüğü ülkelerden biri Türkiye'dir. Biyotinidaz eksikliği insidansı Dünyada 1:60.000 iken Türkiye'de

1:14.800 olup, Dünya ortalamasının 8 kat üzerindedir. Tanı, klinik şüphenin varlığıyla birlikte düşük enzim aktivitesi ve genetik mutasyon tespiti ile konur (Demirtürk ve ark., 2016). Biyotinidaz eksikliğinin 1983 yılında tanımlanmasından sonra biyotinidaz aktivitesini ölçmek için hızlı bir kolorimetrik yöntem geliştirilmiştir (Demirtürk ve ark., 2016). Türkiye'de biyotinidaz eksikliğinin 2008'de yenidoğan tarama programına dahil edilmesiyle birlikte koyulan tanı sayısı zamanla artış göstermiştir.

Biyotinidaz eksikliği, Avrupa ülkelerine göre Türkiye'de yüksek akraba evliliklerinden dolayı daha sık görülmektedir (1/11,614). Biyotinidaz eksikliği olan hastaların ebeveyn akrabalık oranı %52 olarak bulunmuştur. Biyotinidaz eksikliği erken tanı ile tedavinin mümkün olması ve sık görülmesi sebebi ile yenidoğan tarama programı içerisindedir (Kavasoğlu ver ark., 2014)

2.4. Protein S-100B

1965'te Moore (Calabro ve ark., 2004) sığır beyninden sinir sistemine spesifik olduğunu düşündüğü proteini izole etmiş ve bu fraksiyon nötral pH'ta satüre amonyum sülfata %100 çözündüğünden S100 olarak isimlendirilmiştir (Shoaban ve ark., 2000; Zimmer ve ark., 1995). S-100 insan melanoma hücre dizilerinde 1980'de saptanmıştır (Kaskel ve ark., 1999).

2.4.1. S-100 proteinin yapısı ve metabolizması

Kromozomun 21. uzun kolunda S-100B lokalizedir. S-100 proteini asidik kalsiyum bağlayan bir proteindir. Temelde beynin gri cevherinde özellikle astrosit ve schwann hücrelerinde bulunur. Protein birkaç heterodimerik ve homo formda mevcut bulunmaktadır. İki alt ünitesi α (MW: 10,4 kDa) ve β (MW: 10,5 kDa) 'dır. S-100 β izoformu 21 kDa'luk homodimer β-β olarak bulunmuştur. Her bir S-100 β alt birimi heliks– loop – heliks Ca^{2} bağlama motifi içermektedir (Judith ve David, 1997). S-100 asidik Ca^{2} bağlayan bir protein olmakla beraber S-100 proteinlerinin Zn'ye affinitesi olduğu gösterilmiştir S-100 β β dimerinin 4 Cu^{2} bağlayabileceği belirtilmiş (Beat ve

ark., 2000; Groves ve ark., 1998). Proteini böbrekte yıkılıp idrarla atılmaktadır. S-100 eliminasyonunun β-2 mikroglobuline benzer şekilde olduğu kabul edilmektedir (Heizmann, 1999).

2.4.2. S-100 proteinlerinin fonksiyonu

Hücre içi yerleşimi nedeniyle S-100 proteininin büyük çoğunlukla (tam olarak bilinmemekle birlikte) Ca^{2} reseptör proteini olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir. Zimmer ve ark. S-100'ün hücre içi iletişim, büyüme, hücre yapısı, enerji metabolizması gibi çeşitli süreçleri düzenlediğini ileri sürmüşlerdir.

Son yıllarda S-100'den nörotropik sitokin olarak bahsedilmektedir. S-100 proteini glial proliferasyon, aksonal büyüme ve Ca^{2} hemostazisi ile ilgili bulunmuştur (Fano ve ark., 1993; Hunter ve ark., 1998). S-100β uygulamasıyla yapılan tedavinin sıçanlarda, doğumda siyatik sinir kesisi sonrasında motor nöron ölümünü önlediği ve lezyonlu tarafın motor nöron çapını koruduğu görülmüştür. S-100β bu sonuçlara göre motor nöronlar için nörotopik faktör olduğu belirtilmiştir. S-100β'nın hasarlı motor nöron bozukluklarında tedavi edici özelliği olabileceği belirtilmiştir (Waski ve ark., 1997). S-100'ün öğrenme ve hafızada rol oynayabileceği hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Shoaban ve ark., 2000).

2.4.3. S-100'ün saptandığı dokular

Protein ailesinin 18 üye içerdiği gösterilmiş olan S-100'un aminoasit dizi homolojisi ve benzer yapısal özelliklerden kaynaklanmaktadır. S-100 proteini α veya β alt birim konfigürasyonuna bağlı çeşitli formlarda bulunabilmektedir. Beyne spesifik olan β alt birimidir (Shoaban ve ark., 2000; Heizmann, 1999). Alt birimlere göre incelendiğinde; S-100 αα izoformu böbrek, iskelet kası, kalpte S-100 αβ izoformu melanositler ve glial hücrelerde S-100 β izoformu schwan hücreleri, gliyal hücreler, Langerhans hücrelerinde bulunduğu gösterilmiştir (Büttner ve ark., 1997; Kaskel ve ark., 1999).

2.4.4. S-100 düzeyinde fizyolojik değişiklikler

Nörolojik lezyonlu hastalarda nöron spesifik enolaz, myelin basic protein (MBP), S- 100 düzeylerinin SSS'de hücre hasarının derecesi ile proteinlerinin konsantrasyonu arasında kantitatif bir ilişki olduğu Beyin omurilik sıvısındaki çalışmalarda gösterilmiştir (Lamers ve ark., 1995; Oystein ve ark., 1997). İnsanlarda yapılan çalışmada 1-66 yaşları arasındaki 79 örnek, referans aralığı oluşturmak amacıyla incelendiğinde NSE, MBP, S100'de yaşla orantılı benzer bir artış saptanmıştır (Yılda %1 kadar). Nörolojik hastalıklarda SSS'ne spesifik proteinler değerlendirildiğinde yaşa göre referans değerlerinin kullanılmasının gerektiği bildirilmektedir (Engelen ve ark., 1992).

Beyin omurilik sıvısıdaki S-100 proteini geçmişte nörolojik bozukluk hikayesi olmayan hastalarda erkek ve kadınlar arasında anlamlı fark saptanmış ve daha yüksek değerlerin erkeklerde ölçüldüğü gösterilmiştir (Oystein ve ark., 1997; Engelen ve ark., 1992). Beyin omurilik sıvısında yaşla ilişkili S100 artışının birkaç açıklaması olabilir.

1- Yaşlılıkta azalan BOS akımına bağlı yarı ömrün artışı
2- Yaşa bağlı hücrelerdeki düzeyinin artışına rağmen hücre turnover sayısının sabit kalışı
3- Yaşa bağlı myelin kaybının artışı
4- Farklı nörolojik hastalıklı olgularda BOS'da S100 değerleri incelendiğinde hem cinsiyet hem de yaşı göz önüne almanın önemi vurgulanmaktadır (Oystein ve ark., 1997).

2.4.5. S-100 düzeyinde patolojik değişiklikler

S-100 düzeyinde artışa neden olabilen patolojik durumlar Tablo 15'te verilmiştir (Oystein ve ark., 1997).

Çizelge 2.3. S-100 düzeyinde artışa neden olabilen patolojik durumlar

1. Kardiyopulmoner bypass sonrası
2. Alzheimer hastalığı
3. Down sendromu
4. Multipl skleroz
5. Kardiyak arrest sonrası
6. Minör ve majör kafa travması
7. İntrakranial tümörler
8. Akut ensefalomyelit
9. Menenjit
10. Subaraknoid kanama
11. İskemik inme
12. İntraserebral kanama
13. Jakob- Creutzfeldt hastalığı
14. Parkinson hastalığı
15. Entoksikasyon
16. Multipl myelom
17. Majör depresyon
18. Myokard infarktüsü

Tanısal ve prognostik değeri kardiyak arrest ve kardiyopulmoner bypass sonrası S-100'ün, minör ve majör kafa travmaları, iskemik inme ve Jakop-Creutzfeldt hastalığı dışındaki patolojik durumlarda iyi incelenmemiştir. Çalışmalarda daha çok BOS düzeylerinin incelendiği görülmektedir (Heizmann, 1999; Kaskel ve ark., 1999; Oystein ve ark., 1997; Schmidh, 1998; Rosen ve ark., 1998).

Proteini periferik kanda ilk defa 1995'te 126 melanomlu hastada incelenmiş ve hastaların periferik kanında hastalık ilerleyişinin bir ölçüsü olarak S100 düzeyleri (analizde αβ, ββ dimerleri ölçülmüş) saptanabilmiştir (Kaskel ve ark.,).

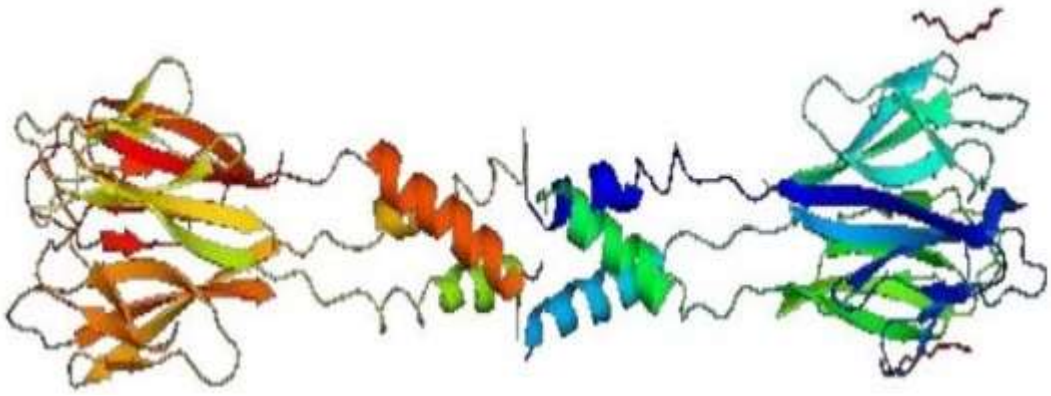
Ekspresyonundaki artış Down sendromlu ve Alzheimer hastalarında plak oluşumunda patolojik faktör olarak S-100β gösterilmiştir (Yuekuj ve ark., 2000). S-100β'nın Down sendromlu çocuklarda serum ve BOS artışı kan-beyin bariyeri geçirgenliğinde artış ve 21.kromozomun duplikasyonuyla ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Lindberg ve ark., 1998). Astrositler, mikroglial hücreler ve nöronlarda hasarla ilişkili uyarıya cevap olarak interlökin-6 (IL6) sentezlenebilmektedir (Frei ve ark.,ü 1989; Schobitz ve ark., 1992). Alzheimer hastalarının beyninde nörotropik sitokin, S-100 protein ve IL-6 yüksek düzeyde saptanmıştır (Yuekuj ve ark., 2000). S-100 protein IL-6 salınımını uyarabilmektedir.

PCR ve genomik DNA kütüphanelerinin kullanarak orfan G protein reseptörler ailesinden sıçan GPR14 adlandırılan bir reseptör keşfedilmiştir. Somatostatin reseptör SSTR4 dizisini karşlaştığında, GPR14 27% toplam homolog benzerlikleri tespit edilmiştir. Transmembran alanlarda 41% de homolog benzerlikleri gösterilmiştir. Sonrasında, orfan GPR14 işlevsel rölü keşfedilmiştir. İnsan 389 amino asit olan reseptör % 75 ile sıçan GPR14 benzerlik tanımlanmıştır. İnsan UT-II bu reseptöre yüksek afinite ile bağlanır, fosfolipaz yoluyla stimüle ederken hücre içi kalsiyum mobilizasyonuna neden olur. Sağlıklı bir insanda, vasküler tonunun bir regülatörü olarak davranır.

