

164866

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

YAŞ, CİNSİYET VE MENSTRUEL SIKLUSUN  
EVRELERİNE GÖRE İNSAN SERUMEN LİPİD  
KOMPOZİSYONUNUN YÜKSEK PERFORMANS İNCE  
TABAKA KROMATOĞRAFİSİ (HPTLC) İLE  
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Muzaffer KOÇER  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR

Bu tez, İnönü Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2004  
Güz-3 proje numarası ile desteklenmiştir

## **TEŐEKKÜR**

Tez çalıŐmalarımın tım aŐamalarında bana sabır ve hoŐgörü ile yol gösteren baŐta tez danıŐmanım Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR ve ana bilim dalı başkanımız Prof. Dr. M. Engin GÖZÜKARA' ya, ihtisas eğitim süresince bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Doç. Dr. İsmail TEMEL, Yrd. Doç. Dr. Aysun Bay KARABULUT, Dr. Nurzen SEZGİN ve diğer tım hocalarıma, tez çalıŐmalarım sırasınca yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Murat Cem MİMAN ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa AKARÇAY'a, tezimin laboratuvar çalışmalarında emeği geçen ArŐ. Grv. Gülçin BEKER, Biyolog Nuran ŐİMŐEK ve Biyolog Mınir ENGÜR ile adını burada yazamadığım tım mesai arkadaşlarıma sonsuz sevgi ve Őükranlarımı sunarım.

Ayrıca, ihtisas ve tez çalıŐmalarım süresince benden desteklerini esirgemeyen sevgili eŐim ile aileme ve biricik oğluma sevgilerimi sunar, bana gösterdikleri hoŐgörü ve sabır için sonsuz teŐekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	3
<b>1-Derinin Organizasyonu ve Yağ Bezleri</b>	3
<b>A-Derinin organizasyonu</b>	3
<b>B-Yağ bezleri</b>	4
<b>Sebum oluşumu</b>	5
<b>Sebumun fonksiyonları</b>	5
<b>Sebum kompozisyonu ve deri yüzeyi lipidleri</b>	5
<b>Yağ bezlerinin kontrolü</b>	10
<b>Yağ bezi aktivitesinin ölçümü</b>	12
<b>2- Serumen</b>	13
<b>A-Anatomik, histolojik, fizyolojik özellikleri</b>	13
<b>Anatomik özellikler</b>	13
<b>Histolojik özellikler</b>	13
<b>Fizyolojik özellikler</b>	15
<b>B- Biyokimyasal içerik</b>	16
<b>Lipid olmayan içerik</b>	16
<b>Lipid içerik</b>	18
<b>C- İnsan serumeninin fonksiyonları</b>	20

	<u>Sayfa no</u>
Temizleme fonksiyonu	20
Yağlama ve kayganlaştırma	20
Antibakteriyel ve antifungal özellik	20
D- Serumenin hastalıklarla ilişkisi ve buşon oluşumu	21
3- Menstruel Siklus Fizyolojisi ve Hormonal Varyasyonlar	23
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	<b>25</b>
1- Gereçler	25
A-Kimyasallar	25
B- Diğer gereçler	25
C- Makine teçhizat	25
D- Programlar	25
2- Yöntemler	27
A- Serumen örnekleri	27
B- Serumen örneklerinin ekstraksiyonu	28
C- HPTLC metodu	28
Solventlerin hazırlanması	28
Standartların hazırlanması	28
HPTLC plakalarının aktivasyonu	30
HPTLC plakalarının hazırlanması	30
Serumen örneklerinin ve standartların tatbik edilmesi	30
Plakaların yürütme işlemi	32
Lipid bantlarının görünür hale getirilmesi	33
D- Dansitometre ile plakaların taranması	34
E- İstatistiksel analiz	34
<b>BULGULAR</b>	<b>38</b>
1- Metodun Optimizasyonuna Yönelik Çalışmalar	38
A- Serumen örneklerinin ekstraksiyonu	38
B- Polar ve nonpolar lipid bantlarının değişik çözücüler ile belirgin hale getirilmesine yönelik çalışmalar	39
C- Kontaminasyona yönelik çalışmalar	44
D- RF ve Rst değerleri	44
E- Interassay ve intraassay CV değerleri	46

	<b><u>Sayfa no</u></b>
<b>2- Yaş, Cinsiyet ve Menstruel Siklusun Evrelerine Göre İnsan Serumen Lipidlerinin Karşılaştırılması</b>	<b>46</b>
<b>TARTIŞMA</b>	<b>61</b>
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>70</b>
<b>ÖZET</b>	<b>72</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>74</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>76</b>



## TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa no</u>
<b>Tablo 1.</b> Yetişkin insan derisinin çeşitli kısımlarındaki lipid Kompozisyonu	8
<b>Tablo 2.</b> Epidermal lipid kompozisyonu	8
<b>Tablo 3.</b> Saç, stratum korneum ve kulak mumunun % mol olarak amino asit içerikleri	17
<b>Tablo 4.</b> Kulak mumunun % karbohidrat kompozisyonu	17
<b>Tablo 5.</b> Kullanılan kimyasallar ve firmaları	26
<b>Tablo 6.</b> Örneklerin ekstraksiyonu için kullanılan çözücüler	29
<b>Tablo 7.</b> Standart ile örnekler için RF ve Rst değerleri	45
<b>Tablo 8.</b> Interassay CV sonuçları	47
<b>Tablo 9.</b> Intraassay CV sonuçları	47
<b>Tablo 10.</b> Erkeklerde yaş gruplarına göre serumen lipidlerinin % kompozisyonu	54
<b>Tablo 11.</b> Kadınlarda yaş gruplarına göre serumen lipidlerinin % kompozisyonu	54
<b>Tablo 12.</b> Erkeklerde yaş gruplarına göre serumen lipidlerinin kendi aralarındaki oranlaması	55
<b>Tablo 13.</b> Kadınlarda yaş gruplarına göre serumen lipidlerinin kendi aralarındaki oranlaması	55
<b>Tablo 14.</b> Erkek ve kadınlarda yaşa göre serumen lipidlerinin % kompozisyon değişiminin karşılaştırması	56

**Sayfa no**

<b>Tablo 15.</b> Erkek ve kadınlarda yaşa göre serumen lipidlerinin kendi aralarında oranları	57
<b>Tablo 16.</b> Yaş grupları arasında cinsiyete göre serumen lipidlerinin % kompozisyon değişiminin karşılaştırması	58
<b>Tablo 17.</b> Yaş grupları arasında cinsiyete göre serumen lipidlerinin kendi aralarında oranları	58
<b>Tablo 18.</b> Menstruel siklus evrelerindeki serumen lipidlerinin % kompozisyonu	59
<b>Tablo 19.</b> Menstruel siklus evrelerine göre serumen lipidlerinin % kompozisyon değişiminin karşılaştırması	59
<b>Tablo 20.</b> Menstruel siklus evrelerine göre serumen lipidlerinin kendi aralarındaki oranlaması	60
<b>Tablo 21.</b> Menstruel siklus evrelerine serumen lipidlerinin kendi aralarındaki oranlaması	60

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1. Yağ bezinin histolojik görüntüsü	6
Şekil 2. Dış kulak yolunun anatomik yapısı	14
Şekil 3. Menstruel siklusu oluşturan hormonların profili	24
Şekil 4. HPTLC plakalarının hazırlanması	31
Şekil 5. HPTLC plakası üzerinde örnek ve standartlara ait lipid bantlarının gösterilmesi	35
Şekil 6. Standartlara ait dansitometrik görüntü	36
Şekil 7. Örneklere ait dansitometrik görüntü	37
Şekil 8. Serumen örneklerinin çeşitli çözücüler ile ekstraksiyonu	40
Şekil 9. Serumen örneklerinin çeşitli çözücüler ile ekstraksiyonu	41
Şekil 10. Hekzan/dieter/asetik asit ile çözünen örneklerin görüntüsü	42
Şekil 11. İnsan sebum ve serumenine ait HPTLC plağı	43
Şekil 12. Erkeklerde yaş gruplarına göre serumen lipidlerinin % kompozisyonu	49
Şekil 13. Kadınlarda yaş gruplarına göre serumen lipidlerinin % kompozisyonu	50
Şekil 14. Menstruel siklus evrelerinde serumen lipidlerinin % kompozisyonu	53



## KISALTMALAR

CV:	Varyasyon katsayısı
DHA:	Dehidroepiandrosteron
DHEA-S:	Dehidroepiandrosteron sulfat
DHT:	Dehidrotosteron
HPTLC:	High Performance Thin Layer Chromatography (Yüksek Performans İnce Tabaka Kromatografisi)
K:	Kolesterol
KE:	Kolesterol esteri
KS:	Kolesterol sulfat
ME:	Mum esteri
SER:	Sebum Excretion Rate (Sebum Atılım Hızı)
SK:	Skualen
SREBP:	Sterol Regulatory Element Binding Protein
SYA:	Serbest Yağ Asiti
TG:	Triaçilgliserol

## GİRİŞ VE AMAÇ

Serumen; skuamoz epitel, toz ve diğer yabancı döküntülerle birlikte iki farklı bez yapısının (serüminöz ve pilosebase) sekresyonlarının bir karışımıdır (1,2). Kıvam, görünüş ve lipid içeriğine göre yaş ve kuru olarak iki tip serumen tarif edilmiştir. Kuru serumen normal ağırlığının yaklaşık % 20'si, yaş serumen ise % 50'si kadar lipid içerir. Serumenin lipid kompozisyonu, polar (seramid fraksiyonları ve kolesterol sulfat) ve non-polar (skualen (SK), kolesterol esterleri (KE), mum esterleri (ME), triaçilgliserol (TG), serbest yağ asitleri (SYA) ve kolesterol (K)) lipidlerden oluşur (2).

Deri lipidleri, organizmayı çevreden korumada biyolojik bir bariyer olarak önemli rol oynarlar. Bu tür bariyerler içinde lipidlerin önemi, su, yabancı materyal ve mikroorganizmaları uzak tutma yeteneğinde yatar. Serumenin hasara ve mikroorganizma invazyonuna karşı korunmada önemli bir bariyer görevi gördüğü düşünülmektedir. Serumenin hidrofobik özelliği ve viskozitesi tek bir bileşenden ziyade lipid sınıflarının kombinasyonundan oluşmaktadır. Bu bileşenlerin % kompozisyon farklılıklarının serumenin fiziksel özelliklerine yansıdığı ifade edilmektedir. Hidrofobisite, yüzey gerilimini etkileyerek, deriyi dış etkenlere karşı korumada önemli bir rol oynar (3).

Serumenin lipid içeriği yağ bezleri ile epidermal lipidler tarafından oluşturulmaktadır. Asıl fonksiyonları yağlama ve korumadır. Sekresyonları sebum adını alır. Sebum yarı sıvı bir maddedir ve hemen tamamen lipidden oluşur. Sebum, bir geçirgenlik bariyeri, deri yumuşatıcı bir ajan olarak fonksiyon görür, ayrıca bakteri ve mantarlara karşı da koruyucu olduğu bildirilmiştir (4).

Genel olarak endokrin mekanizmalar yağ bezlerinin kontrolünde çok önemli rol oynarlar. Hormonların, yağ bezlerinin proliferasyonunu ve lipogenik aktivitesini etkilediği ifade edilmektedir. Androjenler, yağ bezlerinin bilinen en iyi stimülatörleridir ve puberte çağında bu bezlerin gelişimi ve büyümesinden sorumludurlar. Yağ bezlerinin büyüklüğünü, mitotik aktiviteyi ve lipogenezisi artırırılar (4).

Yağ bezlerinin kontrolünde etkileri bulunan nonendokrin mekanizmalar da mevcuttur. Retinoidlerin, yağ bezi hücrelerinin farklılaşması üzerine önemli etkileri bulunduğu belirtilmiştir. Yaş ve cinsiyetle yağ bezi aktivitesi değişiklik göstermektedir. Puberteyle beraber yağ bezi aktivitesi artmaktadır. Erkeklerde kadınlara oranla yağ bezi aktivitesinin daha fazla olduğu bildirilmiştir. Yağ bezi aktivitesinin erkeklerde 70'li yaşlara kadar değişmediği, kadınlarda ise menapozdan sonra kısmen azaldığı ifade edilmektedir (4).

Serumen kompozisyonunun tesbitine yönelik, daha önce yapılan çalışmalarda basit teknikler kullanılmış, yaş ve cinsiyete göre total lipid ve total protein düzeyleri ölçülmüş ve anlamlı farklılıklar tesbit edilmemiştir (5). Başka bir çalışmada ise cinsiyet ve mevsim ilişkisine göre total lipid, triaçilgliserol ve kolesterol düzeyleri ölçülmüş ve mevsimsel etkinin ve cinsiyetin herhangi bir fark oluşturmadığı belirtilmiştir. Ancak, kadınlarda menstruel siklusun farklı fazları dikkate alınmamıştır (6).

Bu çalışmada HPTLC metodu ile, iki biyolojik değişkenle etkilenecek şekilde (yaş ve cinsiyet) insan serumeni lipid kompozisyonunun (polar—nötral—non-polar) araştırılması, ayrıca kadınlarda, menstruel siklusun evrelerinde (menstruel, proliferatif ve luteal evre) serumen lipid kompozisyonunun karşılaştırılması amaçlandı.

## GENEL BİLGİLER

### 1) Derinin Organizasyonu Ve Yağ Bezleri:

#### A) Derinin Organizasyonu:

Deri, canlı organizma dokuları içerisinde özel bir yere sahiptir. Bir yüzü atmosfere dönükken diğer yüzü hücresel ortam ve kana dönüktür. Deri hücreleri kendilerini bu role, kendilerine özgü kimyasal bir profil geliştirerek adapte etmişlerdir (7). Deri vücudun en büyük organı olup vücut ağırlığının % 16'sını oluşturur. Yüzey alanı 1,8 m<sup>2</sup>'dir. Homeostazisin sağlanmasında ve vücudun dış etkilerden korunmasında esansiyel bir role sahiptir. Deri üç tabakadan oluşmaktadır:

- 1) Epidermis: Düzleşmiş yassı epitel hücrelerinden oluşur.
- 2) Dermis: Destek bağ doku matriksi.
- 3) Subkutanöz tabaka: Gevşek bağ doku ve yağ.

Epidermis dört farklı tabaka içermektedir: Stratum korneum, stratum granulosum, stratum spinosum ve stratum basale. Bu dört tabaka, keratinin farklı olgunlaşma safhalarından şekillenir. Keratin, epidermisin asıl hücresi olan keratinositler tarafından yapılan bir proteindir. Keratinosit olgunlaşma safhalarının her biri farklı molekül ağırlığına sahip keratin üretir. Bu nedenle epidermisin farklı katmanlarında farklı keratinler bulunur (8).

Melanositler hem dermiste hem de epidermiste bulunur. Dermis, epidermisin altında yer alır, fibroblastları, dermal dentrositleri, mast hücrelerinin lenfositleri ve makrofajları içeren sıkı destek hücre matriksinden oluşur. Subkutanöz tabaka derinin

(epidermis ve dermis) hemen altında bulunur. Çoğunlukla yağ dokudan oluşur ve dermis ile altındaki kas dokuya gevşek bir şekilde bağlanmıştır (8,9).