2.5. Resistin (RETN)

Yağ dokusundan salgılanan adipositokinler kronik hastalıklar ve inflamasyonla ilişkilidir (Wozniak ve ark., 2009). Resistin, 2001 yılında anti diyabetik ilaç olan thiazolidinedion mekanizması araştırılırken saptanmıştır. Resistin iki bağımsız grubun aynı zamanda calışmaları sonucu elde edilmiştir. Steppan ve grubu,1998'de, FIZZ1 olarak resistin benzeri proteinin ayırımını yapmıştır (Steppan ve Lazar, 2002). 2000 yılında Holcomb ve arkadaşları resistini FIZZ3 olarak akciğer inflamasyonu ile ilgili bir protein olarak saptamışlardır. Uluslararası komite tarafından resistin adı; resistin, FIZZ3, ADSF, RELM, FIZZ1, Retn1, adipofilin adları arasından, insülin direncindeki rolü nedeniyle, seçilmiştir (Seow ve ark., 2004).

Resistin, resistin like molecules (RELM) denilen bir protein ailesine aittir. Bu ailenin karakteristik özelliği C-terminal ucunda sisteinden zengin bir segment olmasıdır. Resistin geni 19. kromozomda kodlanmaktadır. Fare yağ hücresinde yaklaşık 12,5 kDa ağırlığında ve 114 amino asitten oluşur (46). İnsanlarda resistin, 108 amino asitten oluşan ve molekül ağırlığı 12,5 kDA olan bir polipeptittir (Patel ve ark., 2004).



Şekil 2.2 . Resistin molekülünün görünümü (PDB, 2018) PDB. (2018). https://www.wpdb.org/

İnsanlarda 108 aminoasit rat ve farelerde 114 aminoasitten oluşan polipeptid yapıda bir hormondur. İnsanlarda, kemik iliği ve periferal mononükleer hücrelerden yüksek miktarda resistin üretilmekte ve salınmaktadır (Patel ve ark., 2004). Ayrıca

daha düşük oranda akciğer (Patel ve ark., 2004), plasental doku (Yura ve ark., 2003) ve pankreas beta hücrelerinden de eksprese edilmektedir (Minn ve ark., 2003).

İnsülin direnci olan hayvan modellerinde resistin ekspresyonunun arttığı görülmüştür, bu bulgu obezite ve insülin direnci gelişiminde resistinin potansiyel bir rol oynadığını düşündürmektedir (Rea ve Donnelly, 2004). Resistin farede en yüksek miktarda dişi gonadal yağ dokusunda ve erkek epididimal beyaz yağ dokusunda bulunur. Obezitenin derecesi ile yağ hücresi resistin mRNA miktarı arasında korelasyon saptanmıştır (Steppan ve Lazar , 2002).

Resistinin glukoz metabolizmasına etkili insülin antogonisti gibi calışan hormon olarak görev yaptığı sanılmaktadır. Reseptörü henüz bilinmediğinden hedef hücreler ve dokular saptanamamıştır. Fakat karaciğer ve kaslar hedef organ olabilir (Ling ve ark., 2001).

Resistin salgılanması ve dengesi, hormonlar ve beslenme ile ilişkili bulunmuştur. Açlık durumunda resistin seviyesi düşüktür, beslenme sonrası ise yeniden depolanır (Seo ve ark., 2003). Hiperglisemi resistin ekspresyonunu arttırırken insülin benzeri büyüme faktörleri resistin ekspresyonunu baskılar (Chen ve ark., 2005). Resistin doku seviyesi insülin, TNF – α, endotelin-1 ve deksametazon ile azalır. Büyüme hormonlarının, gonadal hormonların ve DHEA'nın artısı, hiperglisemi, erkek cinsiyet, IL-6 gibi bazı proinflamatuvar sitokinler ve lipopolisakkaritler ile artar. Moleküler düzeyde retinoik asidin resistin gen ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu da resistin düzenlenmesinde baskılayıcı bir yolak olduğunu düşündürmektedir (Koerner ve ark., 2005). Diyabetik hastalarda yapılan çalısmalarda da resistinin inflamatuvar belirteçler ile ilişkisi gösterilmis hatta kardiyovasküler hastalık için belirleyici olduğu belirtilmiştir (Chen ve ark., 2005).

Resistinin insanlarda yağ dokusundaki makrofajlardan salgılanması inflamasyonla ilişkisinin diğer adipositokinlere göre daha fazla olabileceğini düşündürmüştür (Stofkova, 2010). Hücresel seviyede resistinin, proinflamatuvar sitokinleri aktive ederek güçlü pro-inflamatuvar etki oluşturduğu gösterilmiştir. Bu

inflamatuvar uyarımın yanında, insan düz kas hücrelerinin ve endotel hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonuna öncülük eder ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarır (Calabro ve ark., 2004). Fonksiyonel olarak resistinin damar genişlemesini azalttığı gösterilmiştir. Bu etki endotel hücrelerinde eNOS ekspresyonunu azaltarak endotel bağımlı olabileceği gibi endotel bağımsız da olabilir. Tüm bu bulgular resistinin ateroskleroz ile direkt ilişkili olduğunu göstermektedir (Verma ve ark., 2003).

İnsanlarda yapılan resistin ile ilgili çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar bildirilmektedir. Çok sayıda epidemiyolojik çalışmaya rağmen, insanlarda, yağdokusu ile rezistin ekspresyonu arasında veya dolaşımdaki resistin düzeyleri ile insülin direnci arasında net ve tutarlı bir ilişki tespit edilememiştir (Banerjec ve Lazar, 2003).

2.6. Nöropeptitler

Afferent nöron liflerinin periferal enflamatuar süreçleri düzenlemeye katılımı tıbbi literatürde geniş bir şekilde bildirilmiştir. Bir asırdan daha uzun bir süre önce bu liflerin uyarılmasının vazodilatasyona ve ardından ödeme neden olduğu gösterilmiştir (Bayliss 1901). Nörojenik enflamasyon terimi, periferik nöronlara gelen uyaranın yaralanma bölgesinde vasküler geçirgenlik ve vazodilatasyon dahil olmak üzere birçok işlemi değiştiren nöropeptitlerin salınımını sağladığı (Richardson ve Vasko 2002, De Swert ve Joos 2006) bir enflamasyon bileşenini tarif etmek için 20 geliştirilmiştir. Duyusal nöronların uyarılmasının vazodilatasyon, plazma ekstravazasyonu ve aşırı duyarlılık sağladığı ilk gözlemlerden bu yana, nörojenik enflamasyonun etiyolojisini anlamada büyük ilerleme kaydedilmiştir.

Nöropeptitler, peptit nörotransmitterleri veya nöromodülatörleri olarak tanımlanır. Bu tanım, nöropeptitlerin nöronlardan sentezlendiklerini ve serbest bırakıldıklarını, hedef hücrelerin plazma zarı üzerinde bulunan reseptörleri aktive ederek biyolojik etkileri tetiklediklerini anlatmaktadır (Hoyle 1996). Nöropeptitler, en büyük nörotransmitter/nöromodülatör sınıfını temsil eder (Holmgren ve Jensen

2001). Nöropeptitler, insan vücudunun tamamına yayılmıştır; merkezi sinir sisteminden periferik sinir sistemine kadar hem otonomik hem de somatosensör nöronlar dahil olmak üzere sinir sisteminin her dalında mevcuttur (Fallgren ve ark. 1989, Edvinsson ve ark. 1998). Çoklu ve değişken fonksiyonlara sahiptirler çünkü nörotransmitterler, büyüme faktörleri, hormonlar ve bağışıklık sistemi sinyal molekülleri gibi davranabilirler. Bu nedenle, genel olarak sinir sisteminin, periferal enflamasyonun patofizyolojisine katkıda bulunduğu kabul edilir ve bir nörojenik bileşen, periodontitis ve pulpitis gibi oral hastalıklar da dahil olmak üzere birçok enflamatuar hastalığa dahil edilmiştir (Lundy ve Linden 2004).

Doku yaralanması, kompleman sistem aktivasyonu, bakteriyel, viral ve immünolojik herhangi bir uyaran nöropeptit serbestleşmesine neden olabilmektedir. Nöropeptit serbestleşmesiyle vazodilatasyon, kapillerlerden interkapiller bölgeye sıvı akışı, makrofajlar, mast hücreleri ve lenfositler gibi immün sistem hücrelerin düzenlenmesi gibi değişimler meydana gelir (Caviedes-Bucheli ve ark., 2008).

Nöropeptitlerin pulpitis ve diş ağrı mekanizmasında da önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (El Karim ve ark., 2006; Linden ve ark., 2009). Ümmüno histokimyasal ve radioimmunoassay (RIA) yöntemleriyle 60‘tan fazla nöropeptit tanımlanmışken pulpada günümüze kadar 5 adet nöropeptit belirlenebilmiştir (Caviedes-Bucheli ve ark., 2008).

Çizelge 2.4. Pulpada ilk saptanan nöropeptit SP‘dir (Olgart ve ark., 1977).

Pulpada Bulunan Nöropeptitler
Substance P
Nörokinin A
Calcitonin Gene-Related Protein
Nöropeptit Y
Vazoaktif İntestinal Peptit

2.6.1. Nörokinin A (NKA)

Taykinin ailesinden 13 aminoasitlik bir peptittir. Reseptörleri NK1, NK2 ve NK3 olmak üzere SP ile aynıdır; dolayısıyla SP‘nin salınmasına neden olan stimülasyonlar NKA‘nın da salınımını arttırır.

NKA glandüler sekresyonda artış, vazodilatasyon ve plazmanın kapiller dışına çıkmasında etkilidir (Geenen ve Chrousos 2004). SP ve NKA, orta ile şiddetli ağrı sinyallerinin oluşumu ve transferinde ana nörotransmitterlerdir (Awawdeh ve ark., 2002). Çalışmalar pulpal ağrıda CGRP, NKA ve SP'nin arttığını göstermektedir (Caviedes-Bucheli ve ark., 2004, Sattari ve ark., 2010, Heidari ve ark., 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinin Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 07.06.2018 tarih, 06 nolu oturum ve 05-06-07 nolu onay numarası ile onay alındıktan sonra çalışmaya başlandı.

3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çizelge 3.1. Demografik bilgiler

Grup	Cinsiyet	Yaş (aylık)	Biyotinidaz Aktivitesi %
Kontrol	Erkek (n=18)	20 ± 2,5	81 ± 10,2
	Kız (n=12)	19 ± 2,8	75 ± 9,54
Hasta			
	Erkek (n=16)	19 ± 3,7	9,3 ±3,4
	Kız (n=14)	18,5 ± 3,4	9,02 ± 2,1

Çalışmada biyotinidaz eksikliği olan 16 erkek, 14 kız çocuğu ile kontrol gurubunda 18 erkek ve 12 kız çocuğu dahil edildi. Kontrol gurubunun biyotinidaz aktivitesi ortalaması % 78 iken hasta grupta % 9,16 olarak tespit edildi. Hasta ve kontrol gurubunun yaş aralığında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

3.1.1. Kan serumunun eldesi

Jelli biyokimya tüpünden steril tüplere konuldu. Kan alınan tüp hemen buz dolu kabın içine aktarılarak laboratuvara ulaştırıldı. Daha sonra steril tüp 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant kısım olan plazma ependorf tüpe alınarak çalışılmak üzere -80 de saklandı. Ayrılan plazmalardan nörokinin a (NKA), resistin (RETN), protein s100b (S100B) çalışmak üzere –80 ^{o}C'de saklandı.

3.1.2. Kullanılan cihaz ve malzemeler

Çalışmamızda Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya AR-GE Laboratuvarında kullanılan cihazlardan yararlanıp çalışılmıştır.

1-Santrifüj (Hettich Universal 30 RF)
2-Spektroflorometre (Thermo Fısher Scıentıfıc, Fınland)
3- Derin dondurucu -80 ^{o}C (Thermo)
4- Vorteks (Nüve, NM 110 model, Türkiye)
5- Otomatik biyokimya analizörü (Aeroset, USA)
6-Mikroplate Washer (BIORAD, Fransa)
7-Mıcrı santfirüj (ISOLAB)
8-Etüv (Memmert, Germany)
9-1000, 100, 10 µl'lik pipet makinesi (Brand marka)
10-300 ve 50 µl'lik çoklu pipet makinesi (Brand marka)

3.2. Yöntem

3.2.1. Nörokinin A (NK A) tayini

NKA düzeyi immünokimyasal bir metod olan yarışmalı enzim immünoassay yöntemi ile çalışıldı. Bunun için ticari ELISA kiti (Fine Test Catalogue No: EH3426) kullanıldı.

Testin Prensibi: Bu kit, sandviç enzime bağlı immün-sorbent tahlil teknolojisine dayanıyor. Anti-NKA antikoru, 96 kuyucuklu plakalara önceden kaplanmıştır. Biyotin konjuge anti-NKA antikoru tespit antikorları olarak kullanıldı. Standartlar, test örnekleri ve biyotin konjuge algılama antikoru daha sonra kuyucuklara ilave edildi ve yıkama tamponu ile yıkandı. HRP-Streptavidin (SABC) eklendi ve bağlanmayan konjugatlar yıkama tamponuyla yıkandı. HRP enzimatik reaksiyonunu görselleştirmek için tetra metil benzidin (TMB) substratları kullanıldı. TMB, asidik durdurma çözeltisi ilave edildikten sonra sarıya dönüşen mavi renkli ürün üretmek için HRP ile katalize edildi. Sarı yoğunluğu plakada yakalanan NKA

miktarındaki numune ile orantılıdır. Mikroplaka okuyucusunda 450 nm'de absorbans ve daha sonra NKA konsantrasyonu hesaplanır.

Yıkama tamponunun hazırlanması:

Deiyonize veya distile su ile 750 ml yıkama tamponuna 30 ml konsantre yıkama tamponunu eklendi.

Standart hazırlanması:

- 10 ng/ml standart çözelti: Bir Standart tüpe 1 ml Örnek/Standart seyreltme tamponu eklendi, tüpü 10 dakika oda sıcaklığında tutup ve iyice karıştırdık.
- Daha sonra seri dilüsyon yapıldı ve standart konstrasyonları yapıldı.

Biyotin antikoru çalışma çözeltisinin hazırlanması:

Deneyden 1 saat önce hazırlanır.

- Çalışma çözeltisinin toplam hacmini hesaplayıp: 0.1 ml/kuyucuk × kuyucuk miktarı hesaplandı (Toplam hacimden 0.1-0.2 ml daha fazla bekleyin).
- Biyotin-tespit antikorunu antikor seyreltme tamponu ile 1: 100 oranında seyreltip iyice karıştırdık (yani 99 ul antikor seyreltme tamponu içine 1 ul Biyotin saptama antikoru ekledik.)
-

HRP-Streptavidin Konjugat (SABC) çalışma çözeltisinin hazırlanması:

Deneyden önce 30 dakika içinde hazırlayın.

- Çalışma çözeltisinin toplam hacmini hesaplayıp 0.1 ml/kuyucuk × kuyucuk miktarı hesaplandı (Toplam hacimden 0.1-0.2 ml daha fazla bekleyin).
- SABC'yi SABC seyreltme tamponu ile 1:100'de seyreltip ve iyice karıştırdık (yani 99 ul SABC seyreltme tamponu içine 1 ul SABC ekledik).

Testin prosedürü;

Kuyucuklara eklemeden önce SABC çalışma çözeltisini ve TMB substratını en az 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler ve reaktifleri eşit bir şekilde seyrelttik.

- Önceden kaplanmış plaka üzerinde standart, test örneği ve kontrol (sıfır) kuyucuklarını ayarladık ve sonra konumlarını kaydettik. Standart, numune ve kontrol (sıfır) kuyuları eklemeden önce plate 2 kez yıkadık.
- 0.1ng 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml, 0.3125ng/ml, 0.156ng/ml konstrasyonlarındaki standartlardan ve serumlardan 100 µl eklendi.
- Blank kuyucuğuna Sample/Standard dilüsyondan 100 µl ekledik.
- Plate kapatalıp 37 ° C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi.
- Kapağı çıkarıp ve plate içeriğini atıp, plakayı emici filtre kağıtları veya diğer emici malzemeler üzerine çırptık.
- Daha sonra kuyucukların her birine 100 µl Biotin saptama antikor çalışma çözeltisi ekledik. (standart, test örneği ve sıfır kuyucuklar).
- Plate kapatılıp 37 ° C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi.
- Kapağı çıkarıp plate 3 kez Yıkama tamponu ile yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 100 µl SABC çalışma çözeltisi eklendi ve plate kapatılıp, 37 ° C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi
- Plate 5 kez yıkama tamponuyla yıkandı ve her seferinde yıkama tamponunu kuyucuklarda 1-2 dakika beklettik.
- Her bir kuyucuğa 90 µl TMB substratı eklenip, 15-30 dakika içinde karanlıkta 37 ° C'de inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi ve iyice karıştırıldı. Renk hemen sarıya döner.

Stop çözeltisi eklendikten hemen sonra bir mikroplaka okuyucu içinde 450 nm'de absorbans değerleri alındı.

3.2.2. Resistin (RETN) tayini

RETN düzeyi immünokimyasal bir metod olan yarışmalı enzim immünoassay yöntemi ile çalışıldı. Bunun için ticari ELISA kiti (Fine Test Catalogue No: EH0269) kullanıldı.

Testin Prensibi: Bu kit, sandviç enzime bağlı immün-sorbent tahlil teknolojisine dayanıyor. Anti-RETN antikoru, 96 kuyucuklu plakalara önceden kaplanmıştır. Biyotin konjuge anti-RETN antikoru tespit antikorları olarak kullanıldı. Standartlar, test örnekleri ve biotin konjuge algılama antikoru daha sonra kuyucuklara ilave edildi ve yıkama tamponu ile yıkandı. HRP-Streptavidin (SABC) eklendi ve bağlanmayan konjugatlar yıkama tamponuyla yıkandı. HRP enzimatik reaksiyonunu görselleştirmek için tetra metil benzidin (TMB) substratları kullanıldı. TMB, asidik durdurma çözeltisi ilave edildikten sonra sarıya dönüşen mavi renkli ürün üretmek için HRP ile katalize edildi. Sarı yoğunluğu plakada yakalanan RETN miktarındaki numune ile orantılıdır. Mikroplaka okuyucusunda 450 nm'de absorbans ve daha sonra RETN konsantrasyonu hesaplanır.

Yıkama tamponunun hazırlanması:

Deiyonize veya distile su ile 750 ml yıkama tamponuna 30 ml konsantre yıkama tamponunu eklendi.

Standart hazırlanması:

- 10 ng/ml standart çözelti: Bir Standart tüpe 1 ml Örnek/Standart seyreltme tamponu eklendi, tüpü 10 dakika oda sıcaklığında tutup ve iyice karıştırdık.
- Daha sonra seri dilüsyon yapıldı ve standart konstrasyonları yapıldı.

Biyotin antikoru çalışma çözeltisinin hazırlanması:

Deneyden 1 saat önce hazırlanır.

- Çalışma çözeltisinin toplam hacmini hesaplayıp: 0.1 ml/kuyucuk × kuyucuk miktarı hesaplandı (Toplam hacimden 0.1-0.2 ml daha fazla bekleyin).
- Biyotin-tespit antikorunu antikor seyreltme tamponu ile 1: 100 oranında seyreltip iyice karıştırdık (yani 99 ul antikor seyreltme tamponu içine 1 ul Biyotin saptama antikoru ekledik.)

HRP-Streptavidin Konjugat (SABC) çalışma çözeltisinin hazırlanması:

Deneyden önce 30 dakika içinde hazırlayın.

- Çalışma çözeltisinin toplam hacmini hesaplayıp 0.1 ml/kuyucuk × kuyucuk miktarı hesaplandı (Toplam hacimden 0.1-0.2 ml daha fazla bekleyin).
- SABC'yi SABC seyreltme tamponu ile 1:100'de seyreltip ve iyice karıştırdık (yani 99 ul SABC seyreltme tamponu içine 1 ul SABC ekledik).

Testin prosedürü;

Kuyucuklara eklemeden önce SABC çalışma çözeltisini ve TMB substratını en az 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler ve reaktifleri eşit bir şekilde seyrelttik.

- Önceden kaplanmış plaka üzerinde standart, test örneği ve kontrol (sıfır) kuyucuklarını ayarladık ve sonra konumlarını kaydettik. Standart, numune ve kontrol (sıfır) kuyuları eklemeden önce plate 2 kez yıkadık.
- 0.1ng 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml, 0.3125ng/ml, 0.156ng/ml konstrasyonlarındaki standartlardan ve serumlardan 100 µl eklendi.
- Blank kuyucuğuna Sample/Standard dilüsyondan 100 µl ekledik.
- Plate kapatalıp 37 ° C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi.
- Kapağı çıkarıp ve plate içeriğini atıp, plakayı emici filtre kağıtları veya diğer emici malzemeler üzerine çırptık.

- Daha sonra kuyucukların her birine 100 µl Biotin saptama antikor çalışma çözeltisi ekledik. (standart, test örneği ve sıfır kuyucuklar).
- Plate kapatılıp 37 ° C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi.
- Kapağı çıkarıp plate 3 kez Yıkama tamponu ile yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 100 µl SABC çalışma çözeltisi eklendi ve plate kapatılıp, 37 ° C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi
- Plate 5 kez yıkama tamponuyla yıkandı ve her seferinde yıkama tamponunu kuyucuklarda 1-2 dakika beklettik.
- Her bir kuyucuğa 90 µl TMB substratı eklenip, 15-30 dakika içinde karanlıkta 37 ° C'de inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi ve iyice karıştırıldı. Renk hemen sarıya döner.

Stop çözeltisi eklendikten hemen sonra bir mikroplaka okuyucu içinde 450 nm'de absorbans değerleri alındı.

3.2.3. Protein S100-B (S100B) Tayini

S100B düzeyi immünokimyasal bir metod olan yarışmalı enzim immünoassay yöntemi ile çalışıldı. Bunun için ticari ELISA kiti (Fine Test Catalogue No: EH0543) kullanıldı.