Deriyi besleyen arterler hipodermisin derinliklerinde yer alır ve yukarıya doğru çıkan dallar oluşturur. Bunlar iki pleksus oluşturmaktadır. Daha derinde bulunan pleksus, hipodermis ve dermisin kesiştiği kavşakta yer almaktadır ve kutanöz pleksus olarak isimlendirilir. Daha yüzeysel pleksus ise subpapillar pleksus adını alır. Kutanöz pleksusun dalları, hipodermisin yağ dokusunu, dermisin daha alt kısımlarını ve kıl follükülleri ile yağ ve ter bezlerini çevreleyen kapiller ağı besler (10).

### **B) Yağ Bezleri ( Sebaceous glands ) :**

Yağ bezleri vücut yüzeyinin hemen her tarafında dermis içinde gömülü olarak bulunurlar. Vücudun çoğu yerinde  $cm^2$ ' de 100 kadar yağ bezi vardır (11).

Yağ bezleri el ayası, ayak tabanı ve ayağın üstü hariç derinin bütün alanlarında bulunur. Sekresyonları hücrelerin tümünün yıkımı neticesinde olur (12). İnsanlarda özellikle kafa, alın ve yüz gibi alanlarda yoğunlaşmışlardır. Bu alanlarda bez sayısı  $cm^2$ ' de 400-900' e kadar çıkabilir. Bu bezlerin çoğu kıl follükülleri ile bağlantılıdır ve bu nedenle pilosebasöz bezler olarak adlandırılırlar. Her bir kıl follükülü, uzunluğunun yüzeyden 1/3 mesafesinde bir veya daha fazla yağ bezleri ile çevrilmiştir. Kıl follükülü ile bağlantılı olmayan bezler ise serbest yağ bezleri olarak isimlendirilir. Derinin vücut boşluklarına geçiş bölgelerinde (dudaklar, göz kapakları, glans penis, labium minör ve meme uçları) yağ bezleri kıl follüküllerinden bağımsız olarak bulunurlar ve direkt olarak deri yüzeyine salgı yaparlar (4,10).

Yağ bezleri, bir kanallar sistemine açılan tek bir lobul (asinus) veya lobullerin bir kolleksiyonundan oluşurlar. Pilosebasöz bezlerde bunlar, kıl follükül kanalına (pilary kanal) açılır. Serbest yağ bezleri direkt olarak deri yüzeyine açılır. Meibomian bezler hariç, yağ bezleri normal olarak innerve değildir (4, 10).

En az iki tip yağ hücresi vardır. Bunlar, asinusun lipid üreten hücreleri ile kanalın düzleşmiş yassı epitelleridir.

Lipid üreten hücreler, farklılaşma safhalarına göre üç sınıfa ayrılmaktadır: İnsanda bezin yaklaşık % 40'ını oluşturan periferal veya farklılaşmamış hücreler, yaklaşık % 40'ını oluşturan olgunlaşan hücreler ve %20'sini oluşturan nekrotik hücreler. Lipid damlacıkları periferal hücre asinuslarının alt kısmı çevresinde ara sıra görülür. Farklılaşma devam ettikçe yağ hücrelerinin büyüklüğü lipid akümülyasyonu neticesinde artar. Tamamen olgun hale geldiklerinde hacimleri 100-150 kat artmaktadır.

Olgunlaşma zonunda hücreler ne kadar lipid ile dolu iselerde aktif nükleusları halen mevcuttur. Nekrozis zonundaki hücrelerde nükleuslar piknotiktir. Bu zonda hücreler tam olarak lipid ile doludur ve bu hücreler sekresyon ürünü olan sebumu oluşturmak üzere dejenerasyon noktasında bulunurlar. Yağ bezi kanalını çevreleyen düzleşmiş yassı epitel, asinusu çevreleyen periferik zon hücreleri ile devamlılık gösterir ve kıl follikülü kanal epiteline kadar uzanır (4). Şekil 1. de yağ bezi hücresinin histolojik görüntüsü verilmiştir (13).

#### **Sebum Oluşumu:**

Yağ bezleri holokrinidir. Sekresyonları olan sebum, sebositler tamamen olgunlaştıktan sonra, lipidden zengin hücrelerin ölüp parçalanması sonucunda oluşur. Sebositler içindeki lipid damlacıkları, hücreler yukarıya doğru göç ederken büyür. Hücreler, asinusun üst bölgelerine ulaştığında ve kanala yaklaştıklarında tamamen olgun durumdadırlar. Daha sonra hücreler lizise uğrayarak içeriklerini kanal lümenine boşaltırlar. Hücre lizisinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemekle beraber lizozomların hidrolitik enzimlerini sitoplazmaya bırakması sonucunda meydana gelebileceği ifade edilmektedir (4). Holokrin sekresyonla kaybedilen hücrelerin yerine, asinusun bazal tabakasından mitozisle oluşan hücreler konur (4, 10, 11).

İnsan yağ bezlerindeki lipid damlacıkları düz endoplazmik retikulumdan kaynaklanmaktadır (14).

#### **Sebumun fonksiyonları:**

- a) Deri ve kılın lubrikasyonunu sağlar, su kaybını azaltarak deriyi korur.
- b) Deriyi bakteri ve mantar enfeksiyonlarından korur.
- c) Vücut kokusunun oluşumuna katkıda bulunur (9, 15).
- d) Vitamin D sentezini gerçekleştirir. Vitamin D' nin prekürsörü olan dehidrokolesterol yağ bezlerinde yapılır. Güneş ışığına maruz kaldığında aktif formu olan vitamin D' ye dönüşür ve vücut tarafından absorbe edilir (9).

Sebumun akışı süreklidir. Sebumun akışında ve normal salgılanmasındaki bozukluk tıkalı yağı bezlerinin kronik bir enflamasyonu olan akne gelişiminin sebeplerinden biridir. Genellikle pubertada görülür (11).

#### **Sebum Kompozisyonu ve Deri Yüzeyi Lipidleri:**

Lipidler bütün hücrelerde mevcuttur. İki fonksiyonları vardır:

- 1) Yapısal
- 2) Enerji depolanması



Şekil 1. yağ bezi hücresi histolojik görüntü ( 13)

Lipidlerin başlıca yapısal kullanımını membran oluşumu ile ilgilidir ( fosfolipidler, sfingolipidler ve steroller ).

Hayvanlar eksternal fonksiyonlar için de lipid üretirler. Bunlar eksternal olarak salgılanırlar. Bu lipidler, deride özellikle çeşitli tipteki yağ bezlerinde sentezlenirler. Deri yüzeyindeki çoğu lipid yağ bezlerinden kaynaklanır. Geriye kalan lipidlerin çoğu epidermisin stratum korneum hücrelerinden köken almaktadır. Bu kaynakların kısmi katkısı, numune alınan belirli bir bölgedeki yağ bezlerinin sayısına bağlıdır. Kafatası ve yüzde  $900/\text{cm}^2$  yağ bezi bulunurken kolda  $50/\text{cm}^2$  yağ bezi bulunur (7).

İnsan sebumundaki belli başlı lipidler triaçilgliseroller, mum esterleri ve skualendir. Deri yüzeyinden alınan sebum örneklerinde ilave lipidler de bulunmaktadır. Bunların en önemlisi bakteriyel lipazların faaliyeti sonucu triaçilgliserollerden oluşan serbest yağ asitleridir. Sterol ve sterol esterleri de yüzey lipidlerinde bulunur ancak bunlar genel olarak epidermisten köken alır (4). Tablo 1. de insan derisinin çeşitli bölümlerindeki lipid kompozisyonu verilmiştir. Sebum lipidlerinin sentezinde glikojen ve gliserofosfat substrattır (16).

Epidermal lipidler, derinin bariyer fonksiyonu açısından özellikle önemlidir. Epidermal lipidlerin kompozisyonu, permeabilite bariyerinin hassasiyetini belirler. Bu nedenle sebum lipidleri ve epidermal lipidler derinin nem dengesinin sağlanmasında da önemlidirler. Deriden lipidlerin kaybı hidrolipid film ve lipid bariyerinde değişikliklere yol açar. Deri kuru hale gelir, elastikiyeti azalır, bariyer fonksiyonu bozulur ve transepidermal su kaybı artar (17).

Epidermal lipidler kompozisyon açısından yağ bezi lipidlerinden daha komplekstir. Bazal deri hücreleri keratinize olup, stratum korneum hücreleri şeklinde olgunlaştıklarında sentezlenirler. Bu işlem sırasında epidermal lipidler, yağ bezi lipidleri ile ya deri yüzeyinde yada yağ kanalında lateral olarak karışırlar (18). Epidermal lipid kompozisyonu epidermisin çeşitli katmanlarında farklılık gösterir (Tablo 2.).

Bu lipidler, derinin alt katmanlarında kısmen intrasellüler lipid matriksini, stratum korneum da ise lipid bariyerini oluştururlar. Katmanlar arasında en büyük lipid kompozisyon farklılığı polar lipidlerde (özellikle fosfolipid) görülmektedir. Polar lipidler, bazal tabakada lipid kompozisyonunun %45' ini oluştururken, bu oran stratum korneumda % 5'e gerilemektedir. Seramidlerin dağılımı ise fosfolipidlerin tersidir (18). Stratum korneum lipid kompozisyonu yüzeyden derinlere inildikçe değişmektedir



**Tablo 1. İnsan yetişkin derisinin çeşitli kısımlarındaki % lipid kompozisyonu (7) :**

<b>Lipid Kompozisyonu</b>	<b>Sebum</b>	<b>Epidermis</b>	<b>Yüzey Lipidleri</b>
Skualen	12	< 0.5	10
Kolesterol esterleri	< 1	10	2.5
Kolesterol	0	20	1.5
Mum esterleri	23	0	22
Triaçilgliserol	60	10	25
Monoaçilgliserol	0	10	10
Serbest Yağ Asiti	0	10	25
Gliko ve fosfolipid	0	30	0
Bilinmeyen	5	10	4

**Tablo 2. Epidermal % Lipid Kompozisyonu (7) :**

<b>Lipidler</b>	<b>Basal Tabaka/ Str Spinosum</b>	<b>Stratum Granulosum</b>	<b>Stratum Korneum</b>
Polar Lipidler	45	25	5
Kolesterol Sulfat	3	6	2
Nötral Lipidler	51	57	78
Serbest Steroller	11	12	14
Serbest Yağ Asiti	7	9	19
Triaçilgliserol	12	25	25
Sterol/Mum Esteri	5	5	5
Skualen	5	5	5
n - Alkanlar	4	4	6
Sfingolipidler	7	12	18
Glikozilseramidler	4	5	Eser
Seramidler	4	9	18

Stratum korneumun en üst tabakasında serbest yağ asiti seviyesi en üst, kolesterol ve seramid seviyeleri en alt seviyededir. Kolesterol sülfat düzeyi stratum korneumun derinliği ile değişmemiştir (19).

Skualen ve mum esterleri çoğunlukla yağ bezi orjinlidir. Triaçilgliseroller hem epidermis hem de yağ bezlerinden kaynaklanmaktadır. Serbest yağ asitleri trigliseritlerin ya mikroorganizmalar veya sebasöz kanaldaki esterazlar tarafından lipolizisi neticesinde şekillenmektedir. Kolesterol esterleri ve kolesterol çoğunlukla epidermal kaynaklıdır (20).

Deri lipidlerinin iki önemli özelliği vardır: Kompleksite ve olağan dışılık. Deride olağan dışı lipidler meydana gelir. Kolesterol sentezi sırasında belirli ara maddeler birikir. 30 C'lu bir triterpenoid hidrokarbon olan skualen böyle bir ara maddedir. İnsan sebumunda skualen önemli bir bileşendir ve köpek balığı karaciğeri hariç normal olarak hayvan dokularında büyük konsantrasyonlarda bulunmaz. Bununla beraber hemen bütün dokular skualen sentezlerler, fakat süratle kolesterole çevrilirler. Erişkin insan derisinde skualen birikir. Deri, aynı zamanda olağan dışı bileşikler de sentezler. Örneğin mum esterleri sadece eksternal ekskresyon içindir. Mum esterleri, mono ve diesterler olarak iki şekilde bulunurlar. Mum esterleri, insan sebumunun belli başlı komponentidirler. Mumların ekskresyonu hayvan kürk veya tüylerinin ıslanmasını önler. Bu fonksiyonların insanlar için önemli olup olmadığı bilinmemektedir (7).

Triaçilgliseroller, insan sebumunun % 60'ını oluşturur. Yağ bezlerinin kanalında ve deri yüzeyinde lipazlar tarafından bir miktar hidrolize edilerek serbest yağ asitleri, mono ve diaçilgliseroller ve gliserol meydana getirirler. Triaçilgliseroller ve bunların hidroliz türünleri sadece insan deri yüzeyi lipidlerinde bulunur (7).

Sebumdaki mumların ve triaçilgliserollerin yağ asidi kompozisyonu, çoğunluğu yağ bezlerine özgü olan bir yağ asidi karışımını kapsar. Bu yağ asitleri, tek veya çift sayıda karbon içeren düz zincirli formlar ile tek veya birkaç metil grubu içeren dallı zincirlerden ibarettir. Çoğu türün sebumunda bu zincirlerin büyük bir bölümü tekli doymamıştır. Çift bağlar çeşitli pozisyonlarda olmasına karşın tekli doymamış yağ asitleri ile paralel olarak genellikle  $\Delta 9$  pozisyonunda yer almıştır. İnsan sebumunda olağan dışı olarak tekli doymamış yağ asitleri  $\Delta 6$  pozisyonunda çift bağ içermektedirler (4). Yağ bezleri, serbest yağ asitlerini selektif olarak kullanmaktadırlar. C 16:0, mum esterlerinin sentezinde tercihen kullanılan yağ asididir. Linoleik asiti  $\beta$ - oksidasyona uğrayan muhtemelen tek yağ asididir. Bu hücrelerde mum esterlerinin sentezi ile  $\beta$ - oksidasyon aktivitesi arasında bir korelasyon mevcuttur (21).

$\Delta$ -6 desaturaz insan yağ bezlerinde bulunan en önemli yağ asidi desaturazıdır ve sebasöz tip reaksiyon (palmitatın tekli doymamış yağ asidi sapienata (16:1  $\Delta$ :6) çevrilmesi) ve çoklu doymamış yağ asiti tip (linoleate ve  $\alpha$ -linoleatın uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerine dönüştürülmesi) reaksiyonları katalize eder. Sapienat, insan sebumunda en çok bulunan yağ asitidir ve sadece insana özgüdür. Yağ bezleri ortamının sebasöz tip reaksiyonun katalizine müsaade ettiği, ve çoklu doymamış yağ asiti tip reaksiyonun katalizini sınırladığı düşünülmektedir (22).

Derinin çok büyük sayıda farklı yağ asitleri sentezleyebilmesi nedeniyle, enzim konsantrasyonunda, pH da, vücut ısısında veya kofaktör konsantrasyonunda küçük bir değişiklik, her bir yağ asidinin konsantrasyonunu önemli ölçüde değiştirebilir ve böylece o ferдин kimyasal imzası oluşur. Bu her fert için farklı olan kokudur (7).

#### **Yağ bezlerinin kontrolü :**

Sebum sekresyonu, sebasöz hücrelerin proliferasyonuna, farklılaşmasına, olgunlaşmasına ve bu hücrelerin lipid üretme kapasitesine bağlıdır. Bu farklı işlemleri etkileyen faktörler bu nedenle sebum sekresyonunu değiştirebilir.

#### **A) Endokrin Kontrol:**

1) Androjenler: Androjenler, sebasöz bezlerin en iyi bilinen stimülatörüdürler ve muhtemelen pubertede sebasöz bezlerin gelişimi ve büyümesinden sorumludurlar. İnsanlarda testislerin çıkarılması bezlerin atrofisine ve sebum sekresyonunda azalmaya yol açar. Benzer etkiler antiandrojenler tarafından da gösterilir. En etkin androjenler, testosteron ve dehidrotestesteron (DHT) gibi 17  $\beta$ -hidroksi grubuna sahip olanlardır. Dehidroepiandrosteron (DHA), androstenedion ve androsteron nisbeten daha az güçlüdür. DHT doku düzeyinde aktif bir androjen olduğu düşünülmektedir. Deri, testosteronu DHT ve 5- $\alpha$  metabolitlerine çevirme yeteneğine sahiptir. Bundan sorumlu enzim 5  $\alpha$ -redüktazdır ve başlıca apokrin ter bezlerinde ve yağ bezlerinde lokalizedir (4). Yağ bezi büyüklüğünü, hücre bölünmesini ve lipogenezisi arttırarak etkilerini göstermektedirler (4, 23). Yağ bezlerinde sebum lipid sentezini SREBP (sterol regulatory element binding protein) yolu ile regüle etmektedirler (24).

2) Östrojenler: Androjenlerin aksine östrojenler yağ bezi aktivitesini insan ve deney hayvanlarında inhibe etmektedir. Östrojenler yağ bezlerini, ya hipofiz gonodotropinlerini baskılayıp androjenlerin üretimini inhibe ederek veya testosteronun testosteron bağlayan globuline bağlanmasını arttırarak inhibe ederler (4). Östrojenler, sebum üretimini (hücre bölünmesini değil) intrasellüler sentezi etkileyerek

azaltmaktadır (23). Hipofizektomi ve adrenalektomi yapılan dişi ratlarda östradiol, sebasöz bez büyüklüğünü azaltmaktadır. Ayrıca sebun üretiminde de önemli bir azalmaya yol açmaktadır (25).

3) Progesteron: Progesteronun yağ bezi üzerine etkisi tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar, ratlarda progesteronun yağ bezi sekresyonu ve büyüklüğünü arttırdığını bildirmektedir. Bazıları ise erkekte progesteron uygulaması sonrası sebasöz bez aktivitesinde bir değişiklik tesbit edememişlerdir (25).

4) Glukokortikoidler: Yağ bezlerine etkileri açık değildir (25).

5) Tiroid hormonları: Tiroid bezi, yağ bezlerinin aktivitelerinin muhafazasında rol almaktadır. Tiroidektominin yağ bezlerinin atrofisine ve sebun sekresyonunda azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (25).

6) Diabetes mellitus: Diyabetik rat derisinin lipid sentezi azalmaktadır ve insulin uygulaması, lipid sentez kabiliyetini normale döndürmektedir. İnsulin uygulaması ile diyabetik ratlarda azalma gösteren deri gliserol-3-fosfat düzeyinin normale döndüğü bildirilmiştir (26).

7) Hipofiz hormonları: Hayvanlar ve insanlarda yağ bezi aktivitesi hipofiz bezinin yokluğu veya hipofonksiyonu nedeniyle azalmaktadır (27). Gonadotropik hormonlar, erkeklerde gonadal aktiviteyi stimüle ederek sebun sekresyonunu arttırmaları. TSH da benzer şekilde etki gösterir. Pro-opiomelanokortin peptidlerin (ACTH,  $\alpha$ -MSH, ve  $\beta$ -lipotropin) insanlarda sebotropik olduğunu doğrulayan bir kanıt mevcut olmamasına rağmen, ratlarda sebotropik etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir (4, 25).

B) Non-Endokrin faktörler:

1- Retinoidler: Normal konsantrasyonlarda vitamin A, *in vitro* sebosit proliferasyonu, sentez aktivitesi ve farklılaşması için esansiyeldir (28). Diğer yandan retinoidler, (13-cis retinoik asit, all-trans-retinoik asit) sebosit proliferasyonunu, hücre bölünmesi ve lipogenezis oranını azaltmaktadır (29, 30, 31).

2- Diğer Non-Endokrin Faktörler: Deri ısısındaki değişiklikler sebun sekresyon hızını (SER) etkilemektedir. Bu değişiklik her bir °C için % 10 dur. Sebun üretim hızı sirkadyen bir ritme sahiptir. En büyük SER uyku saatlerinde ortaya çıkmaktadır (4). Ratlarda SER direkt olarak vücut büyüklüğü ile orantılıdır. Rat derisinden lipidler tekrarlanan şekilde uzaklaştırıldığında, uzaklaştırma sıklığına bağlı olarak SER artmaktadır (25).

Deri yüzey numunesinin sık alınması, uzaklaştırılan lipidin daha fazla oranda yerine konmasına neden olmaktadır. Sık lipid numunesinin alınmasının yol açtığı replasman lineer bir patern izlemez. Lipid replasman hızı zamanla azalmaktadır (32).

Obez ve obez olmayanlarda açlığa bağlı olarak benzer şekilde sebum üretimi azalmaktadır (33, 34).

Yağ bezi aktivitesi, yaşa ve cinsiyete göre farklılıklar göstermektedir (27, 35).

#### **Yağ Bezi Aktivitesinin Ölçümü :**

a) Bez Büyüklüğü: Zaman alıcı, yorucu ve güvenilir olmadığı için artık kullanılmamaktadır.

b) Hücre transizyon zamanının ölçümü: Sebum sentezi ve ekskresyonu arasında ortalama 8 günlük bir süre olduğu, bu zamana germinatif hücre bölünmesi ve farklılaşması arasında geçen sürenin de eklenmesiyle sebumun tam transizyon zamanının 13-14 gün civarında olduğu bildirilmektedir.

c) Lipid üretimi: Sebum, yağ bezlerinin en belli başlı sekresyon ürünü olduğundan bu bezlerin lipid sentezleme kapasitesi, sekresyon aktiviteleri konusunda iyi bir indeks oluşturur.

d) Sebum kompozisyonu: Deri yüzey lipidlerinin kompozisyonundaki değişiklikler yağ bezi aktivitesinin bir indeksi olarak kullanılmaktadır. Yüzey lipidlerinin skualen içeriğinin yağ bezi aktivitesinin ve bez büyüklüğünün bir indikatörü olarak kullanılabilceği bildirilmiştir. Sebumun mum esteri içeriğinin veya mum esteri / sterol esteri oranının sebasöz bez aktivitesini yansıtabileceği belirlenmiştir. Yağ bezlerinin aktivitelerinin artmış olduğu periyotlarda mum esterlerini sentezlemeleri beklenir. Bu dönemlerde mum esterlerinin oranı, çoğunlukla epidermis tarafından sentezlenen sterol esterlerinden daha fazla olması beklenir.

e) Sebum sekresyonu: Gayet basit olmaları ve sebum çıkışını gerçekten ölçmeleri nedeniyle deri yüzeyindeki sebum sekresyonunu ölçen metodlar, yağ bezi aktivitesini ölçen diğer metodlara göre daha avantajlıdır (32). Sebum sekresyon hızı (SER) ölçüm teknikleri şunlardır:

1) Gravimetrik teknik: Örnek alınacak bölge temizlenir ve 3 saat boyunca kağıt şeritler bastırılarak sebum elde edilir. Elde edilen sebum, tartılır ve numunenin alındığı alan ile toplam zamana bölünerek SER elde edilir.

2) Fotometrik teknik: Deri yüzey lipitlerinin ölçümü için dizayn edilmiş bir enstrüman olan lipometre (650 nm de sabit dalga boylu spektrofotometre) ile ölçüm yapılır (36).

## **2- Serumen :**

Serumen yada kulak mumu, dış kulak yolu epitelinin (yassı epitel) stratum korneum tabakasından dökülen hücreler, toz ve diğer yabancı döküntülerle birlikte serüminöz ve sebasöz bezlerin sekresyonlarının kombine bir karışımıdır (37, 38).

Başka bir görüşe göre serumen, yalnızca dış kulak yolunun serüminöz bezlerinin sekretuar üretimini göstermektedir ve sadece kulak mumunun bir bileşenidir. Kulak mumu, derinin diğer tabakalarına ait ölü yassı hücreleri, sebum, ter ve değişik yabancı maddeleri içermektedir. Bu yabancı maddeler, (saç spreyi, şampuan, kozmetikler, banyo yağı, traş kremi, kir, v.b.) dışardan gelmektedir. Kulak mumunun en önemli bileşeni keratindir (39). Bu kısımdan itibaren konuyla ilgili olan bütün ifadelerde serumen tabiri kullanılacaktır.

### **A-Anatomik, Histolojik, Fizyolojik Özellikleri :**

#### **Anatomik Özellikleri :**

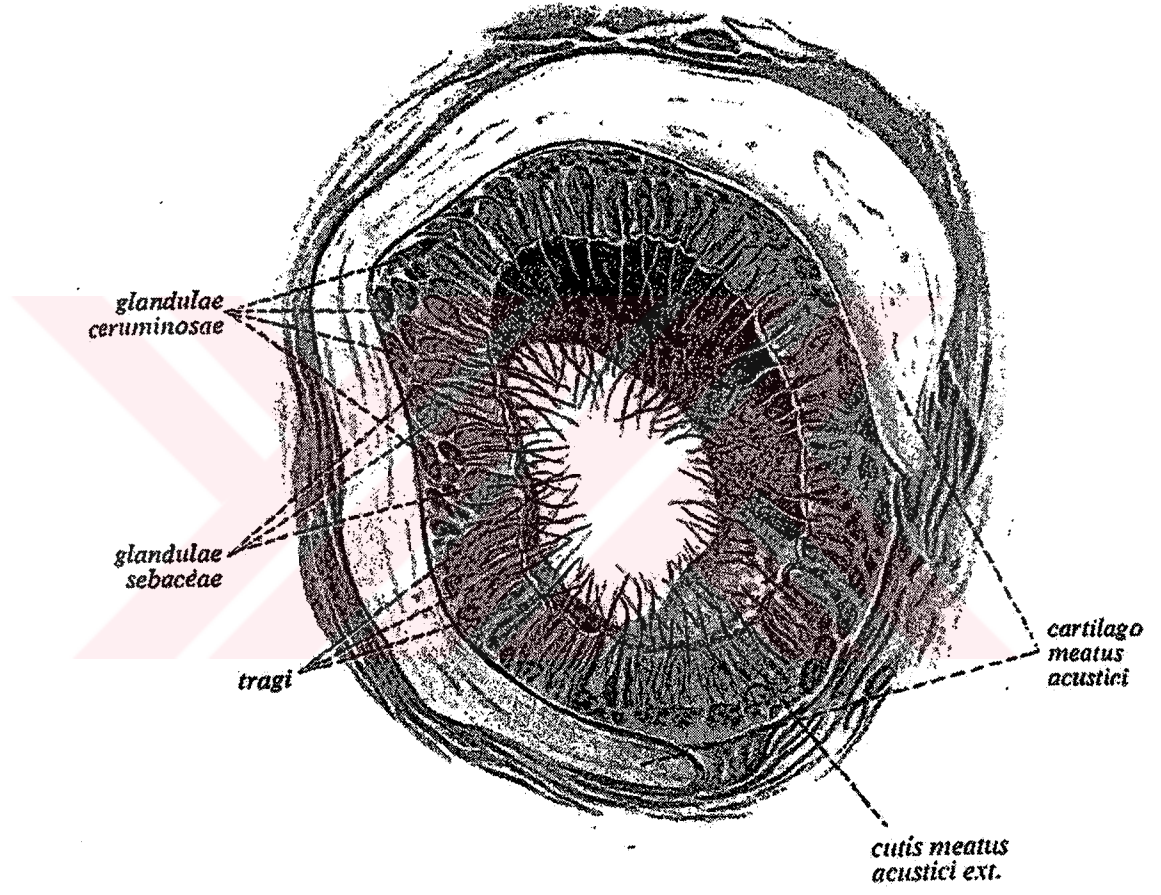
Dış kulak, aurikula ile timpan zarına doğru bir geçiş olan dış kulak yolundan oluşmaktadır. Kanalin çapı değişken olmakla beraber ortalama 7-9 mm dir ve uzunluğu ortalama 3 cm dir. Dış kulak yolunun dış 1/3' ü aurikular kıkırdığın bir uzantısından, iç 2/3' lük kısmı ise kemik yapıdan oluşmaktadır. Kemik ve kıkırdak kısımlar yapısal farklılıklar göstermektedir. Kemik kısım, öne ve aşağıya doğru kavisli olup, orta kısımda bir isthmus oluşturmak üzere daralmaktadır. Kanalin kıkırdak kısmını örten cilt, gevşekçe tutunmuştur ve çok sayıda kıl follikülleri ile serüminöz ve yağ bezi içermektedir (40). Şekil 2'de dış kulak yolunun anatomik yapısı görülmektedir (41).

#### **Histolojik Özellikleri :**

Dış kulak yolunun kıkırdak kısmının içerdiği kıllar, apokrin bezler ve yağ bezleri birlikte apopilosebasöz yapıyı oluşturmaktadır.

Epiderminin içeride oluşturduğu invaginasyon, kıl folikülünün dış duvarını, kıl gövdesi ise iç duvarı oluşturmaktadır. Bu iki yapının arasındaki boşluk folliküler kanal olarak adlandırılmaktadır .Yağ ve apokrin bezlerin alveolleri, kısa ve düz boşaltma kanalları aracılığıyla folliküler kanallara boşalmaktadır (42).

Dış kulak yolu derisi, salgı sistemiyle birlikte özel bir öneme sahiptir. Modifiye apokrin (serüminöz) ve yağ bezleri olarak iki tip salgı bezi içermektedir. Yağ bezlerinin salgı hücreleri homojen, modifiye apokrin bezlerin salgı hücreleri ise heterojen salgı



**Şekil 2. Dış kulak yolunun kıkırdak bölümünden geçen dilim şeklindeki enine kesitin sekiz defa büyütülmüş görüntüsü (41)**

granülleri içermektedir. Apokrin bezler, apokrin ve ekrin sekresyonların her ikisine de katkıda bulunmaktadır (43).

Ekrin sekresyon ile salgının dışa verilmesi sitoplazmada kayba neden olmaz, hücre ve salgı granülü zarı bir noktada kaynaşıp yırtılırlar ve granül içeriği lümene verilir. Bu olay, ekzositoz olarak tanımlanır (44). Apokrin sekresyonda ise sitoplazma bir miktar yitime uğrar, salgı apikal sitoplazma ucuna toplanır ve bu kısım daralır. Salgı maddesi burdan koparak ayrılır (45).

Kısa, orta ve uzun olmak üzere üç tip salgı yapan hücre bulunmaktadır. Bu üç hücre birbirinden bağımsız ayrı ayrı hücreler olarak düşünülürse, bunların çok sayıda ara formu olduğu da kabul edilebilir. Bunların tek bir hücreye ait üç ayrı form olma ihtimali daha geçerli olabilir. Çünkü, uzun hücrelerin apokrin sekresyonlarından sonra yükseklik azalmakta ve hücre yüksekliği dinlenme dönemine kadar azalmaya devam etmektedir.