Testin Prensibi: Bu kit, sandviç enzime bağlı immün-sorbent tahlil teknolojisine dayanıyor. Anti-S100B antikoru, 96 kuyucuklu plakalara önceden kaplanmıştır. Biyotin konjuge anti-S100B antikoru tespit antikorları olarak kullanıldı. Standartlar, test örnekleri ve biotin konjuge algılama antikoru daha sonra kuyucuklara ilave edildi ve yıkama tamponu ile yıkandı. HRP-Streptavidin (SABC) eklendi ve bağlanmayan konjugatlar yıkama tamponuyla yıkandı. HRP enzimatik reaksiyonunu görselleştirmek için tetra metil benzidin (TMB) substratları kullanıldı. TMB, asidik durdurma çözeltisi ilave edildikten sonra sarıya dönüşen mavi renkli ürün üretmek için HRP ile katalize edildi. Sarı yoğunluğu plakada yakalanan S100B miktarındaki numune ile orantılıdır. Mikroplaka okuyucusunda 450 nm'de absorbans ve daha sonra S100B konsantrasyonu hesaplanır.

Yıkama tamponunun hazırlanması:

Deiyonize veya distile su ile 750 ml yıkama tamponuna 30 ml konsantre yıkama tamponunu eklendi.

Standart hazırlanması:

- 10 ng/ml standart çözelti: Bir Standart tüpe 1 ml Örnek/Standart seyreltme tamponu eklendi, tüpü 10 dakika oda sıcaklığında tutup ve iyice karıştırdık.
- Daha sonra seri dilüsyon yapıldı ve standart konstrasyonları yapıldı.

Biyotin antikoru çalışma çözeltisinin hazırlanması:

Deneyden 1 saat önce hazırlanır.

- Çalışma çözeltisinin toplam hacmini hesaplayıp: 0.1 ml/kuyucuk × kuyucuk miktarı hesaplandı (Toplam hacimden 0.1-0.2 ml daha fazla bekleyin).
- Biyotin-tespit antikorunu antikor seyreltme tamponu ile 1: 100 oranında seyreltip iyice karıştırdık (yani 99 ul antikor seyreltme tamponu içine 1 ul Biyotin saptama antikoru ekledik.)

HRP-Streptavidin Konjugat (SABC) çalışma çözeltisinin hazırlanması:

Deneyden önce 30 dakika içinde hazırlayın.

- Çalışma çözeltisinin toplam hacmini hesaplayıp 0.1 ml/kuyucuk × kuyucuk miktarı hesaplandı (Toplam hacimden 0.1-0.2 ml daha fazla bekleyin).
- SABC'yi SABC seyreltme tamponu ile 1:100'de seyreltip ve iyice karıştırdık (yani 99 ul SABC seyreltme tamponu içine 1 ul SABC ekledik).

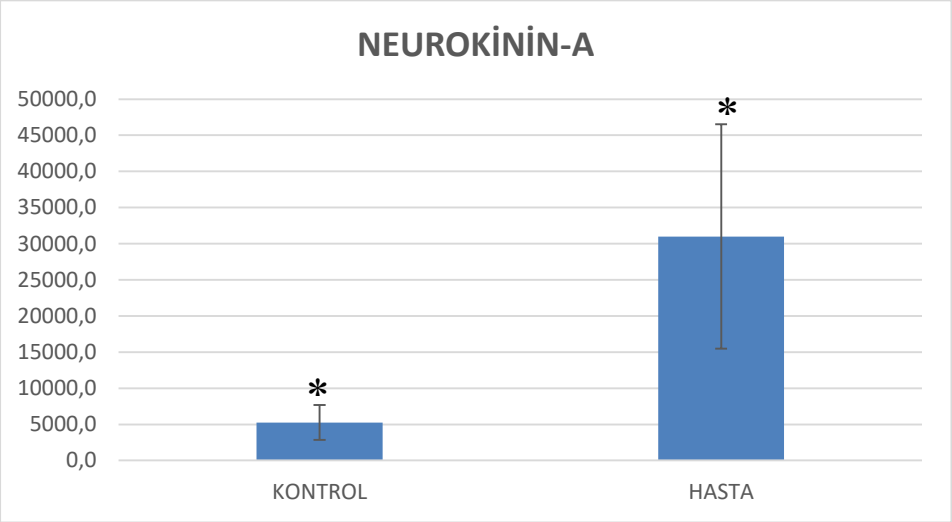
Testin prosedürü;

Kuyucuklara eklemeden önce SABC çalışma çözeltisini ve TMB substratını en az 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler ve reaktifleri eşit bir şekilde seyrelttik.

- Önceden kaplanmış plaka üzerinde standart, test örneği ve kontrol (sıfır) kuyucuklarını ayarladık ve sonra konumlarını kaydettik. Standart, numune ve kontrol (sıfır) kuyuları eklemeden önce plate 2 kez yıkadık.
- 0.1ng 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml, 0.3125ng/ml, 0.156ng/ml konstrasyonlarındaki standartlardan ve serumlardan 100 µl eklendi.
- Blank kuyucuğuna Sample/Standard dilüsyondan 100 µl ekledik.
- Plate kapatalıp 37 ° C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi.
- Kapağı çıkarıp ve plate içeriğini atıp, plakayı emici filtre kağıtları veya diğer emici malzemeler üzerine çırptık.
- Daha sonra kuyucukların her birine 100 µl Biotin saptama antikor çalışma çözeltisi ekledik. (standart, test örneği ve sıfır kuyucuklar).
- Plate kapatılıp 37 ° C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi.
- Kapağı çıkarıp plate 3 kez Yıkama tamponu ile yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 100 µl SABC çalışma çözeltisi eklendi ve plate kapatılıp, 37 ° C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi
- Plate 5 kez yıkama tamponuyla yıkandı ve her seferinde yıkama tamponunu kuyucuklarda 1-2 dakika beklettik.
- Her bir kuyucuğa 90 µl TMB substratı eklenip, 15-30 dakika içinde karanlıkta 37 ° C'de inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi ve iyice karıştırıldı. Renk hemen sarıya döner.
- Stop çözeltisi eklendikten hemen sonra bir mikroplaka okuyucu içinde 450 nm'de absorbans değerleri alındı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Nörokinin-A bulguları



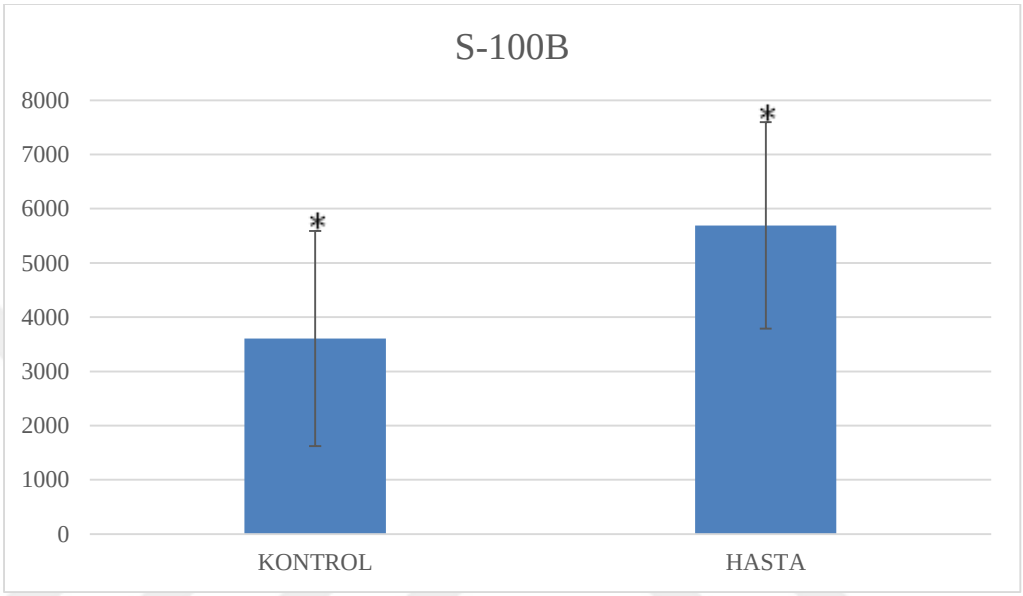
Şekil 4.1. Hasta ve kontrol guruplarının Nörokinin-A seviyeleri (Kontrol (n=30) ve hasta (n=30) bireylerin NKA seviyeleri karşılaştırıldı. * p<0,05)

Hasta ve kontrol gurubunun Nörokinin-A seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol gurubuna göre anlamlı (p<0,05) bir şekilde yükseldiği tespit edildi.

Nöropeptitlerin taşikinin ailesinin en ayrıntılı iki üyesi olan madde P ve Nörokinin A (NKA), hem merkezi sinir sisteminde hem de periferik dokularda önemli fizyolojik fonksiyonlar uygulayan nörotransmitterler olduğunu kanıtlamışlardır (Otsuka ve ark, 1993). Multipl sklerozlu (MS) hastalardan elde edilen beyin omurilik sıvısında bir taşikinin üyesi olan P maddesi, rapor edilmiştir (Qureshi ve ark, 2000). NK-1 antagonistleri, geleneksel anti-enflamatuar tedavilerle (MS) multipl skleroz gibi bazı otoimmün hastalıkların tedavisinin başarısını artırabiliceği kanısına varmışlardır (Reinke ve ark, 2006). Yaptığımız çalışma da Nörokinin-A'nın biyotidinaz eksikliği olan bireylerde santral sinir sistem hasarı için erken tanı açısından bir biyobelirteç olabileceği yönünde literatüre girebileceğini düşünmekteyiz. Yine yapılan çalışmalar ve bizim bulduğumuz anlamlı sonuç göz

önüne alındığında Nörokinin-A proteini kontrol grubuna anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Biyotinidaz eksikliği olan hastalarda bu serum düzeyinin yükseldiği ve santral sinir sistem hasarına neden olabileceği kanaatindeyiz.

4.2. S-100B bulguları

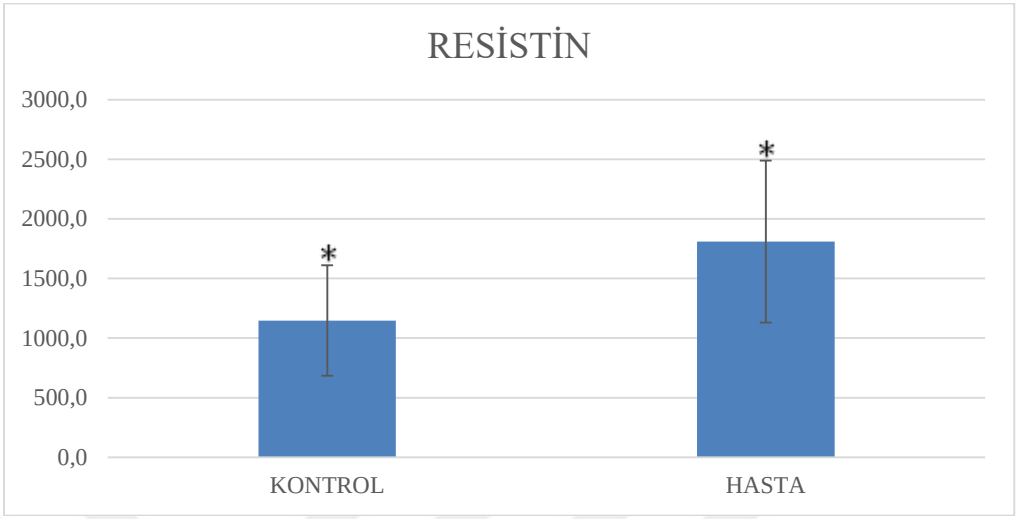


Şekil 4.2. Hasta ve kontrol guruplarının S-100B seviyeleri (Kontrol (n=30) ve hasta (n=30) bireylerin S-100B seviyeleri karşılaştırıldı. * p<0,05)

Kontrol ve hasta guruplarının S-100B seviyeleri incelendiğinde; hasta gurubunda anlamlı bir artışın olduğu tespit edildi.

S100B, beyin hasarının ve sinir sistemi bozukluklarının en değerli biyobelirteçidir (Marchi ve ark, 2004). S100 proteinleri, sinyal düzenleme, hücre döngüsü ilerlemesi gibi bir dizi hücresel işlemin düzenlenmesinde rol oynar (Michetti ve ark, 2019). Epileptik hastalarda veya epileptik nöbet geçiren bebeklerde serum S100B seviyesinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (Steinhoff ve ark, 1999). Yaptığımız çalışma da S100 B'nin biyotidinidaz eksikliği olan bireylerde beyin hasarı için erken tanı açısından bir biyobelirteç olabileceği yönünde literatüre girebileceğini düşünmekteyiz. Yine yapılan çalışmalar ve bizim bulduğumuz anlamlı sonuç göz önüne alındığında S100 B proteini kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde ($p<0,05$) yüksek bulundu.

4.3. Resistin bulguları



Şekil 4.3. Hasta ve kontrol guruplarının Resistin seviyeleri (Kontrol (n=30) ve hasta (n=30) bireylerin RETN seviyeleri karşılaştırıldı. * p<0,05)

Resistin seviyeleri şekil 4.3'te verilmiştir. Hasta gurubunun Resistin seviyesi kontrol gurubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artışın olduğu gözlendi.

Resistin obezite, diyabet ve ateroskleroz, kardiyovasküler ve romatizmal hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (Ding ve ark, 2011). İntraserebral kanama ve kafa travması olan hastalarda resistin düzeyleri de artmıştır (Dong ve ark, 2010; 2010). İnsanlarda, otoimmün hastalıklar ve inflamasyon ile ilişkili olarak yüksek seviyelerde resistin bulunur (Filkova ve ark, 2009). Yaptığımız çalışma da Resistin' nin biyotidinaz eksikliği olan bireylerde beyin hasarı için erken tanı açısından bir biyobelirteç olabileceği yönünde literatüre girebileceğini düşünmekteyiz. Yine yapılan çalışmalar ve bizim bulduğumuz anlamlı sonuç göz önüne alındığında Resistin proteini kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edildi. Biyotidinaz eksikliği olan hastalarda bu serum düzeyinin yükseldiği ve beyin hasarına neden olabileceği kanaatindeyiz.

Yaptığımız çalışma sonucunda biyotinidaz eksikliği olan çocuklarda enflamasyona bağlı olarak artan resistinin, oksidatif stresi indükleyerek beyin hasarına neden olduğu, artan S100B ve Nörokinin A seviyesi ile gösterilmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Biyotinidaz eksikliği (BTD), endojen geri dönüşümü ve biyotinin diyet proteininden salınmasını etkileyen otozomal resesif bir bozukluktur (Rezvani ve Rosenblatt, 2004). BTD, biyotine bağımlı karboksilazların düşük aktiviteleri ve çoklu karboksilaz eksikliğinin (MCD) karakteristik organik asitlerin üriner atılımıyla sonuçlanır.

Biyotinidaz (BTD) eksikliği, biyotinidaz eksikliğinin, biyotinin proteine bağlı formundan serbest bırakılması ve biyotine bağımlı karboksilazlar için bir kofaktör olarak kullanılabilir hale getirilmesi için biyokimyasal bir yetersizliğe yol açtığı otozomal resesif bir genetik bozukluktur. Bu enzimler yağ asidi sentezi, aminoasit katabolizması ve glukoneogenezden sorumludur. Biyotinidaz enzim eksikliğine BTD genindeki bir mutasyon neden olur. BTD geninde bugüne kadar 3p25 kromozom lokasyonunda 80'den fazla mutasyon tespit edilmiştir. Biyotinidaz eksikliği nadiren 60.000 canlı doğumda yaklaşık 1 insidans ile nadir değildir ve 1 haftadan 10 yaşına kadar herhangi bir zamanda ortaya çıkabilir. Genel popülasyonda taşıyıcı frekansı yaklaşık 1: 120'dir. Hedeflenen mutasyon, sekans, silme / çoğaltma analizi ve basit enzim aktivite testi tanıyı belirlemeye yardımcı olabilir. Derin (ortalama normal serum enzim aktivitesinin% 10'u) ve kısmi (ortalama normal serum enzim aktivitesinin% 10-30'u) eksiklikleri oluşabilir (Bunch ve ark, 2011).

BTD ilk kez geç başlangıçlı MCD olarak biliniyordu çünkü çoğu hasta bir aylıktan sonra ilk semptomlar sergilemektedir (Kurt ve ark, 1982) ve 1982'de Wolf ve ark. biyotinidazın geç başlangıçlı MCD'de birincil enzimatik defekt olduğunu bulmuşlardır (Wolf ve ark, 1983). BTD'li hastalar rezidüel enzim aktivitesinin iki fazlı dağılımı nedeniyle derin (rezidüel aktivite <% 10) ve kısmi eksikliğe (% 10-30) ayrılabilir (Cowan ve ark, 2010). Derin BTD'li hastalar dermatit, konjonktivit ve alopesi gibi kutanöz semptomlar ve hipotoni, nöbetler,

gelişimsel gecikme, işitme kaybı (Anonim, 2002) ve optik atrofi (Salbert ve ark, 1993) gibi nörolojik semptomlarla kendini gösterir. Etkilenen hastalar tedavi edilmezse metabolik dekompansasyon, koma veya ölüme ilerleyebilir (Wolf ve ark, 1983). Kısmi BTD olan hastalar genellikle daha sonraki bir aşamada stres sırasında hafif semptomlara sahip ve hastalık gelişme geriliği başvuran çocuklarda tanı konulmamış kalabilir (Ogundele, 2011) veya otizm (Manzi ve ark, 2009). Biyotinidaz eksikliği belirtileri, terapötik dozlarda biyotin (günde 5-20 mg) ile önlenebilir (Weber, 2004; Moslinger ve ark, 2001), ancak nörolojik defisitler ortaya çıktıktan sonra geri dönüşümlü değildir (Weber, 2004; Grunewald ve ark, 2004).

BTD için yenidoğan taraması, kurutulmuş kan lekeleri (DBS) üzerindeki biyotinidaz aktivitesinin belirlenmesi ile gerçekleştirilebilir (Heard ve ark, 1984). Halihazırda, ABD ve diğer 30'dan fazla ülkedeki tüm yenidoğan tarama programları BTD taraması yapmaktadır (Strovel ve ark, 2017). Yenidoğan taraması ile teşhis edilen ve semptom başlangıcından önce biyotin ile tedavi edilen hastalar normal olarak gelişir. Biyotinidaz eksikliği için dünya çapında yeni doğan taramasının erken bir çalışmasına göre BTD insidansı yaklaşık 1 / 60,000'dir (hem kısmi hem de derin tipler için yaklaşık 1 / 120,000) (Wolf, 1991). İnsidans ülkeler arasında değişiklik göstermektedir ve Brezilya, Türkiye ve Suudi Arabistan'da daha yüksek vakalar kaydedilmiştir (Baykal ve ark, 1998; Pomponio ve ark, 2000; Neto ve ark, 2004).

Biyotinidaz (EC 3.5.1.12), vitamin biyotini geri dönüştüren enzimdir. (Pispa,1965; Wolf, 2001) Bir vitamin olarak biyotin, diyetten proteine bağlı olmayan, proteine bağlı küçük biyotinlenmiş peptitler olarak gelir. Serbest formda doğrudan biyotin havuzuna girebilir ve bunları inaktif olandan aktif formlara dönüştürmek için kullanan dört karboksilaz tarafından kullanılabilir.(Bonjour, 1977) Karboksilaz propionil-CoA karboksilaz ve β-metilkrotonil-CoA karboksilaz protein katabolizması için önemlidir, piruvat karboksilaz glukoneojenenler için gereklidir ve asetil CoA karboksilaz, yağ asidi sentezinde ilk adımdır (Wolf, 1981). Proteine bağlı

biyotin, biyositin (biyotinil-p-lizin) ve / veya küçük biyotinil-peptitleri serbest bırakmak için proteolitik olarak ayrıştırılmalıdır. Ayrıca biyotinidaz ile yarılır, serbest biyotinin havuza girmesi serbest bırakılır (Craft ve ark, 1985). Biyotinidazın temel bir işlevi, bozulmuş holokarboksilazlardan biyositin ve / veya küçük biyotinil-peptitlerden serbest bırakılan biyotinin geri dönüştürülmesidir.

Klinik olarak, derin biyotinidaz eksikliği olan çocuklar, tedavi edilmezse, genellikle aşağıdaki semptomlardan bir veya daha fazlasını gösterir: hipotoni; Nöbetler; Ekzematöz cilt döküntüsü; Alopesi; Hiperventilasyon, laringeal stridor ve apne gibi solunum problemleri; Konjonktivit, kandidiyaz; Ataksi; Gelişimsel gecikme; işitme kaybı; ve optik atrofi gibi görme problemleri (Wolf, 2001; 1983). Metabolik olarak, biyotinidaz eksikliği olan çoğu tedavi edilmeyen birey aşağıdakilerden bir veya daha fazlasına sahip olacaktır: ketolaktik asidoz, organik asidüri ve hafif hiperammonemi. (Wolf, 1983; 1985) Bununla birlikte, organik asidüri eksikliği veya Metabolik ketoasidoz, semptomatik bir çocukta biyotinidaz eksikliği tanısını dışlamaz.

Düşük biyotinidaz aktivitesi, beyin seviyesinde biyotin eksikliğine ve sonuç olarak, biyotin takviyesine rağmen geri dönüşü olmayan stereotip ve otistik davranışlar gibi ciddi nörolojik sorunlara neden olabilir (Zaffanello ve ark, 2003). Tedavi edilmemiş, derin biyotinidaz eksikliği olan bireylerin en yaygın nörolojik özellikleri nöbetler ve hipotonidir (Wastell ve ark, 1988; Wolf, 2011). Nöbetler genellikle miyokloniktir, ancak büyük mal ve fokal olabilir; Bazı çocuklarda infantil spazmlar vardır (Salbert ve ark, 1993). Tedavi edilmeyen bazı çocuklar progresif spastik parezi ve miyelopati ile karakterize olan omurilik hastalığı sergilemiştir (Chedrawi ve ark, 2008). Daha büyük etkilenen çocuklarda ataksi ve gelişimsel gecikme gelişebilir. Biyotinidaz eksikliği olan birçok semptomatik çocukta manyetik rezonans görüntüleme veya beynin bilgisayarlı tomografisinde çeşitli merkezi sinir sistemi anormallikleri görülür (Wastell ve ark, 1988; Salbert ve ark, 1993; Wolf ve ark 1983; Lott ve ark, 1993; Grünewald ve ark, 2004).

Biyotinidaz eksikliği olan bireylerde çeşitli klinik semptomlar görülmesine karşı biyotinidaz eksikliğinin beyin üzerindeki hasarı biyokimyasal olarak yeterince incelenmediği tespit edilmiştir. Bu çalışmada biyotinidaz eksikliği olan bireylerde S-100B,Neurokinin-A ve Resistin seviyeleri incelenerek olası hasar mekanizması araştırılmıştır. Yaptığımız çalışma sonucunda hasta bireylerde S-100B, Nörokinin-A ve Resistin seviyelerinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir.