İnsan serüminöz bezlerinin küçük hücreleri, istirahat döneminde bulunurlar ve yalnızca ekrin sekresyon yapmaktadırlar. Uzun hücreler ise aktif salgılamada rol oynamakta ve aynı zamanda apokrin sekresyon da yapmaktadırlar (46).

Yaş ve kuru tip serumen salgılayan bezlerin her ikisi de, uzun, orta ve kısa boylu hücreleri içermektedirler. Her iki bez tipinde uzun ve orta boylu hücrelerde morfolojik açıdan farklılıklar göze çarpmaktadır. Uzun ve orta boylu hücrelerin golgi cisimcikleri, yaş tipte iyi gelişirken, kuru tip bezlerin küçük hücrelerinde iyi gelişme göstermektedir. Yaş tip bezler, ekrin sekresyonla karakterize iken kuru tip bezlerin sekresyonu açık değildir. Bu farklılıklar, yaş ve kuru serumenin kompozisyon farklılıklarını oluşturmaktadır (47).

Serüminöz bezler, adrenalinin lokal etkisiyle tepki vermekteler. Bu etki adrenalinin  $\beta$ -blokaj etkisiyle değil,  $\alpha$ -blokaj etkisiyle gerçekleşmektedir. Serüminöz bezlerin  $\alpha$ -adrenerjik reseptörlere sahip olduğu gözlenmektedir (48).

#### **Fizyolojik Özellikleri :**

İnsan serumeni, değişik renklere olabilmektedir. Altın sarısı, açık ve koyu kahverengi ve siyah renkli olabilir. Serumenin renginden sorumlu pigment henüz bilinmemektedir (39).

İnsan serumeni, kuru ve yaş tip olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Asyalılar, diğerlerinden farklı tipte serumene sahiptirler. Serumen, yalnızca asyalılar da kuru, pul



pul altın sarısı renkte keratin skuam karakterdedir. Diğer ırklarda serumen, kahverengi ve yaştır. Yaş serumen, yumuşak ya da sert olabilmektedir.

Yumuşak ve sert serumen, farklı özellikler göstermektedir :

1 – Yumuşak serumen sıklıkla çocuklarda görülürken, sert serumen daha çok erişkinlerde görülmektedir.

2 – Yumuşak serumende squamöz keratin tabaka küçük iken, sert serumende koyu ve daha belirgindir.

3 – Korneositler, yumuşak serumende yaygın iken, sert serumende bulunmamaktadır.

4 – Sert serumen, kümelenmeye daha uygundur ve klinik uygulamalarda hemen daima görülmektedir.

Serumen gelişiminin gerisinde kalıtsal mekanizmalar olduğu ve kuru serumen allelinin yaş allele göre resesif olduğu bildirilmiştir (39).

İnsan serumeninin, 16. kromozomun perisentromerik bölgesinde lokalize olduğu ileri sürülmüştür. Serumen lokalizasyonunun belirlenmesinin, apokrin bezlerin gelişimiyle ilgili antropolojik, fizyolojik ve patolojik çalışmaların anlaşılmasına yardımcı olabileceği belirtilmiştir (49).

## **B -Biyokimyasal İçerik :**

### **Lipid Olmayan İçerik :**

Yaş ve cinsiyete göre değerlendirildiğinde, çocuklarda serumenin total protein miktarları erişkinlere oranla hafifçe yüksektir. Erişkinlerde yaş ve cinsiyete göre total protein miktarları anlamlı değişiklikler göstermemektedir (5).

İnsan serumeni, sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum, bakır ve monosakkaritler ( özellikle glukoz ve fruktoz ) içerir fakat demir içermemektedir (50).

İnsan serumeninin başlıca amino asitleri glisin, glutamik asit ve serindir. İnsan serumeninin amino asit içeriği, saç ve stratum korneum ile paralellik göstermektedir ( Tablo 3 ). Serumen, saç ve stratum korneuma göre daha yüksek seviyelerde alanin, glisin ve fanilalanin içerirken, daha düşük seviyelerde arjinin, serin, tirozin ve sistein içermektedir.

İnsan serumeni, basit şekerleri de içermektedir (tablo 4). Diğerlerine göre galaktozamin, galaktoz, glukozamin, mannoz ve fukoza daha bol miktarlarda bulunmaktadır. Şekerlerin ve amino asitlerin tespitinin, patojenlerin, tümörlerin ve metabolik hastalıkların tanınmasında avantaj sağlayacağı düşünülmektedir (51).

**Tablo 3 . S a, s tratum k orneum v e k ulak m umunun % m ol o larak a mino a sit içerikleri:**

Amino asit	Sa	Stratum Korneum	Kulak Mumu
Lizin	2.5	4.2	3.9
Histidin	0.9	1.5	0.6
Arjinin	6.5	3.8	1.6
Aspartik Asit	5.4	7.9	8.4
Treonin	7.6	3.0	5.0
Serin	12.2	13.6	10.0
Glutamik Asit	12.2	12.6	11.3
Prolin	8.4	3.0	6.0
Glisin	5.8	24.5	28.7
Alanin	4.3	4.4	7.1
Valin	5.5	3.0	4.3
Metionin	0.5	1.1	0.5
İzolösin	2.3	2.7	2.6
Lösin	6.1	6.9	5.2
Tirozin	2.2	3.4	0.1
Fenilalanin	1.7	3.2	4.8
Half-sistin	15.9	1.2	0.0

**Tablo 4 . Kulak mumunun % karbohidrat kompozisyonu:**

Şeker	Yüzde Kompozisyon
Fukoz	3.42
2-Deoksi glukoz	4.60
Galaktozamin	42.57
Glukozamin	16.07
Galaktoz	15.75
Glukoz	13.15
Mannoz	4.41

### **Lipid İçerik :**

Çocuklarda yüzeye yağ salgılanmasının düşük olduğu ve puberte başlangıcı ile bu salgının artarak yetişkinde sabitleştiği ifade edilmesine rağmen çocukların erişkinlere oranla hafifçe yüksek total lipid miktarlarına sahip olduğu bildirilmektedir. Hem çocuk hem de erişkinlerde cinsiyete göre total lipid miktarları anlamlı değişiklikler göstermemektedir (5).

Seks hormonlarının serumenin lipid içeriğinin üretim hızında minör bir rol oynadığı ve cinsiyetin bir faktör olmadığı bildirilmiştir. Mevsimsel açıdan triaçilgliserol düzeyinin kış aylarından yaz aylarına doğru giderek azaldığı bilinmektedir. Yaz aylarında sıkça görülen dış kulak yolu enfeksiyonlarının artışının bu düşük triaçilgliserol düzeyi ile ilgili olabileceği ifade edilmiştir (6).

Kuru serumenin yaklaşık ağırlığının % 20' sini, yaş serumenin ise % 50' sini lipidler oluşturmaktadır (2).

**Serumen kompozisyonuna yönelik kalitatif ve kantitatif olarak yapılan birtakım çalışmalarda farklı görüşler bildirilmektedir :**

Kantitatif sonuçlar gösterilmemesine rağmen kuru tip insan serumeninin SK, KE, ME, TG, SYA ve K içerdiği, yaş serumenin ME ve KE içermediği ve ilave olarak çok sayıda nonpolar komponent içerdiği ortaya konulmuştur. SK ve tanımlanamayan lipid bantlarının yaş kulak mumunun ana bileşenleri olduğu belirlenmiştir (52).

İnsan serumeni, yağ asitlerini ve alkolleri içermektedir. Bu gruplar düz zincirli doymuş, düz zincirli doymamış, dallı zincirli doymuş ve doymamış asitlerin hepsini içermektedir. Yağ asitleri total lipidlerin % 59,5'lik kısmını oluşturmaktadır. Önemli yağ asitleri 14,15,16 ve 18 karbon atomlarına sahip düz zincirli ve çoğunluğunu doymuş ya da  $\Delta$ -6 pozisyonunda çift bağ içeren tekli doymamış yağ asitleri oluşturur. Düz zincirli yağ asitleri, asit kısmının % 88,9'unu ve doymuş asitlerden oluşan total asit kısmının % 52' sini oluşturur. Dallı zincirli asitlerin çoğu doymuştur ( % 81 ).

Yağ alkolleri, total lipidlerin % 10,1'ini oluşturmaktadır ve çoğunlukla düz zincirler içermektedir. Diğer önemli bileşenler ise K (% 5.1) ve SK (% 13.1) olarak bildirilmektedir (53).

Serumenin önemli bileşenlerinin doymuş ve doymamış uzun zincirli yağ asitleri, alkoller, SK ve K' den oluştuğu, fakat benzer metodlar kullanılmasına rağmen SK (% 12-20) ve K (% 6-9) haricinde yağ asitleri ya da alkolleri için güvenilir yüzde istatistik çıkarmanın imkansız olduğu da bildirilmektedir. Bunun sebebi olarak, bir

kısım kozmetik yağlar, yüze sürülen ilaçlar ve çeşitli maddelerin serumenin hidrokarbonlarını ortadan kaldırabileceği ifade edilmiştir (38).

Süregelen çalışmalar içerisinde serumen kompozisyonuna yönelik en hassas tekniğin Flash Pyrolysis–Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi olduğu bildirilmiştir. Başlıca 152 farklı madde tesbit edilmiştir. Çözünen kısmın bileşenleri, basit aromatik hidrokarbonlar, SK, tam olarak identifiye edilmemiş diterpenoidler ve steroidlerin bir karışımıdır. Çözünmeyen kısımda ise basit aromatik bileşikler (benzenler, fenoller ve benzonitriller), 5–25 karbon atomuna sahip düz zincirli hidrokarbonlar, yüksek miktarda nitrojen bileşikleri ve düşük öneme sahip diterpenoidler belirlenmiştir.

Çözünen ve çözünmeyen kısımların her ikisi içinde hidrokarbonların çok önemli bileşikler olduğu ve bu hidrokarbonların düz zincirli normal alkanlar ve normal alkan serileri olduğu bildirilmektedir (54). Normal alkanlar, bitkilerde ve böcek türlerinde görülmektedir. Memelilerde alkan sentezinin mümkün olmadığı ve insan derisinde üretiminin imkansız olduğu belirtilmiştir. Bu bileşiklerin sistemik yoldan ziyade etraftan direk bulaşma ile (çeşitli yiyeceklerde katkı maddesi olarak kullanımı, cilde sürülen yumuşatıcı kremlerin, çeşitli macun ve merhemlerin formüllerine katılarak ) kazanıldığı bildirilmektedir (55).

Yaş serumenin kantitatif olarak lipid kompozisyonu belirlenmiştir. Yaş serumenin SK (%6,4), KE (%9,6), ME (%9,3), TG (%3), SYA (%22,7), K (%20,9), seramidler (%18,6), K-S (%2) ve çok sayıda belirlenmemiş polar bileşenlerden (%7,5) oluştuğu bildirilmektedir. Bu lipidlere ilaveten sadece sabunlaşmadan sonra tesbit edilebilecek kovalent olarak bağlı %0,9 luk ilave bir lipid içeriği de bildirilmektedir. Bunlar, iki olağan dışı seramid (%63,4), mum hidroksi asitleri (%27,7) ve nonhidroksi yağ astilerinden (%8,8) oluşmaktadır. Serumene yağ bezlerinin katkısının, lipidlerde %15 ile %91 (ortalama  $41 \pm 20$  ) arasında değiştiği ve epidermal katkının ise %21 ile %70 (ortalama  $41 \pm 17$  ) arasında olduğu belirlenmiştir. Genel olarak epidermal lipidler ve sebumun serumen lipidlerinin çoğunluğunu oluşturduğu kabaca söylenebilir, serüminöz bezlerin de serumene küçük bir katkısı olabileceği ihtimali de bulunmaktadır (2).

Köpek serumeni, K, KE, SYA, TG, çeşitli mumlar, lesitin ve sfingomyelin içermektedir. İnsan serumeninde fosfolipid, lesitin ve sfingomyelin net olarak bildirilmemiştir. Buna rağmen insan ve köpek serumeninin lipid içerik ve

kompozisyonu benzer olarak tesbit edilmiştir ve köpek serumeni ile yapılacak çalışmaların insanlar içinde yol gösterici olabileceği ileri sürülmüştür (3).

### **C-İnsan Serumeninin Fonksiyonları:**

#### **Temizleme Fonksiyonu:**

Vücudun diğer kısımlarındaki derinin epitelinde, banyo yapma, elbise giyerken oluşan temas ve uyuma gibi etkenlerle oluşan sürtünme nedeniyle epitel tabakası dökülmektedir. Dış kulak yolunda bu tür döküntüler sınırlıdır ve sürtünmeyle olmamaktadır. Kulak kanalı gelişmiş hücre migrasyon yeteneğine sahiptir. Migrasyon mekanizması, yüzeydeki epitel döküntüsünün laterale doğru hareketiyle timpan zardan kulak dışına doğru gerçekleşmektedir (39).

Zardan, dışa yani kıkırdak kısma doğru göç özelliği sayesinde zarın ve kemik kanal cildinin kendini temizleme olanağı bulunmaktadır (40). Hareket kitleseldir ve günlük hızı yaklaşık 1 mm dir. Ayrıca normal ve timpanoplastili timpanik membranlar arasında epitel göç hızı açısından anlamlı bir fark bulunmamaktadır (56). Migrasyon hareketi ile atılmadan önce epitelin toz, bakteri ve mantar ile kaplı yapışkan bir madde olmasını sağlayan buharlaşma meydana gelmektedir (1).

#### **Yağlama ve Kayganlaştırma (Lubrikasyon):**

Yağlama, dış kulak yolu derisinin kaşınma ve tahrişini önlemektedir. Yağlama özelliği yağ bezleri ile üretilen sebumun yüksek lipid içeriğinden dolayı olmaktadır (57).

Yağ bezleri, kıl follikülleri ile yakından bağlantılıdır. Sebum, kıl folliküllerine akar, oradan deri yüzeyine ulaşır. Burada deri yüzeyini ve kılı yağlayarak su geçirmezlik sağlar, dehidrasyon ve çatlamalara karşı derinin korunmasına yardım eder (8). Kanalın lipid kaplı koruyucu tabakasının uzaklaştırılması sonucu bakteriler apopilozebasöz ünitenin içine girebilir ve dış kulak yolunun bakteriyel enfeksiyonuna neden olabilir (58).

#### **Antibakteriyel ve Antifungal Özellikleri:**

Serumen, enfeksiyona karşı koruyucu rol oynamaktadır. Birincil olarak mevcut mekanik, yağlı bariyer ve derinin mikrobiyal florası koruyucu rol oynamaktadır (59).

Ortalama 1 mL serumen süspansiyon  $10^6$  mikroorganizma içermektedir. Serumenin gösterilen florası monomikrobiyal (%33,3) ve polimikrobiyal (%66,6) ajanlardan oluşmaktadır. Monomikrobiyal ajanlar, Staf. epidermidis, Corynebacterium, Staf. aureus ve Staf. saprophyticum' dur. Polimikrobiyal ajanların

çoğunluğunu Staf. epidermidis ve Corynebacterium oluşturmaktadır. Konsantrasyonlarına göre Staf. epidermidis (%50-70) daha baskındır ve bunu Corynebacterium (%40-60) takip etmektedir (37).