S100B, Ca2 + bağlayıcı bir proteindir ve öncelikle astrositler tarafından eksprese edilir. S100 proteinleri, sinyal düzenleme, hücre döngüsü ilerlemesi gibi bir dizi hücresel işlemin düzenlenmesinde rol oynar ve hücre proliferasyonunu ve göçünü uyarıcı olarak ve apoptoz ve farklılaşmanın bir inhibitörü olarak işlev görür (Donato ve ark, 2009; Riuzzi ve ark, 2018; Michetti ve ark, 2019). S100B, klinik olarak anlamlı ideal periferik biyobelirteçlerin yukarıdaki tüm özelliklerini karşılar (Walker ve ark, 2016). Serum S100B, beyin hasarının (Marchi ve ark, 2004) ve Sinir sistemi bozukluklarının en değerli biyobelirteçidir. Epileptik hastalarda veya epileptik nöbet geçiren bebeklerde serum S100B seviyesinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur, bu da epileptik nöbetlerin klinik tanısı için yararlıdır (Steinhoff ve ark, 1999; Sendrowski ve ark, 2004; Kacinski ve ark, 2012). Çalışmamızda S-100B seviyesinin artmış olması biyotinidaz eksikliği olan bireylerde beyin hasarına neden olabileceğini göstermiştir. Nöropeptitlerin taşikinin ailesinin en ayrıntılı iki üyesi olan madde P (SP) ve nörokinin A (NKA), hem merkezi sinir sisteminde hem de periferik dokularda önemli fizyolojik fonksiyonlar uygulayan varsayılan nörotransmitterlerdir (Otsuka ve ark, 1993). SP ve NKA, insanlar dâhil olmak üzere çeşitli memeli türlerinin ince ve kalın bağırsaklarında bulunur, burada esas olarak intrinsik enterik nöronlar ve dorsal kök gangliyonlarından ve vagal duyusal nöronlardan kaynaklanan dışsal birincil afferent sinir lifleri ile ifade edilirler (Furness ve ark, 1987; Holzer, 1997). Bu iki nöropeptidin ilave kaynakları, gastrointestinal epitel (Heitz ve ark, 1976) içindeki enterokromaffin hücreleri ve lamina propria'nın kandan türetilen veya yerleşik immün hücreleri tarafından sağlanır (Metwali ve ark, 1994; Castagliuolo ve ark, 1997).

Nörojenik inflamasyon, çok sayıda nöropeptit tarafından düzenlenir. Taşikininler (madde P, nörokinin A ve nörokinin B), bazı otoimmün nöroinflamatuar hastalıklarda önemli rol oynayabilen pro-enflamatuar nöropeptitlerdir. Otoimmünite, bazı hastalarda otizmin patogenezinde rol oynayabilir. Biyotinidaz eksikliği olan çocuklarda nörokinin A düzeylerini ilk ölçen biziz.

Nörojenik iltihaplanma, esas olarak taşikininler dahil olmak üzere çok sayıda nöropeptit tarafından düzenlenir. Taşikininler (madde P, nörokinin A ve nörokinin B), alerjenlere maruz kaldıktan sonra adrenerjik olmayan, kolinerjik olmayan uyarıcı sinir sistemi sinirlerinin uyarıcı kısmından salınan bir grup nöropeptid olarak kabul edilmiştir. Taşikininlerin biyolojik aktivitesi, üç spesifik taşikinin reseptörü, nörokinin (NK) 1 (P maddesi için spesifik), NK2 (nörokinin A için spesifik) ve NK3 (nörokinin B için spesifik) reseptörleri ile etkileşimlerine bağlıdır (Maggi, 2000;Almeida ve ark, 2004;Ramalho ve ark, 2011). Taşikinin reseptör antagonistleri, immün aracılı hastalıklarda potansiyel yeni bir anti-enflamatuar ilaç sınıfıdır (Ettorre ve ark, 2011; Sigfridsson ve ark, 2011).

Stres sırasında tetiklenen tackykininler de dahil olmak üzere nöroendokrin hormonları, değişmiş sitokin üretiminden kaynaklanan bağışıklık düzensizliğine ve otoimmün veya atopik hastalıklara yol açabilir. Bu nedenle, daha sonra sitokin dengesinin düzensizliğinin indüklenmesi ile stres yanıtı, nöropeptidlerin ve sitokinlerin aşırı üretimi yoluyla hipotalamik-hipofiz-adrenal ekseni ve sempatik sinir sistemini tetikleyebilir. Romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus (SLE) ve diabetes mellitus gibi çeşitli otoimmün hastalıklarda, bağışıklık düzensizliği, nöropeptidlerin ve sitokinlerin aşırı üretimi yoluyla nöroendokrin-bağışıklık ağ dengesizliğine atfedilebilir (Frieri, 2003). Multipl sklerozlu hastalardan elde edilen beyin omurilik sıvısında bir taşikinin üyesi olan P maddesi, rapor edilmiştir. Otizme benzer şekilde multipl skleroz, CNS'nin genetik olarak duyarlı bir kişide çevresel bir faktör tarafından tetiklenen bir miyelin bileşenine oto-immünolojik bir yanıtı temsil ettiğine inanılan enflamatuar bir hastalıktır (Qureshi ve ark, 2000). P maddesi, NK-1

reseptörleri aracılığıyla, multipl sklerozda CNS inflamasyonunun korunmasına katkıda bulunur. NK-1 antagonistleri, geleneksel anti-enflamatuar tedavilerle multipl skleroz gibi bazı otoimmün hastalıkların tedavisinin başarısını artırabilir (Reinke ve ark, 2006).

Çalışmamızda nörokinin A seviyesinin anlamlı artışı gözlendi. Bu artış biyotinidaz eksikliğine bağlı olarak santral sinir sisteminde ön hasarın belirteci olabilir.

Başlangıçta kemirgenlerde adiposit salgılayan bir peptit olarak tanımlanan ve insülin direncine katkıda bulunduğu düşünülen bir protein olan resistin, son zamanlarda çeşitli inflamatuar koşullarda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Filkova ve ark, 2009).

İnsanlarda primer adipositler üzerindeki resistin ekspresyonu düşük iken monosit-makrofaj soy hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir (Filkova ve ark, 2009; Patel ve ark, 2003). Resistin, pro-enflamatuar sitokinlerle ortak birçok özelliğe sahiptir (Bokarewa ve ark, 2005; Tilg ve ark, 2006). Diğer sitokinlerin indüksiyonu yoluyla iltihaplanmayı teşvik eder ve resistin kendisinin ifadesi, IL-6, TNF-α ve IL-1β ve LPS gibi pro-enflamatuar sitokinlerle stimülasyona yanıt olarak periferik kan mononükleer hücreleri üzerinde güçlü bir şekilde yukarı regüle edilir (Bokarewa ve ark, 2005; Kaser ve ark, 2003).

İnsanlarda, otoimmün hastalıklar ve inflamasyon ile ilişkili olarak yüksek seviyelerde resistin bulunur (Filkova ve ark, 2009). Resistin obezite, diyabet ve ateroskleroz, kardiyovasküler ve romatizmal hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (Ding ve ark, 2011; Gomez ve ark, 2005; Nasr ve ark, 2012; Krysiak ve ark, 2012). İntraserebral kanama ve kafa travması olan hastalarda resistin düzeyleri de artmıştır (Dong ve ark, 2010; 2010).

Çalışmamızda biyotinidaz eksikliği olan bireyelerde resistin seviyesinin yükseldiği gözlenmiştir. Bu artış biyotinidaz eksikliği olan bireylerde olası beyin hasarının bir sonucu olabilir.

KAYNAKLAR

ALİ, M. S., HARMER, M., and VAUGHAN, R. 2000. Serum S100 protein as a marker of cerebral damage during cardiac surgery. British Journal of Anaesthesia, 85(2): 287-298.

ANDERSEN, J. B., BLİCHFELDT, S., CHRİSTENSEN, M. F., and HAAGERUP, A. 1997. Biotinidase deficiency: two cases of very early presentation. Developmental Medicine and Child Neurology, 39(12): 832-835.ASHTON, N. 2006. Renal and vascularactions of urotensin II. Kidney İnternational, 70(4): 624-629.

AWAWDEH L. A., LUNDY F. T., LINDEN G. J., SHAW C., KENNEDY J. G., and LAMEY P. J. 2002. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in gingival crevicular fluid associated with painful human teeth. European Journal of Oral Sciences, 110: 185-191.

BAKAR, F. T. 2012. Genişletilmiş yenidoğan taraması. Turkiye Klinikleri Journal of Pediatrics, 21(4): 212-223.

BANERJEE, R. R., and LAZAR, M. A. 2003. Resistin: molecular history and prognosis. Journal of Molecular Medicine, 81(4): 218-226.

BAUR, B., SUORMALA, T., and BAUMGARTNER, E. R. 2002. Biocytin and biotin uptake into NB2a neuroblastoma and C6 astrocytoma cells. Brain research, 925(2): 111-121.

BAYLİSS, W. M. 1901. On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hind-limb, and on the nature of these fibres 1. The Journal of physiology, 26(3-4): 173-209.

BORSATTO, T., SPERB-LUDWIG, F., LIMA, S. E., CARVALHO, M. R., FONSECA, P. A., CAMELO JR, J. S., and BOY, R. 2017. Biotinidase deficiency: genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. PloS one, 12(5), e0177503.

BÜTTNER, T., WEYERS, S., POSTERT, T., SPRENGELMEYER, R., and KUHN, W. 1997. S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. Stroke, 28(10): 1961-1965.

CALABRO, P., SAMUDİO, I., WİLLERSON, J. T., and YEH, E. T. 2004. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal–regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. Circulation, 110(21): 3335-3340.

CANDA, E., YAZİCİ, H., ER, E., KOSE, M., BASOL, G., ONAY, H., ve COKER, M. 2018. Single center experience of biotinidase deficiency: 259 patients and six novel mutations. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 31(8): 917-926.

CAVİEDES-BUCHELİ, J., MUÑOZ, H. R., AZUERO-HOLGUÍN, M. M., and ULATE, E. 2008. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. Journal of Endodontics, 34(7): 773-788.

CAVİEDES-BUCHELİ, J., CAMARGO-BELTRÁN, C., GÓMEZ-LA-ROTTA, A. M., MORENO, S. C. T., ABELLO, G. C. M., and GONZÁLEZ-ESCOBAR, J. M. 2004. Expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in irreversible acute pulpitis. Journal of Endodontics, 30(4): 201-204.

CHARTREL, N., LEPRİNCE, J., DUJARDİN, C., CHATENET, D., TOLLEMER, H., BARONCİNİ, M., and VAUDRY, H. 2004. Biochemical characterization and immunohistochemical localization of urotensin II in the human brainstem and spinal cord. Journal of Neurochemistry, 91(1): 110-118.

CHAUDHURİ, D., HORROCKS, W. D., AMBURGEY, J. C., and WEBER, D. J. 1997. Characterization of lanthanide ion binding to the EF-hand protein S100β by luminescence spectroscopy. Biochemistry, 36(32): 9674-9680.

CHEN, Y. H., HUNG, P. F., and KAO, Y. H. 2005. IGF-I downregulates resistin gene expression and protein secretion. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 288(5): 1019-1027.

CLARK, S. D., NOTHACKER, H. P., WANG, Z., SAİTO, Y., LESLİE, F. M., and CİVELLİ, O. 2001. The urotensin II receptor is expressed in the cholinergic mesopontine tegmentum of the rat. Brain research, 923(1-2): 120-127.

COŞKUN, T., TOKATLİ, A., and OZALP, I. 1994. Inborn errors of biotin metabolism. Clinical and laboratory features of eight cases. The Turkish Journal of Pediatrics, 36(4): 267-278.