Dış kulak yolunun serumen örtüsü asidik olduğundan bakteri ve mantarların üremesini yüksek oranda inhibe etmektedir. Şeker hastaları normal popülasyona oranla önemli derecede yüksek pH ya sahiptirler. Bu yüksek pH bakteriyel çoğalma (P. aeruginosa) için uygun çevresel koşullar sağlar ve neticede öldürücü olabilen malign eksternal otit gelişebilir. Erkeklerde serumenin pH' sı, hem normal popülasyonda hem de şeker hastalarında kadınlara oranla belirgin olmasada yüksektir. Bu da erkeklerin kadınlara oranla daha az koruyucu serumene sahip olduğunu göstermektedir (60).

İnsan serumeni lizozim, IgA ve yağ asitleri gibi çeşitli antimikrobiyal özellik gösteren biyokimyasal faktörleri de içermektedir (59, 60, 61). Lizozim ve IgA' nın her ikisi de akışkan vücut sıvılarında iyi çalışmaktadır. Bunlar, yapışkan serumen ortamında gömülü ve kısmen hareketsizdirler. Bu nedenle serumen ortamında çok önemli antibakteriyel özellik taşımadıkları bildirilmiştir (59).

Yağ asitleri, mantar ve bakterilerin her ikisinin de üremesini yüksek oranda inhibe etmektedir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin doymuş yağ asitlerine oranla daha iyi antibakteriyel özelliğe sahip olduğu ileri sürülmesine rağmen, çoklu doymuş ve çoklu doymamış yağ asiti kompozisyonunun normal kişilerde ve eksternal otitli hasta serumenlerinde farklılık göstermediği belirtilmektedir (59).

Serumenin farklı mikroorganizma türleri üzerine yüksek bakterisidal etkisinin bulunduğu bilinmektedir. H. influenza, E. coli K-12, Serratia marcescens türleri üzerinde yüksek oranda (% 99) öldürücü iken, E. coli K-1, P. aeruginosa, Streptococcus ve Staf. aureus üzerine daha az (% 30-80) öldürücü olduğu bulunmuştur (61).

Serumenin normal popülasyonda bakterisidal bir etkisinin olmadığı da bildirilmektedir. Dış kulak yolu enfeksiyonunun önlenmesi ve yok edilmesinde bakterisidal etkiden çok serumenin fizyolojik bariyer etkisinin önemli olduğu ifade edilmiştir (58).

#### **D – Serumenin Hastalıklarla İlişkisi Ve Buşon Oluşumu:**

Serumendeki birtakım değişiklikler, lokal veya sistemik hastalığı yansıtabilmektedir. Cilt problemleri serumenin kompozisyonundaki değişiklik ile bağlantılı olabilmektedir. Örneğin; Tinea versicolor enfeksiyonu yağ serumeni

olanlarda daha yaygın görülmektedir. Kistik fibrozisi olanlarda serumen, daha kuru ve daha yapışkan olmaktadır. Hemodiyaliz hastalarının genelinde yağ bezlerinin azalmış fonksiyonuna bağlı olarak ciltleri kuru iken, serumenleri daha kuru olmamaktadır. Alkaptonürili hastaların serumenleri koyu kahve ve siyah renkte olmaktadır. Parkinson hastaları daha fazla buşon üretebilmektedir ve parkinsonizm derecesiyle buşon oluşumu arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (1).

Kuru serumenin daha düşük göğüs kanseri insidansı ile bağlantılı olduğu ifade edilmektedir (39).

Her yaş grubunda primer bir olaydan ziyade dış kulak yolunun genellikle pamuk temizleyicilerle irritasyonuna sekonder olarak serumen sentezinde artış meydana gelmektedir. Bez aktivitesi ve sekresyonundaki artış ile birlikte serumenin uzaklaştırılmasında da bir engel var ise birikme ve buşon oluşumu gerçekleşmektedir. Çocuklarda kanalın dar olması, yaşlılarda anatomik anormallikler, kıllar ( özellikle erkeklerde ) ve işitme cihazları sonucu oluşabilmektedir. Buşon oluşumu, sağırılık, kulakta çınlama, öksürük, kulak ağrısı ve baş dönmesi semptomlarına yol açabilmektedir. Buşon higroskopiktir, yüzme ve banyo sırasında su çekerek dış kulak yolunu tamamen kapatabilmektedir (1).

Başka bir patolojisi olmadan dış kulak yolu darlığında deri ülserasyonu ve kümelenmiş serumenin kronik kuru öksürüğe neden olduğu bir vaka bildirilmiştir (62).

### **3-Menstruel Siklus Fizyolojisi Ve Hormonal Varyasyonlar :**

Menarştan menapoza kadar üremeye yönelik her ay tekrarlayan hormonal değişiklik ve adet kanaması ile karakterize, özellikle genital sistem olmak üzere tüm organizmayı etkileyen siklik değişikliklere menstruel siklus denilmektedir (63). Normal bir siklus, 21-35 gün sürmekte olup 2-6 gününde kanama olmaktadır (64). Siklusun gerçekleşebilmesi için hipotalamus, hipofiz, ovaryum ve uterus yapılarının karşılıklı etkileşimi gereklidir (63).

#### **Menstruel siklus 4 dönemden oluşur :**

1-Foliküler faz (proliferasyon): Kanama sonrası başlar, bir dominant folikülün olgunlaşarak ovulasyona hazır hale gelmesini sağlar.

2-Periovulatuvar faz: LH yükselmesi ve ovulasyonun olduğu fazdır.

3-Luteal faz (sekresyon): Ovulasyon sonrasında olgun folikülün korpus luteuma dönüşmesiyle başlar, menstruel kanamanın başlamasıyla sona erer.

4-Menstruel faz: İmplantasyon oluşmadığı takdirde endometrium tabakası dökülür ve buna menstruasyon denir. Dökülmenin sebebi östrojen ve progesteron düzeyinin azalmasıdır. Vajinal kanamanın ilk günü siklusun 1. günü kabul edilir (63,64).

Siklus süresinde gelişen hormonal varyasyonlar şöyledir (Şekil 3, 65) :

1-Her menstruel siklusun başlangıcında gonadal steroidlerin düzeyleri düşük olup önceki luteal fazdan beri düşüş içerisinde olmaktadır.

2-FSH düzeyinin artmasıyla bir grup büyüyen folikül ortaya çıkmakta ve bunlar büyürken artan miktarlarda östrojen salgılamaktadırlar.

3-Yükselen östrojen, FSH üzerine negatif feedback etki oluşturmakta, LH salgısını uyarmaktadır. Ovulasyondan hemen önce LH reseptörleri uyarısıyla progesteron salgısı modüle olur.Yeterli östrojenik uyarıdan sonra LH da ani bir artış oluşmakta, bu artışın etkisiyle 24-36 saat sonra ovulasyon gelişmektedir.

4-Östrojen düzeyinde luteal faz boyunca azalma devam etmektedir. Korpus luteumun sekresyonu ile yeniden yükselmeye başlamaktadır.

5-Ovulasyon sonrasında progesteron seviyeleri hızlı bir şekilde yükselmekte olup, bu yükselme ovulasyonun gerçekleşmiş olması anlamına gelmektedir.

6-Korpus luteum varlığında hem östrojen hemde progesteron düzeyleri yüksek kalır, kaybolduğunda her iki hormonda azalır. Proliferatif fazın aksine luteal faz, östrojene ilavaten progesteron etkileriyle karakterizedir (64).



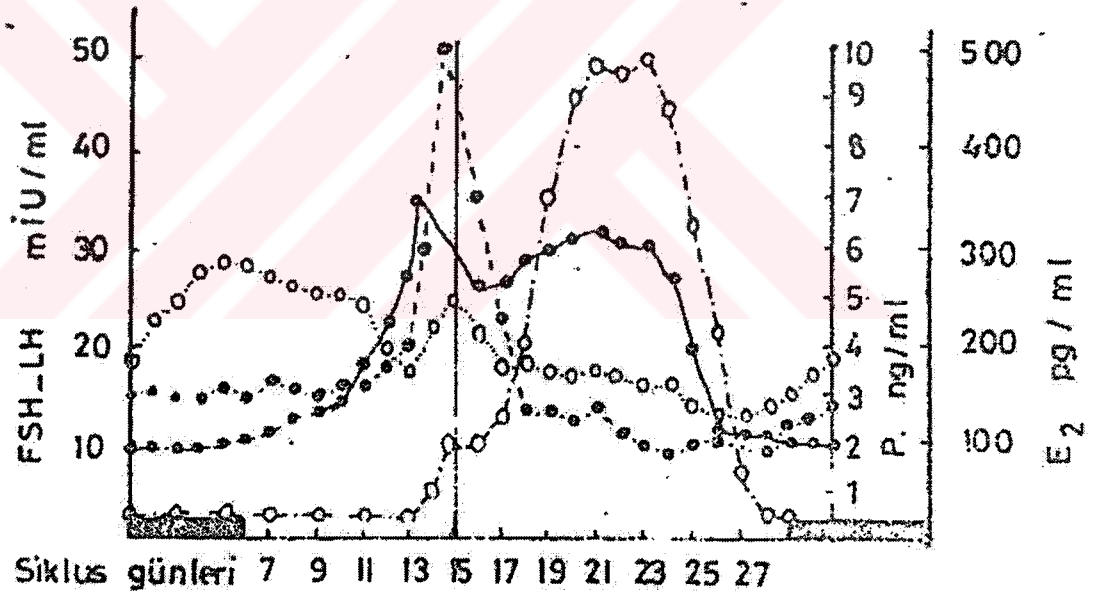
## MENSTRÜEL SIKLUS

○...○ FSH

○- - -○ LH

●—● E<sub>2</sub>

○- - -○ P



Şekil 3. Menstruel siklusu oluşturan hormonların profil görünümü (65)

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 1 ) Gereçler :

#### A) Kimyasallar :

tablo 5. de kullanılan kimyasallar verilmiştir.

#### B) Diğer Gereçler :

- 1 ) 50 HPTLC Plates 20 X 10 Silica gel 60 : Merck
- 2 ) Twin Through Chamber : CAMAG Scientific Inc., Wilmington N. C. USA
- 3 ) Disposable Micropipettes 5 mL : CAMAG
- 4 ) Steril Ekvüyonlu tüp 10 X 1.5 cm
- 5 ) Parafilm : Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI 54952 USA
- 6 ) Vida kapaklı tüp 10 X 1.5 cm
- 7 ) Vida kapaklı cam şişe 500 ml
- 8 ) Süzgeç kağıdı

#### C ) Makine Teçhizat:

1 ) Otoklav : Memmert Hot air sterilizers GmbH + Co. KG – Laborgeraete, Waermeschraenke

2 ) Dansitometre : Densitometer CD 60, 230 V Desaga GmbH - Heidelberg

3 ) Saç Kurutma Makinası

#### D) Programlar:

1 ) CD60 Tarama Programı : Ver : 4.0 Desaga Sar sted-Gruppe version

2 ) SPSS 11.0 ve SPSS 13.0 versiyon, Chicago, Illions, ABD.

**Tablo 5 . Kullanılan kimyasal maddeler ve firmaları :**

<b>Kimyasal</b>	<b>Firma</b>
Skualen	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim-Germany
Bee wax	Sigma-Aldrich
Kolesterol oleat	Sigma-Aldrich
Triolein ( C 18 : 1 )	Sigma-Aldrich
Palmitik asit	Sigma-Aldrich
Kolesterol	Sigma-Aldrich
N-Palmitoil-D-sfingosin	Sigma-Aldrich
Galaktoserebrosid ( Tip I + Tip II )	Sigma-Aldrich
Kolesterol-3-sulfat	Sigma-Aldrich
L- $\alpha$ -Fosfatidiletanolamin	Sigma-Aldrich
L- $\alpha$ - Fosfatidilkolin	Sigma-Aldrich
Metanol	Merck KgaA, Darmstad – Germany
n-Hekzan	Sigma-Aldrich
Kloroform	Sigma-Aldrich ve Merck
Kloroform (% 99.8)	Merck
Dietileter (% 99)	Sigma-Aldrich
Petroleum benzin	Sigma-Aldrich
Asetik asit ( % 99-100 glasial )	J. T. Baker, Deventer – Holland
Fosforik asit ( % 85 )	J. T. Baker
Aseton	Merck
Bakır II sulfat-5-hidrat	Sigma-Aldrich

## 2-Yöntemler :

### A) Serumen örnekleri :

Bu çalışma, yaş serumen örnekleri ile yapıldı. Örnekler, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi' ne başvuran sağlıklı kişilerden ve hastane personelinden alındı.

**Örneklerin alınması :** Serumen örnekleri, kişilerin tek kulağından steril pamuk kaplı çubuklar ile alındı. Bu çalışmaya, etik açıdan sakıncalı bulunduğundan 1 yaş altındaki çocuklar ve yeni doğanlar dahil edilmedi. Bu çalışmaya, şeker hastalığı olmayan, dış kulak yolunda deri hastalığı bulunmayan, son dört hafta içinde topikal ilaç kullanmayan ve geçmişte dış kulak yolu enfeksiyonu hikayesi olmayan kişiler dahil edildi.

Menstruel siklus için serumen örnekleri, bir siklus içinde veya birbirini takip eden sikluslarda alındı. Siklus başlangıcında örnek alınacak kulak temizlendi. Örnekler, menstruel siklusun luteal evresi için, 7 veya 8. günlerde, menstruel evresi için, 16 veya 17. günlerde ve proliferatif evresi için 27 veya 28. günlerde kişilerin temizlenen kulağından alındı. Menstruel siklus için serumen örneği, siklusları düzenli olan ve ortalama 28 gün süren, oral kontraseptif veya herhangi bir hormonal tedavi almayan ve sistemik hastalığı bulunmayan 19-40 yaşları arasındaki kadınlardan alındı.

**Örneklerin saklanması :** Yaş serumen örnekleri, çalışma gününe kadar -20 °C de saklandı.

**Örneklerin gruplandırılması :** Bu çalışma, 152 Kişiden alınan toplam 212 yaş serumen örneği ile yapıldı. Örneklerin yaş grubuna göre dağılımı şöyledir :

1 – 10	Yaş erkek	:	15 örnek
1 – 10	Yaş kadın	:	18 örnek
11 – 18	Yaş erkek	:	15 örnek
11 – 18	Yaş kadın	:	15 örnek
19 – 40	Yaş erkek	:	30 örnek
19 – 40	Yaş kadın	:	30 örnek × 3 (menstruel siklus grubu)
40 +	Yaş erkek	:	15 örnek
40 +	Yaş kadın	:	14 örnek
	<b>Toplam</b>	:	<b>212 örnek</b>

## **B) Serumen Örneklerinin Ekstraksiyonu:**

Yaş insan serumen örneklerine en uygun çözücüyu tesbit etmek için farklı çözücüler denendi. Bu amaçla kullanılan çözücüler tablo 6' da verilmiştir.

Serumen örnekleri, ekstraksiyon işleminden önce oda ısısına getirildi. Her bir örnek, 1mL hekzan/dietileter/asetik asit (80/20/7–v/v/v) içinde çözüldü, 2 dakika süreyle vortekslendi ve 4000 g de 5 dakika süreyle santrifüj edildi.