COULOUARN, Y., JÉGOU, S., TOSTİVİNT, H., VAUDRY, H., and LİHRMANN, I. 1999. Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. FEBS letters, 457(1): 28-32.

COULOUARN, Y., LİHRMANN, I., JEGOU, S., ANOUAR, Y., TOSTİVİNT, H., BEAUVİLLAİN, J. C., and VAUDRY, H. 1998. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(26): 15803-15808.

CRAFT, D. V., GOSS, N. H., CHANDRAMOULİ, N., and WOOD, H. G. 1985. Purification of biotinidase from human plasma and its activity on biotinyl peptides. Biochemistry, 24(10): 2471-2476.

DE CASTRO, M., ZAND, D. J., LICHTER-KONECKI, U., and KIRMSE, B. 2014. Severe neonatal holocarboxylase synthetase deficiency in West African siblings. In JIMD Reports, Volume 20 (pp. 1-4). Springer, Berlin, Heidelberg.

DE SWERT, K. O., and JOOS, G. F. 2006. Extending the understanding of sensory neuropeptides. European Journal of Pharmacology, 533(1-3): 171-181.

DEMİRTÜRK, Z., ŞENTÜRK, E., KÖSE, A., ÖZCAN, P. E., and TELCİ, L. 2016. A case of biotinidase deficiency in an adult with respiratory failure in the intensive care unit. Balkan Medical Journal, 33(5): 563-565.

DESAİ, S., GANESAN, K., and HEGDE, A. 2008. Biotinidase deficiency: a reversible metabolic encephalopathy. Neuroimaging and MR spectroscopic findings in a series of four patients. Pediatric Radiology, 38(8): 848-856.

DO REGO, J. C., LEPRİNCE, J., SCALBERT, E., VAUDRY, H., and COSTENTİN, J. 2008. Behavioral actions of urotensin-II. Peptides, 29(5): 838-844.

EL KARİM, I. A., LAMEY, P. J., LİNDEN, G. J., AWAWDEH, L. A., and LUNDY, F. T. 2006. Caries-induced changes in the expression of pulpal neuropeptide Y. European Journal of Oral Sciences, 114(2): 133-137.

EDVİNSSON, L., MULDER, H., GOADSBY, P. J., and UDDMAN, R. 1998. Calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the trigeminal ganglion: cerebral vasodilatation from trigeminal nerve stimulation involves mainly calcitonin gene-related peptide. Journal of the Autonomic Nervous System, 70(1-2): 15-22.

FALLGREN, B., EKBLAD, E., and EDVİNSSON, L. 1989. Co-existence of neuropeptides and differential inhibition of vasodilator responses by neuropeptide Y in guinea pig uterine arteries. Neuroscience letters, 100(1-3): 71-76.

FANO, G., ANGELELLA, P., NİCOLETTİ, I., ANTONİCA, A., FULLE, S., and CALİSSANO, P. 1993. The S-100 protein causes an increase of intracellular calcium and death of PC12 cells. Neuroscience, 53(4): 919-925.

FREİ, K., MALİPİERO, U. V., LEİST, T. P., ZİNKERNAGEL, R. M., SCHWAB, M. E., and FONTANA, A. 1989. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. European Journal of Immunology, 19(4): 689-694.

GEENEN, V. 2004. Immunoendocrinology in Health and Disease. CRC Press, Florida, USA.

GROVES, P., FİNN, B. E., KUŹNİCKİ, J., and FORSÉN, S. 1998. A model for target protein binding to calcium-activated S100 dimers. FEBS letters, 421(3): 175-179.

GRÜNEWALD, S., CHAMPİON, M. P., LEONARD, J. V., SCHAPER, J., and MORRİS, A. A. M. 2004. Biotinidase deficiency: a treatable leukoencephalopathy. Neuropediatrics, 35(04): 211-216.

HAGLİD, K. G., YANG, Q., HAMBERGER, A., BERGMAN, S., WİDERBERG, A., and DANİELSEN, N. 1997. S-100β stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. Brain research, 753(2): 196-201.

HART, P. S., HYMES, J., and WOLF, B. 1992. Biochemical and immunological characterization of serum biotinidase in profound biotinidase deficiency. American Journal of Human Genetics, 50(1): 126.

HART, P. S., HYMES, J., and WOLF, B. 1991. Isoforms of human serum biotinidase. Clinica Chimica Acta, 197(3): 257-264.

HAYAKAWA, K., and OİZUMİ, J. 1988. Human serum biotinidase is a thiol-type enzyme. The Journal of Biochemistry, 103(5): 773-777.

HEİDARİ, A., SHAHRABİ, M., SHAHRABİ, M. S., GHANDEHARİ, M., and RAHBAR, P. 2017. Comparison of the Level of Substance P and Neurokinin A in Gingival Crevicular Fluid of Sound and Symptomatic Carious Primary Teeth by ELISA. Journal of Dentistry, 14(4): 173.

HEİZMANN, C. W. 1999. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Subtypes of S100 proteins must be identified. BMJ (Clinical research ed.), 318(7182): 538-538.

HOLMGREN S, JENSEN J. 2001 Evolution of vertebrate neuropeptides. Brain Research Bulletin, 55: 723-735.

HOYLE, C. H., and HOYLE, C. H. V. 1996. Neuropeptides: essential data. Wiley, Chichester, UK.

HUNTER, M. J., and CHAZİN, W. J. 1998. High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14. Journal of Biological Chemistry, 273(20): 12427-12435.

IWASAKİ, Y., SHİOJİMA, T., and KİNOSHİTA, M. 1997. S100β prevents the death of motor neurons in newborn rats after sciatic nerve section. Journal of the Neurological Sciences, 151(1): 7-12.

KASKEL, P., BERKİNG, C., SANDERB, S., VOLKENANDT, M., PETER, R. U., and KRÄHN, G. 1999. S-100 protein in peripheral blood: a marker for melanoma metastases: a prospective 2-center study of 570 patients with melanoma. Journal of the American Academy of Dermatology, 41(6): 962-969.

KASKEL, P., BERKİNG, C., SANDERB, S., VOLKENANDT, M., PETER, R. U., and KRÄHN, G. 1999. S-100 protein in peripheral blood: a marker for melanoma metastases: a prospective 2-center study of 570 patients with melanoma. Journal of the American Academy of Dermatology, 41(6): 962-969.

KAVASOĞLU, A. N., ONAY, H., KÖSE, M., DURMAZ, A., KALKAN, S., ÇOKER, M., ve ÖZKINAY, F. 2014. Yenidoğan Tarama Testinde Biyotinidaz Eksikliği Saptanan Bir Olgu. Turkiye Klinikleri Journal of Pediatrics, 23(1): 49-52.

KİYKİM, E., KİYKİM, A., CANSEVER, M. S., and ZEYBEK, C. A. A. 2015. Biotinidase deficiency mimicking primary immune deficiencies. *BMJ Case Reports*, *2015*, bcr2014209275.

KOERNER, A., KRATZSCH, J., and KİESS, W. 2005. Adipocytokines: leptin—the classical, resistin—the controversical, adiponectin—the promising, and more to come. Best practice and research Clinical Endocrinology and Metabolism, 19(4): 525-546.

KOOHMANAEE, S., ZARKESH, M., TABRIZI, M., RAD, A. H., DIVSHALI, S., and DALILI, S. 2015. Biotinidase deficiency in newborns as respiratorydistress and tachypnea: a case report. Iranian Journal of Child Neurology, 9(2): 58.

LAMERS, K. J. B., VAN ENGELEN, B. G. M., GABREELS, F. J. M., HOMMES, O. R., BORM, G. F., and WEVERS, R. A. 1995. Cerebrospinal neuron-specific enolase, S-100 and myelin basic protein in neurological disorders. Acta Neurologica Scandinavica, 92(3): 247-251.

LAPP, H., BOERRİGTER, G., COSTELLO-BOERRİGTER, L. C., JAEKEL, K., SCHEFFOLD, T., KRAKAU, I., and STASCH, J. P. 2004. Elevated plasma human urotensin-II-like immunoreactivity in ischemic cardiomyopathy. International Journal of Cardiology, 94(1): 93-97.

LASZLO, A., SCHULER, E. A., SALLAY, E., ENDREFFY, E., SOMOGYİ, C., VARKONYİ, A., and WOLF, B. 2003. Neonatal screening for biotinidase deficiency in Hungary: clinical, biochemical and molecular studies. Journal of Inherited Metabolic Disease, 26(7): 693-698.

LİNDBERG, L., OLSSON, A. K., ANDERSON, K., and JÖGİ, P. 1998. Serum S-100 protein levels after pediatric cardiac operations: a possible new marker for postperfusion cerebral injury. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 116(2): 281-285.

LİNG, C., KİNDBLOM, J., WENNBO, H., and BİLLİG, H. 2001. Increased resistin expression in the adipose tissue of male prolactin transgenic mice and in male mice with elevated androgen levels. FEBS letters, 507(2): 147-150.

LYON, G., ADAMS, R. D., and KOLODNY, E. H. 1997. Neurology of hereditary metabolic diseases of children. Electroencephalography and Clinical Neurophysiology, 103(5): 576-576.

MARKLOVA, E., VONSOVSKA, M., and NOZİCKOVA, M. 1994. Screening for biotinidase deficiency in some skin diseases. *Sbornik vedeckych praci Lekarske fakulty Karlovy university v Hradci Kralove, 37*(1): 33-36.

MİNN, A. H., PATTERSON, N. B., PACK, S., HOFFMANN, S. C., GAVRİLOVA, O., VİNSON, C., and SHALEV, A. 2003. Resistin is expressed in pancreatic islets. Biochemical and Biophysical Research Communications, 310(2): 641-645.

MOSS, J., and LANE, M. D. 1971. The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 35*: 321-442.

NETO, E., SCHULTE, J., RUBİM, R., LEWİS, E., DEMARİ, J., CASTİLHOS, C., and WOLF, B. 2004. Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 37(3): 295-299.

NYGAARD, O., LANGBAKK, B., and ROMNER, B. 1997. Age-and sex-related changes of S-100 protein concentrations in cerebrospinal fluid and serum in patients with no previous history of neurological disorder. Clinical Chemistry, 43(3): 541-543.

OİZUMİ, J., HAYAKAWA, K., and HOSOYO, M. 1989. Comparative study of human milk and serum biotinidase. Biochemie, 71(11-12): 1163-1169.

OLGART, L., GAZELİUS, B., BRODİN, E., and NİLSSON, G. 1977. Release of substance P-like immunoreactivity from the dental pulp. Acta Physiologica Scandinavica, 101(4): 510-512.

PACHECO-ALVAREZ, D., SOLÓRZANO-VARGAS, R. S., and DEL RÍO, A. L. 2002. Biotin in metabolism and its relationship to human disease. Archives of Medical Research, 33(5): 439-447.

PATEL, S. D., RAJALA, M. W., ROSSETTİ, L., SCHERER, P. E., and SHAPİRO, L. 2004. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. Science, 304(5674): 1154-1158.

PİNDOLİA, K., JORDAN, M., GUO, C., MATTHEWS, N., MOCK, D. M., STROVEL, E., and WOLF, B. (2011). Development and characterization of a mouse with profound biotinidase deficiency: a biotin-responsive neurocutaneous disorder. *Molecular Genetics and Metabolism, 102*(2): 161-169.

PİSPA, J. 1965. Animal biotinidase. *Ann Med Exp Biol Fenn, 43*(5): 1-39.

POMPONİO, R. J., HYMES, J., PANDYA, A., LANDA, B., MELONE, P., JAVAHERİ, R., and BUCK, G. 1998. Prenatal diagnosis of heterozygosity for biotinidase deficiency by enzymatic and molecular analyses. Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation with the International Society for Prenatal Diagnosis, 18(2): 117-122.

RAHA, S., and UDANİ, V. 2011. Biotinidase deficiency presenting as recurrent myelopathy in a 7-year-old boy and a review of the literature. Pediatric Neurology, 45(4): 261-264.

RAHMAN, S., STANDİNG, S., MA, R. N. D., and PİKE, M. G. 1997. Late presentation of biotinidase deficiency with acute visual loss and gait disturbance. Developmental Medicine and Child Neurology, 39(12): 830-831.

REA, R., and DONNELLY, R. 2004. Resistin: an adipocyte-derived hormone. Has it a role in diabetes and obesity?. Diabetes, Obesity and Metabolism, 6(3): 163-170.

REZVANİ, I., and ROSENBLATT, D. S. 2004. Valine, Leucine, Isoleucine, and Related Organic Acidemias. Nelson Textbook of Pediatrics, Saunders, Philadelphia, 409-33.

RICHARDSON JD, and VASKO MR. 2002 Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 302: 839-845.

ROSEN, H., ROSENGREN, L., HERLİTZ, J., and BLOMSTRAND, C. 1998. Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. Stroke, 29(2): 473-477.

ROSS, B., MCKENDY, K., and GİAİD, A. 2010. Role of urotensin II in health and disease. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 298(5): 1156-1172.

RUSSELL, F. D. 2004. Emerging roles of urotensin-II in cardiovascular disease. Pharmacology and Therapeutics, 103(3): 223-243.

SALBERT, B. A., PELLOCK, J. M., and WOLF, B. 1993. Characterization of seizures associated with biotinidase deficiency. Neurology, 43(7): 1351-1351.

SATTARİ, M., MOZAYENİ, M. A., MATLOOB, A., MOZAYENİ, M., and JAVAHERİ, H. H. 2010. Substance P and CGRP expression in dental pulps with irreversible pulpitis. Australian Endodontic Journal, 36(2): 59-63.

SCHÄFER, B. W., FRİTSCHY, J. M., MURMANN, P., TROXLER, H., DURUSSEL, I., HEİZMANN, C. W., and COX, J. A. 2000. Brain S100A5 is a novel calcium-, zinc-, and copper ion-binding protein of the EF-hand superfamily. Journal of Biological Chemistry, 275(39): 30623-30630.

SCHMİDT, S. 1998. S100B: pathogenetic and pathophysiologic significance in neurology. Der Nervenarzt, 69(8): 639-646.

SCHÖBİTZ, B., VOORHUİS, D. A., and DE KLOET, E. R. 1992. Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. Neuroscience letters, 136(2): 189-192.

SEO, J. B., NOH, M. J., YOO, E. J., PARK, S. Y., PARK, J., LEE, I. K., and KİM, J. B. 2003. Functional characterization of the human resistin promoter with adipocyte determination-and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c and CCAAT enhancer binding protein-α. Molecular Endocrinology, 17(8): 1522-1533.

SEOW, K. M., JUAN, C. C., WU, L. Y., HSU, Y. P., YANG, W. M., TSAİ, Y. L., and HO, L. T. 2004. Serum and adipocyte resistin in polycystic ovary syndrome with insulin resistance. Human Reproduction, 19(1): 48-53.

SHOAİB, M., FARAZ, A., AHMED, S. A., JAMİL, M., and AİJAZ, Z. 2016. Diagnostic Dilemma Of Biotinidase Deficiency: Case Of A Child From Pakistan. Journal of Ayub Medical College Abbottabad, 28(4): 821-823.

SİVRİ, H. S. K., GENÇ, G. A., TOKATLI, A., DURSUN, A., COŞKUN, T., AYDIN, H. İ., and WOLF, B. 2007. Hearing loss in biotinidase deficiency: genotype-phenotype correlation. The Journal of Pediatrics, 150(4): 439-442.

STEPPAN, C. M., and LAZAR, M. A. 2002. Resistin and obesity-associated insulin resistance. Trends in Endocrinology and Metabolism, 13(1): 18-23.

STOFKOVA, A. 2010. Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity. Endocr Regul, 44(1): 25-36.

STROVEL, E. T., COWAN, T. M., SCOTT, A. I., and WOLF, B. 2017. Laboratory diagnosis of biotinidase deficiency, 2017 update: a technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. Genetics in Medicine, 19(10): 1079.

SUCHY, S. F., MCVOY, J. S., and WOLF, B. 1985. Neurologic symptoms of biotinidase deficiency: possible explanation. Neurology, 35(10): 1510-1510.

SWEETMAN, L. 1981. Two forms of biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *4*(1): 53-54.

SWEETMAN, L., and NYHAN, W. L. 1986. Inheritable biotin-treatable disorders and associated phenomena. Annual Review of Nutrition, 6(1): 317-343.

ŞENSES, D. A., ŞİMŞEK, E., YAR, N. E., KESKİN, M., ve KOCABAY, K. 2006. İnfantil spazm şeklinde başlangıç gösteren biotinidaz eksikliği. Bir vaka takdimi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 49: 121-4.

TAKAHASHİ, K., YOSHİNOYA, A., MURAKAMİ, O., TOTSUNE, K., and SHİBAHARA, S. 2000. Production and secretion of two vasoactive peptides, adrenomedullin and endothelin-1, by cultured human adrenocortical carcinoma cells. Peptides, 21(2): 251-256.

TAKAHASHI, K., TOTSUNE, K., KITAMURO, T., Masahiko, S. O. N. E., MURAKAMI, O., and SHIBAHARA, S. 2002. Three vasoactive peptides, endothelin-1, adrenomedullin and urotensin-II, in human tumour cell lines of different origin: expression and effects on proliferation.

TEASDALE, G., and JENNETT, B. 1974. Assessment of coma and impaired consciousness: a practical scale. The Lancet, 304(7872): 81-84.

THOENE, J., BAKER, H., YOSHİNO, M., and SWEETMAN, L. 1981. Biotin-responsive carboxylase deficiency associated with subnormal plasma and urinary biotin. New England Journal of Medicine, 304(14): 817-820.

TOKATLİ, A., COŞKUN, T., ÖZALP, I., and GÜNAY, M. 1992. The major presenting symptom in a biotinidase-deficient patient: laryngeal stridor. Journal of Inherited Metabolic Disease, 15(2): 281-282.

TSAO, C. Y., and KİEN, C. L. 2002. Complete biotinidase deficiency presenting as reversible progressive ataxia and sensorineural deafness. Journal of Child Neurology, 17(2): 146-146.

VAN ENGELEN, B. G., LAMERS, K. J., GABREELS, F. J., WEVERS, R. A., VAN GEEL, W. J., and BORM, G. F. 1992. Age-related changes of neuron-specific enolase, S-100 protein, and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid. Clinical Chemistry, 38(6): 813-816.

VERMA, S., Lİ, S. H., WANG, C. H., FEDAK, P. W., Lİ, R. K., WEİSEL, R. D., and MİCKLE, D. A. 2003. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. Circulation, 108(6): 736-740.

YUEKUİ, L., BARGER, S. W., LİU, L., MRAK, R. E., and GRİFFİN, W. S. T. 2000. S100β induction of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in neurons. Journal of Neurochemistry, 74(1): 143-150.

YURA, S., SAGAWA, N., ITOH, H., KAKUİ, K., NUAMAH, M. A., KORİTA, D., and FUJİİ, S. 2003. Resistin is expressed in the human placenta. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 88(3): 1394-1397.

ZİMMER, D. B., CORNWALL, E. H., LANDAR, A., and SONG, W. 1995. The S100 protein family: history, function, and expression. Brain Research Bulletin, 37(4): 417-429.

WOLF, B., HEARD, G. S., WEİSSBECKER, K. A., MCVOY, J. R. S., GRİER, R. E., and LESHNER, R. T. 1985. Biotinidase deficiency: initial clinical features and rapid diagnosis. Annals of Neurology, 18(5): 614-617.

WOLF, B., and HEARD, G. S. (1990). Screening for biotinidase deficiency in newborns: worldwide experience. *Pediatrics*, *85*(4): 512-517.

WOLF, B., SPENCER, R., and GLEASON, T. 2002. Hearing loss is a common feature of symptomatic children with profound biotinidase deficiency. The Journal of Pediatrics, 140(2): 242-246.

WOLF, B., POMPONİO, R. J., NORRGARD, K. J., LOTT, I. T., BAUMGARTNER, E. R., SUORMALA, T., and HYMES, J. 1998. Delayed-onset profound biotinidase deficiency. The Journal of Pediatrics, 132(2): 362-365.

WOLF, B., NORRGARD, K., POMPONİO, R. J., MOCK, D. M., SECOR MCVOY, J. R., FLEİSCHHAUER, K., and HYMES, J. 1997. Profound biotinidase deficiency in two asymptomatic adults. American Journal of Medical Genetics, 73(1): 5-9.

WOLF, B. 2001. Disorders of biotin metabolism. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 3: 3935-3962.

WOLF, B. and FELDMAN, G. L. 1982. The biotin-dependent carboxylase deficiencies. American Journal of Human Genetics, 34(5): 699.

WOLF, B. 2001. Disorders of biotin metabolism. The metabolic and molecular basis of inherited disease, 3: 3935-3962.

WOLF, B., GRİER, R. E., ALLEN, R. J., GOODMAN, S. I., and KİEN, C. L. 1983. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clinica Chimica Acta*, *131*(3): 273-281.

WOLF, B., GRİER, R. E., MCVOY, J. S., and HEARD, G. S. 1985. Biotinidase deficiency: a novel vitamin recycling defect. Journal of Inherited Metabolic Disease, 8(1): 53-58.

WOLF, B. 1991. Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. Journal of inherited metabolic disease, 14(6): 923-927.

WOLF, B. 1992. Disorders of biotin metabolism: treatable neurological syndromes. In: Rosenberg, R.; Prusiner, SB.; DiMauro, S.; Barchi, RL.; Kunkel, LM., editors. The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease. Stoneham, Mass: Butterworth Publishers, p. 569-581.

WOZNİAK, S. E., GEE, L. L., WACHTEL, M. S., and FREZZA, E. E. 2009. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review articles. Digestive Diseases and Sciences, 54(9): 1847-1856.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mehmet Burak COŞKUN

Uyruğu : T.C.

Doğum Yeri ve Tarihi : SEYHAN /06.04.1992

Telefon : 0542 780 10 63

e-mail : mehmetburakcoskun@yahoo.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Ramazan Atıl Anadolu Lisesi Çukurova/ADANA	2010
Üniversite	: Harran Üniversitesi /Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü Haliliye/ŞANLIURFA	2014
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi /Sağlık Bilimleri Enstitüsü /Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Haliliye /ŞANLIURFA	2016
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi /Fen Bilimleri Enstitüsü /Biyoloji Anabilim Dalı Haliliye /ŞANLIURFA	2020

TEKNİK YETENEKLER

Moleküler Biyoloji: Hücre kültürü, SDS-PAGE, Western blot, transformasyon, plazmit ve genomik DNA izolasyonu, RNA izolasyonu, transfeksiyon, immünfloresan

Hücre Biyolojisi: Hücre kültürü, Hücre canlılığı ve sitotoksisite testleri (WST-1)

Bilgisayar: Microsoft Office, Image J,

.