Her bir örneğin çalışma anına kadar ağzı sıkı bir şekilde parafilm ile kaplandı ve dış ortam ile ilişkisi kesildi.

## **C) HPTLC Metodu:**

### **Solventlerin Hazırlanması:**

Kromatografide yürütme işlemi üç farklı çözücü karışımı ile gerçekleştirildi. Yürütme işleminde kullanılan çözücü karışımları şöyledir :

#### **Çözücü 1 :**

Metanol : 20 mL.

Kloroform : 95 mL.

Distile Su : 1 mL.

Çözücü 1, polar lipidlerin ayrıştırılması için kullanıldı.

#### **Çözücü 2 :**

n – Hekzan : 80 mL.

Dietileter : 20 mL.

Asetik asit : 7 mL.

Çözücü 2, nötral lipidlerin ayrıştırılması için kullanıldı.

#### **Çözücü 3 :**

Petroleum benzin

Çözücü 3, non-polar lipidlerin ayrıştırılması için kullanıldı.

Çözücüler hazırlandıktan sonra 500 mL' lik vida kapaklı şişelerde muhafaza edildi. Her yeni çalışma taze çözücüler ile yapıldı.

### **Standartların Hazırlanması :**

Kullanılan lipid standartları şunlardır:

- 1- Skualen
- 2- Kolesterol oleat
- 3- Triolein
- 4- Palmitik asit

**Tablo 6 . Örneklerin ekstraksiyonu için denenen çözücüler :**

<b>Çözücü</b>	<b>Oranı ( v / v )</b>	<b>Kullanılan toplam hacim ( mL. )</b>
Hekzan		1
Hekzan / metanol	2 : 1	1
Klorofom / Metanol	2 : 3	1
Klorofom / Metanol	2 : 1	1
Klorofom / Metanol	2 : 1	2
Klorofom / Metanol	0.5 : 1	1
Klorofom / Metanol	0.6 : 1	1
Klorofom / Metanol	0.7 : 1	1
Klorofom / Metanol	0.8 : 1	1
Klorofom / Metanol	0.9 : 1	1
Diklormetan / Metanol	1 : 1	1
Diklormetan / Metanol	2 : 1	1
Kloroform/Metanol/ Distile Su	20 : 95 : 1	1
Hekzan / Dietileter / Asetik asit	80 : 20 : 7	1
Dietileter		1

5-Kolesterol

6-Bee wax

7-N-Palmitoil-D sfingozin

8-Galaktoserebrosid (tip I ve tip II)

9-Kolesterol-3-sulfat

10-L- $\alpha$ -Fosfatidiletanolamin

11-L- $\alpha$ -Fosfatidilkolin

1, 2, 3, 4, 5, 6 numaralı standartlar, 3 mg tartıldı ve üzerlerine 5mL n-hekzan ilave edilerek çözüldü.

7, 8, 9, 10, 11 numaralı standartlar, 3 mg tartıldı ve üzerlerine 5 mL kloroform/methanol (1:1, v/v) ilave edilerek çözüldü.

Her bir lipid solüsyonundan 100' er mikrolitre alınıp kombine bir lipid standardı elde edildi.

#### **HPTLC Plakalarının Aktivasyonu :**

Kullanılacak HPTLC plakaları, 30 dakika süre ile oda ısısında bekletildikten sonra 100 ° C' de otoklav içinde 30 dakika süre ile aktive edildi.

#### **HPTLC Plakalarının Hazırlanması :**

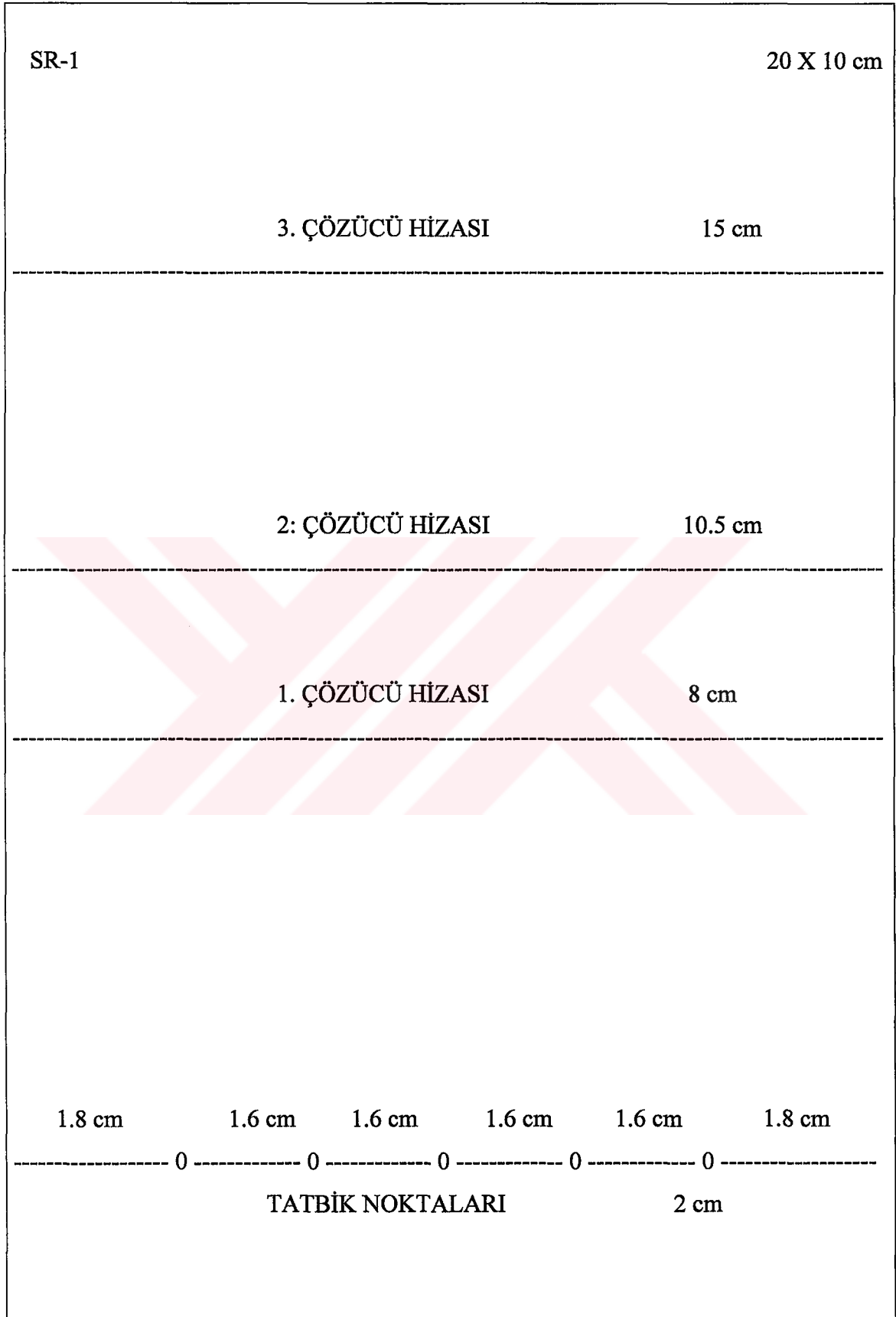
Serumen örnekleri, 20 × 10 cm' lik HPTLC plakaları üzerine uygulandı. Plakalar, her iki kenardan 1.8 cm boşluk kalacak şekilde ve örneklerin tatbik noktaları aralarında 1.6 cm boşluk bırakılarak işaretlendi. Bu şekilde her plakaya 5 ayrı örnek tatbik edildi. Örneklerin tatbik edildiği nokta, plakanın alt kenarından 2 cm yükseklikte gerçekleştirildi. Birinci çözücü için plakanın alt kenarından itibaren 8 cm, ikinci çözücü için 10.5 cm ve üçüncü çözücü için 15 cm yürütme mesafesi uygulandı. Bu hizalar, plakanın kenarına kurşun kalem ile işaretlendi.

Her bir plakanın sol üst köşesine bir numara verildi. Bu numaraya uygulanan örneklerin isimleri bir deftere kaydedildi.

Şekil 4. te HPTLC plakalarının hazırlanması şematize edilmiştir.

#### **Serumen Örneklerinin ve Standartların Tatbik Edilmesi :**

Serumen ve standart örneklerinin uygulaması için 5  $\mu$ L' lik mikropipetler kullanıldı. Tatbik aşamasında ve diğer aşamalarda hiçbir plakaya el ile temas edilmedi. Standartlar, 10  $\mu$ L, serumen örnekleri ise 10 – 60  $\mu$ L arasında değişik hacimlerde plakalara ılık hava akımı altında tatbik edildi.



**Şekil 4. HPTLC plakalarının hazırlanması:**



### **Plakaların Yürütme İşlemi :**

Serumen örneklerinin yürütme işlemi, kapaklı bir yürütme tankında (Twin Through Chamber) yapıldı.

Tankın tabanından itibaren 1 cm' lik yüksekliğe denk gelen kısım bir çizgi ile işaretlendi ve solventin tank içindeki hacmi (75 mL) bu çizgi ile belirlendi.

Yürütme tankının tabanına uygun boyutlarda süzgeç kağıtları hazırlandı. Hazırlanan bu süzgeç kağıtları, katlanarak tankın alt kısmına yerleştirildi.

Yürütme tankının içine solvent eklendikten sonra tankın üst kısmı kapağı ile kapatıldı. Süzgeç kağıdına çözücü emdirilerek tankın içi çözücü ile tamamen doyunlaştırıldı. Her çözücü değişiminde tankın içine yeni bir süzgeç kağıdı konuldu. Her çözücü değişiminden sonra tankın içindeki çözücünün tamamının uçması beklendi ve tankın içine yeni solvent eklenmeden önce tankın içi steril kağıt havlu ile temizlendi.

Yeni çözücü eklenmeden önce tankın içi kullanılacak çözücü ile birkaç kez çalkalanarak temizlendi. çözücüler, plakalardan 20 dakika önce tank içine kondu ve bu suretle tankın içi çözücü ile tamamen doyunlaştırıldı.

Çözücülerin hazırlanmasından tank içindeki yürütme işlemine kadar bütün işlemler , oda ısısında ve çeker ocak içinde gerçekleştirildi.

Her bir çalışmada, tank içinde iki ayrı plaka karşılıklı olarak aynı zamanda çalışıldı. HPTLC plakaları, yürütme tankı içine tabandan itibaren 0.5 cm' lik kısmı solvent içinde kalacak şekilde ve hafifçe eğik olarak yerleştirildi.

Yürütme tankı içinde 1. çözücü ile yürütme işlemi, plaka üzerinde tatbik noktasından itibaren ise 6 cm yükseklikte olacak şekilde yapıldı. Çözücü 1' in bu mesafede yürütme hızı ortalama 20 dakika olarak belirlendi. Plakalar yürütme tankından çıkarıldı ve ılık hava akımı altında kurutma işlemine tabi tutuldu. 1. Çözücü içindeki distile suyun plakadan tamamen uzaklaştırılabilmesi amacıyla kurutma işlemine 30 dakika süreyle aralıksız olarak devam edildi.

1. Çözücü içinde plakaların yürütülmesi ve kurutulması işlemleri yukarıdaki şekilde tekrar edildi.

Yürütme tankı içinde 2. çözücü ile yürütme işlemi, plaka üzerinde tatbik noktasından itibaren 8.5 cm yükseklikte olacak şekilde yapıldı. Çözücü 2'nin bu mesafede yürütme hızı ortalama 30 dakika olarak belirlendi. Plakalar, yürütme tankından çıkarıldı ve ılık hava akımı altında kurutma işlemine tabi tutuldu. Çözücü 2 içindeki asetik asitin plakadan tamamen uzaklaştırılması amacıyla kurutma işlemine 90 dakika

süre ile aralıksız olarak devam edildi ve keskin asetik asit kokusunun plaka üzerinden tamamen uzaklaştırıldığına emin olunduktan sonra 3. yürütme işlemine geçildi.

Yürütme tankı içinde 3. çözücü ile yürütme işlemi, plaka üzerinde tatbik noktasından itibaren 13 cm yükseklikte olacak şekilde yapıldı. Çözücü 3' ün bu mesafede yürütme hızı ortalama 70 dakika olarak belirlendi. Plakalar, yürütme tankından çıkarıldı ve kuru ılık hava akımı altında kurutma işlemine tabi tutuldu. Çözücü 3 içindeki petroleum benzin kolayca uçtuğu için kurutma işlemi 10 dakika süreyle aralıksız olarak gerçekleştirildi.

#### **Lipid Bantlarının Görünür Hale Getirilmesi:**

a) Boyama: % 8' lik Fosforik asitte hazırlanmış % 10'luk bakır sulfat çözeltisi kullanıldı.

Bakır sulfat

Fosforik asit (% 85)

Distile su

HPTLC plakalarının yürütme ve kurutma işlemleri bitirildikten sonra plakalar % 10' luk bakır sulfat (% 8' lik fosforik asit içinde) ile boyandı.

Hazırlanışı: % 85'lik Fosforik asitten 9.4 mL alınıp üzerine 90.6 mL distile su eklenerek % 8' lik fosforik asit elde edildi. 10 gr bakır sulfat tartıldı ve % 8'lik fosforik asit içerisinde eritildi. Son hacim, 100 mL ye % 8' lik fosforik asit ile tamamlanarak % 10' luk bakır sulfat çözeltisi hazırlandı.

Çözelti, ışık ile temasını engelleyecek şekilde kaplanmış bir cam şişenin içerisinde muhafaza edildi. Cam şişenin ağzına boyayı püskürterek tahliye edecek bir sistem eklendi.

Boyama işlemi sırasında plakalar, 30 derecelik bir açıyla zemin üzerine yerleştirildi. Boya, plakalara dik ve 30 cm mesafeden püskürtüldü. Püskürtme işlemi, yukardan aşağıya doğru inerek ve soldan sağa doğru olarak yapıldı. Yürütme işleminin gerçekleştiği alanın tamamı boyandı ve plaka üzerinde homojen, açık mavi renkte bir görüntü elde edildi.

Boyanan plakalar, ılık hava akımı verilerek 10 dakika süre ile kurutuldu.

b) Yakma:

Boyama işlemi biten plakalar, önceden 160 dereceye getirilmiş otoklavda yakılarak bantlar görünür hale getirildi. Plakalar, otoklav içine 30 derecelik açıyla yerleştirildi. Otoklav içinde her bir plaka 15 dakika süre ile bekletildi ve bu süre

sonunda yakma işlemine son verildi. Plakalar üzerinde bantlar görünür hale getirildi. Şekil 5. de örnek ve standartları gösteren bir HPTLC plakası şematize edilmiştir.

#### **D ) Dansitometre ile Plakaların Taranması:**

Serumen lipid bantları, HPTLC plakalarında görünür hale getirildikten sonra bir dansitometre aracılığı ile tarandı ve her bir lipid bantının dansitometrik yoğunluğu tesbit edildi. Her bir lipid bantı için ayrı ayrı pikler elde edildi.

Her bir örnek için x ve y koordinatları lipid bantlarının tam ortasına gelecek şekilde bir cetvel yardımı ile hesaplandı. Y koordinatı, elde edilen tüm lipid bantlarını taranmasını sağlayacak şekilde alttan tatbik noktası sıfır kabul edilerek, yukardan skualen bantının birkaç santimetre üzerine gelecek şekilde belirlendi. X koordinatı ise aplikasyon noktasının tüm lipid bantlarını ortadan gördüğü noktalar olarak belirlendi. Bu şekilde bir tane x, iki tane y koordinatı belirlenerek tarama yapılacak bölgeler tesbit edildi.

Her lipid bantı arasındaki mesafe en az sıfır olacak şekilde ayarlandı.

Lipid bantlarına ait pik yükseklikleri en az 10, en fazla 1000 olacak şekilde ayarlandı.

Dansitometre, tüm örnekler 600 nm optik dansitede taranacak şekilde ayarlandı.

Tarama işlemi bittikten sonra, tüm veriler kaydedildi. Kaydedilen verilerin hem dansitometrik görüntüleri hemde pik yükseklikleri ve alanları bir yazıcı yardımıyla bilgisayar çıktısı olarak alındı.

Pik yükseklikleri verilen değerlerin dışında çıkan veya birbirleriyle iç içe girdiği için değerlendirilemeyen örnekler, hacimleri artırılarak veya eksiltilecek yeniden çalışıldı. Şekil 6. ve 7. de standartlara ve örneklere ait dansitometrik görüntüsü elde edilen kromatogramlar verilmiştir.

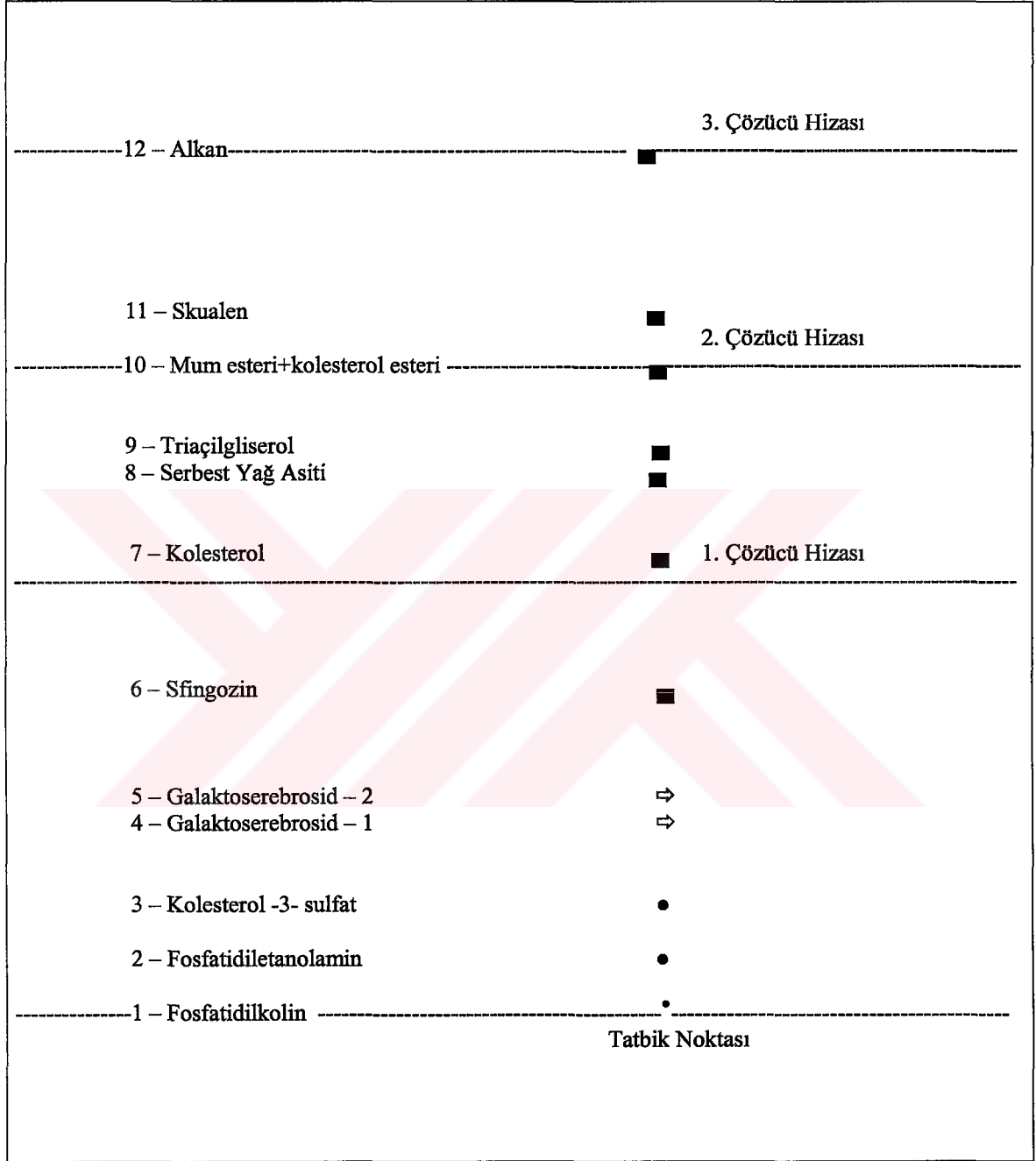
#### **E ) İstatistiksel Analiz:**

İstatistiksel analiz için SPSS paket program kullanıldı. Değişken değerler, standart sapma, kategorik değerler yüzde olarak ifade edildi.

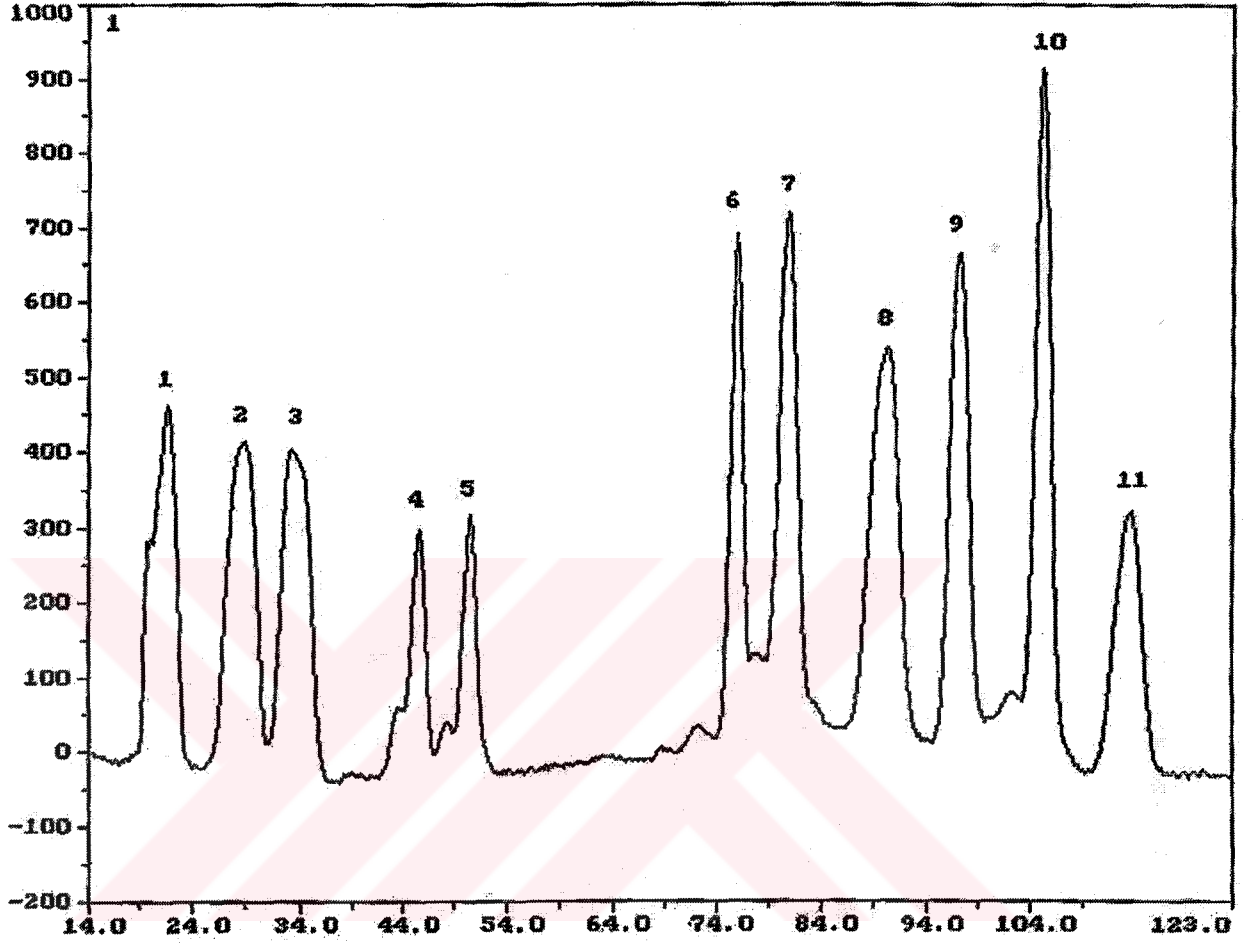
Erkek ve kadınlarda yaş yönünden parametrelerin karşılaştırılmasında Post hoc test uygulandı.

Cinsiyete göre parametrelerin karşılaştırılmasında, 19-40 yaş grubu için unpaired- student T test, diğer yaş grupları için Mann-Whitney testi uygulandı.

Menstruel s iklusta p arametrelerin e vrelere göre karşılaştırılmasında Paired T- test uygulandı. Tüm analizlerde,  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

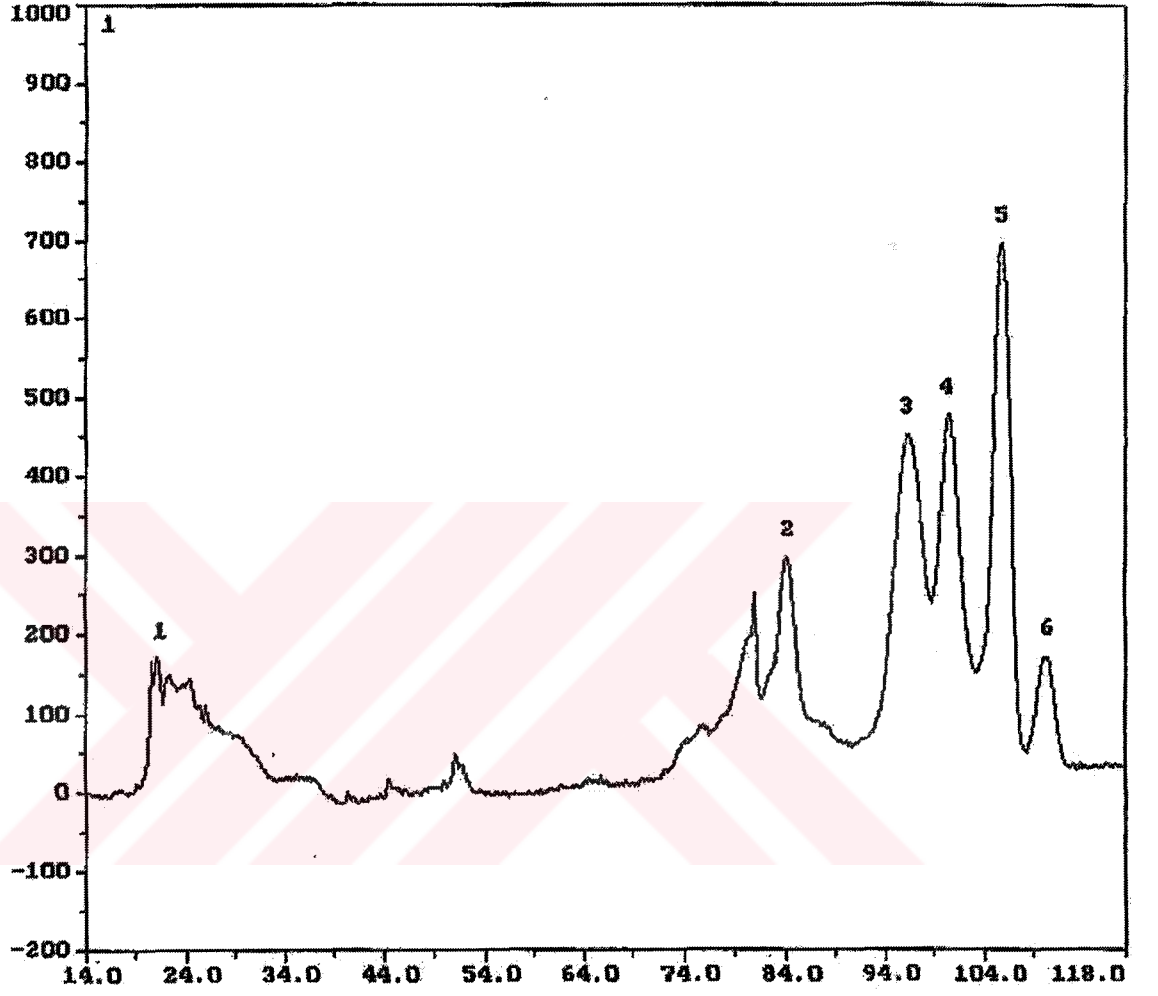


**Şekil 5. HPTLC plakası üzerinde örnek ve standartlara ait lipid bantlarının gösterilmesi:**



**Şekil 6. Standartlara ait dansitometrik görüntü:**

- 1- fosfatidilkolin, 2- fosfatidiletanolamin, 3- kolesterol-3-sulfat,  
4- galaktoserebrosid-1, 5- galaktoserebrosid-2, 6- sfingozin,  
7- kolesterol, 8- serbest yağ asiti, 9- triaçilgliserol,  
10- mum esteri+kolesterol esteri, 11- skualen



**Şekil 7. Örneklerle ait dansitometrik görüntü:**

**1- fosfolipidler, 2- kolesterol, 3- serbest yağ asiti, 4-triaçilgliserol,  
5- mum esteri+kolesterol esteri, 6- skualen**

## BULGULAR

### 1-Metodların Optimizasyonuna Yönelik Denemeler :

A) Serumen Örneklerinin Ekstraksiyonu: İnsan serumen lipidlerinin ekstraksiyonu için en uygun çözücüye ulaşmak amacıyla çözünen serumen lipidleri HPTLC plakalarına tatbik edilerek polar, apolar ve nötral lipidlerin seperasyonları izlendi.

a) Hekzan: Serumen örnekleri, 1 mL hekzan içinde çözüldü ve plakalara değişik hacimlerde (5, 10, 15, 20  $\mu$ L) tatbik edildi. Nötral lipidlerin ayırımının tatminkar olmasına karşın, bant oluşumu istenilen netlikte değildi. Polar lipidler, HPTLC plakaları üzerinde belirgin olarak izlenemedi.

b) Hekzan / metanol: Serumen örnekleri, 2:1 ve 2:3 (v/v) oranında 1 mL hekzan / metanol karışımı içinde çözüldü ve plakalara değişik hacimlerde uygulandı. Her iki oranda da polar ve nötral lipid bantları birbirine yakındı ve net olarak ayırmaları gerçekleştirilemedi.

c) Kloroform / metanol: Daha önceki çalışmalarda lipid ekstraksiyonu için en çok kullanılan çözücü bu olduğundan en çok bu çözücü üzerinde duruldu. Önce, 2:1 (v/v) oranı ile çalışıldı. 1 ve 2 mL çözücü içinde ekstrakte edilen örnekler değişik hacimlerde HPTLC plakalarına tatbik edildi. Polar lipidler, daha iyi bir ayırım gösterdi. Özellikle fosfolipidler yaygın bir bant görüntüsü oluşturdu. Nötral lipidlerde de bantlar birbirlerinden iyi olarak ayrıldı. Fakat, HPTLC plakaları üzerinde 1. çözücü hizası

üzerinde yoğun bir birikim oluştu. Bu birikim, lipidlerin çözünürlüğünün tam olarak gerçekleşmediği şeklinde değerlendirildi. Giderilmesi amacıyla kloroform / metanol karışımının değişik oranları ile ilave çalışmalar yapıldı. Bu amaçla, aynı kişiye ait serumen örnekleri 1 mL çözücü (0.5:1, 0.6:1, 0.7:1, 0.8:1, 0.9:1, 1.1, v/v) içerisinde ekstrakte edildi. Kloroform / metanol' ün 1:1 (v/v) oranında çözücü olarak kullanıldığı örneklerde diğerlerine oranla sorun en aza indirilmesine rağmen tam olarak giderilemedi.

Kloroform / metanol karışımı içindeki kloroform yerine diklormetan denendi ve aynı oranlar kullanılarak örnekler 1 mL karışım içinde ekstrakte edildi. Polar ve nötral lipid bantlarının iyi ayrılmasına karşın, 1. çözücü hizası üzerindeki muhtemelen yetersiz çözünmeden kaynaklanan birikim giderilemedi.

Kloroform / metanol / distile su (20:95:1, v/v/v) karışımı ile çalışılarak sorun giderilmeye çalışıldı. 1 mL karışım içerisinde örnekler ekstrakte edildi ve değişik hacimlerde aplike edildi. Bantlar iyi ayrıştırıldı fakat, 1. çözücü hizasındaki problemin aynı yoğunlukta devam ettiği gözlemlendi.

d) Eter: Örnekler, 1 mL dietileter içerisinde ekstrakte edildi ve değişik hacimlerde plakalara tatbik edildi. Nötral lipidler iyi ayrıştırıldı fakat, polar lipidler istenilen düzeyde ayrıştırılamadı. Çözücü 1 hizasındaki problemin en aza indirilmesine rağmen burda da devam ettiği gözlemlendi.

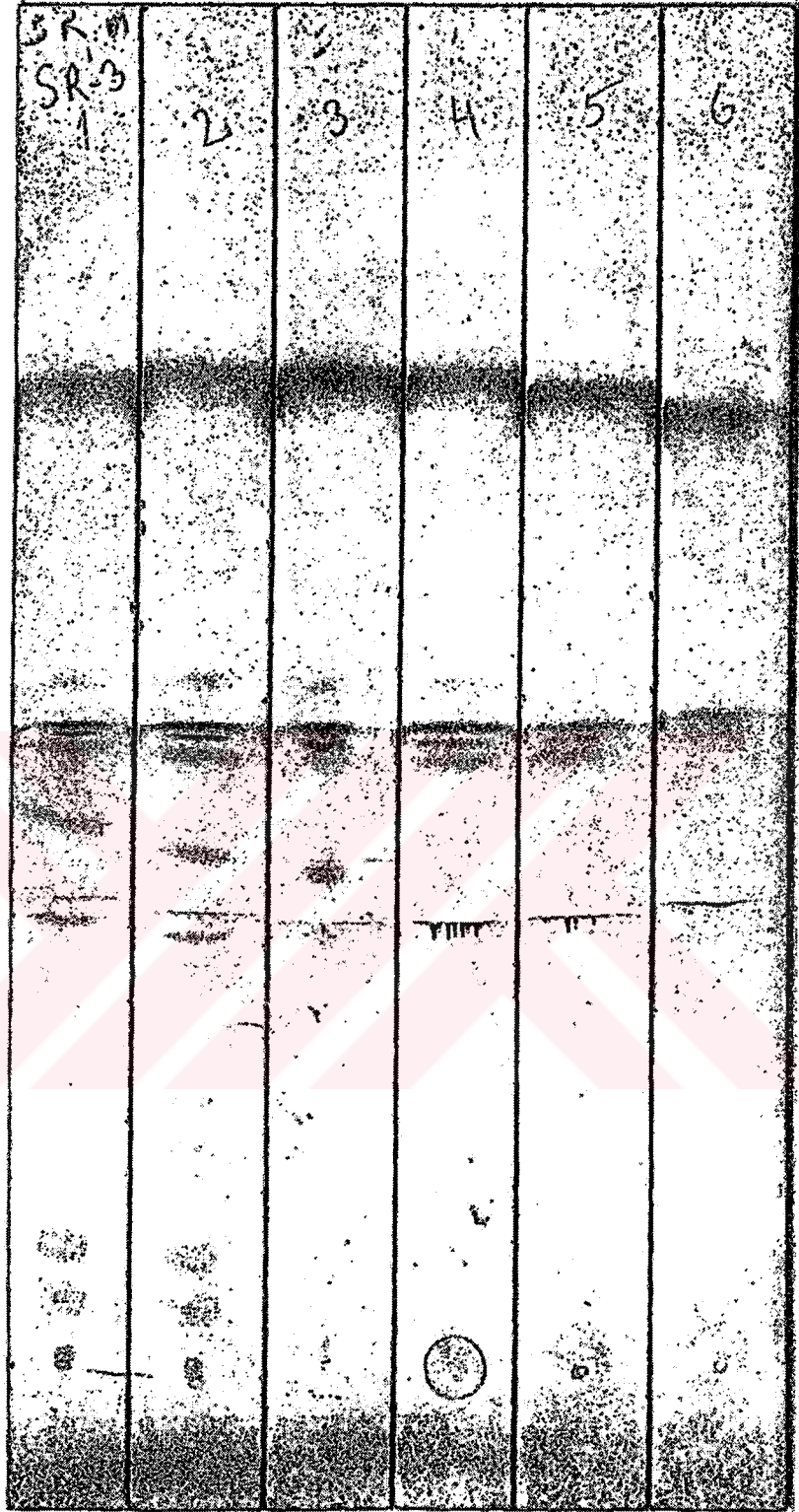
e) Hekzan / dietileter / asetik asit: Örnekler, 1 mL hekzan / dietileter / asetik asit (80:20:7, v/v/v) içerisinde ekstrakte edildi ve değişik hacimlerde plakalara tatbik edildi. Yapılan tüm çalışmalar içerisinde en iyi ve en net bant görüntüsü bu karışımla elde edildi. Polar ve nötral lipidler iyi ayrıştırıldı. Polar grupta birbirinden ayırdedilebilen fakat çok yoğun olmayan bant görüntüleri elde edildi. Çözücü hizasındaki problem tamamı ile giderildi ve örnekleri çalışmak için en uygun karışım olarak değerlendirildi.

Şekil 8., 9. 10 ve 11' de bu çalışmaların HPTLC plakalarındaki görüntüleri verilmiştir.

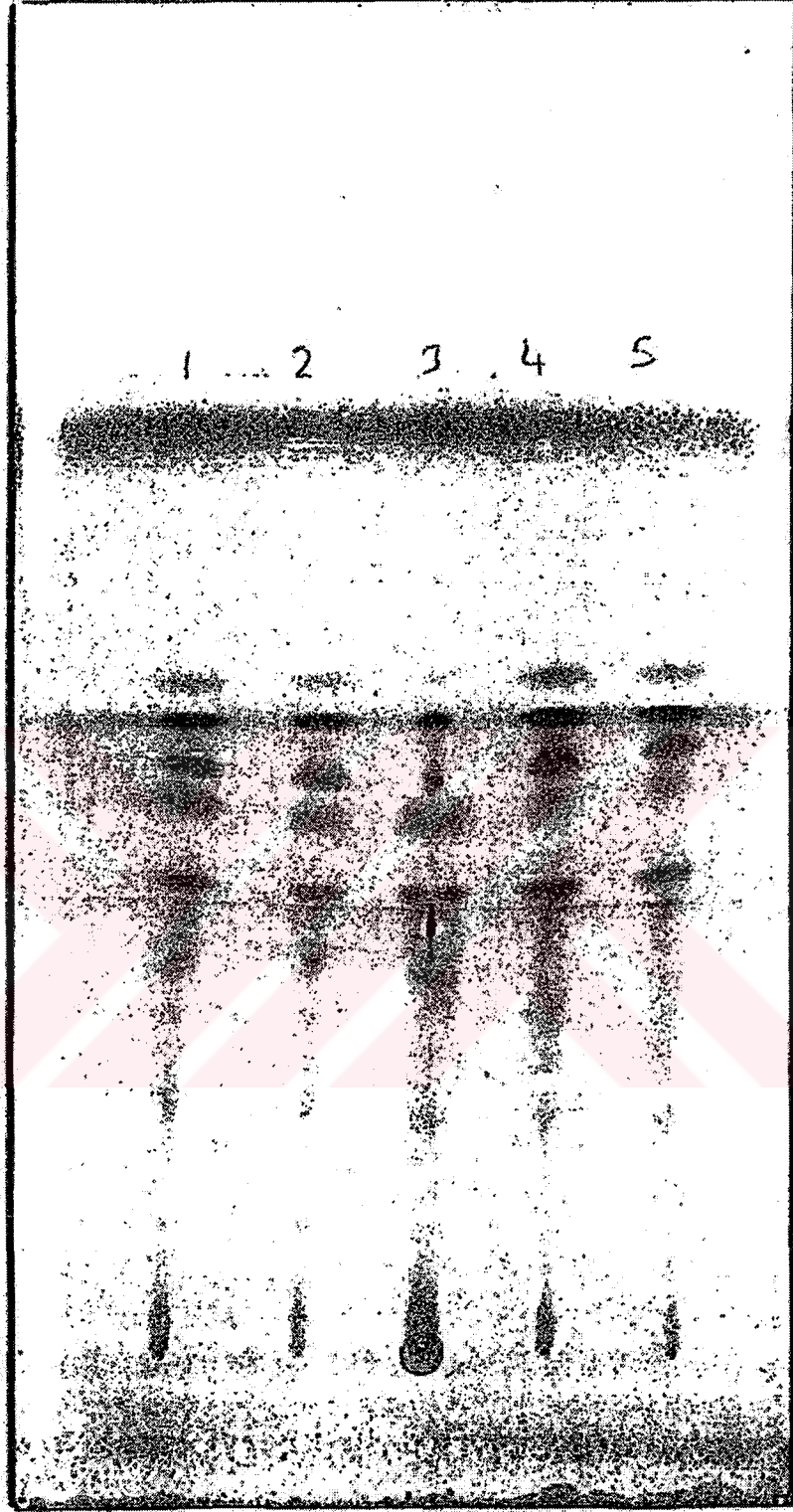
**B ) Polar ve nonpolar lipid bantlarının değişik çözücüler ile belirgin hale getirilmesine yönelik çalışmalar:**

Nonpolar grupta alkan bandı 3. çözücü hizası ile çakışmaktaydı. Bu çakışmayı engellemek amacıyla 3. çözücüye aseton eklendi. Serumen örnekleri, çalışma prensibi



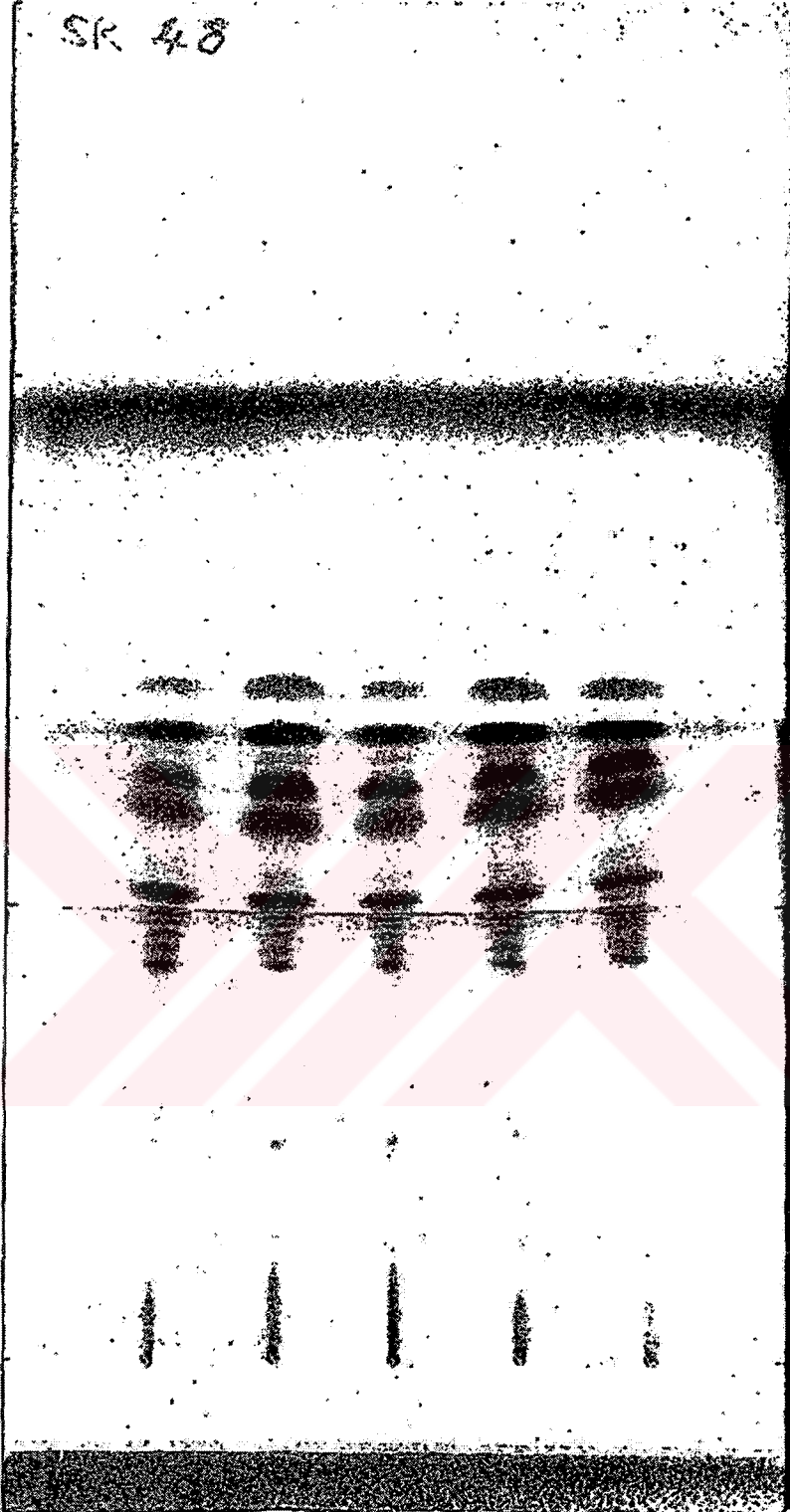


**Şekil 8. Serumen örneklerinin çeşitli çözücüler ile ekstraksiyonu**  
1- 2, standartlar, 3- hekzan, 4- kloroform/metanol (2/1),  
5- hekzan/metanol (2/1), 6- hekzan/metanol (2/3)

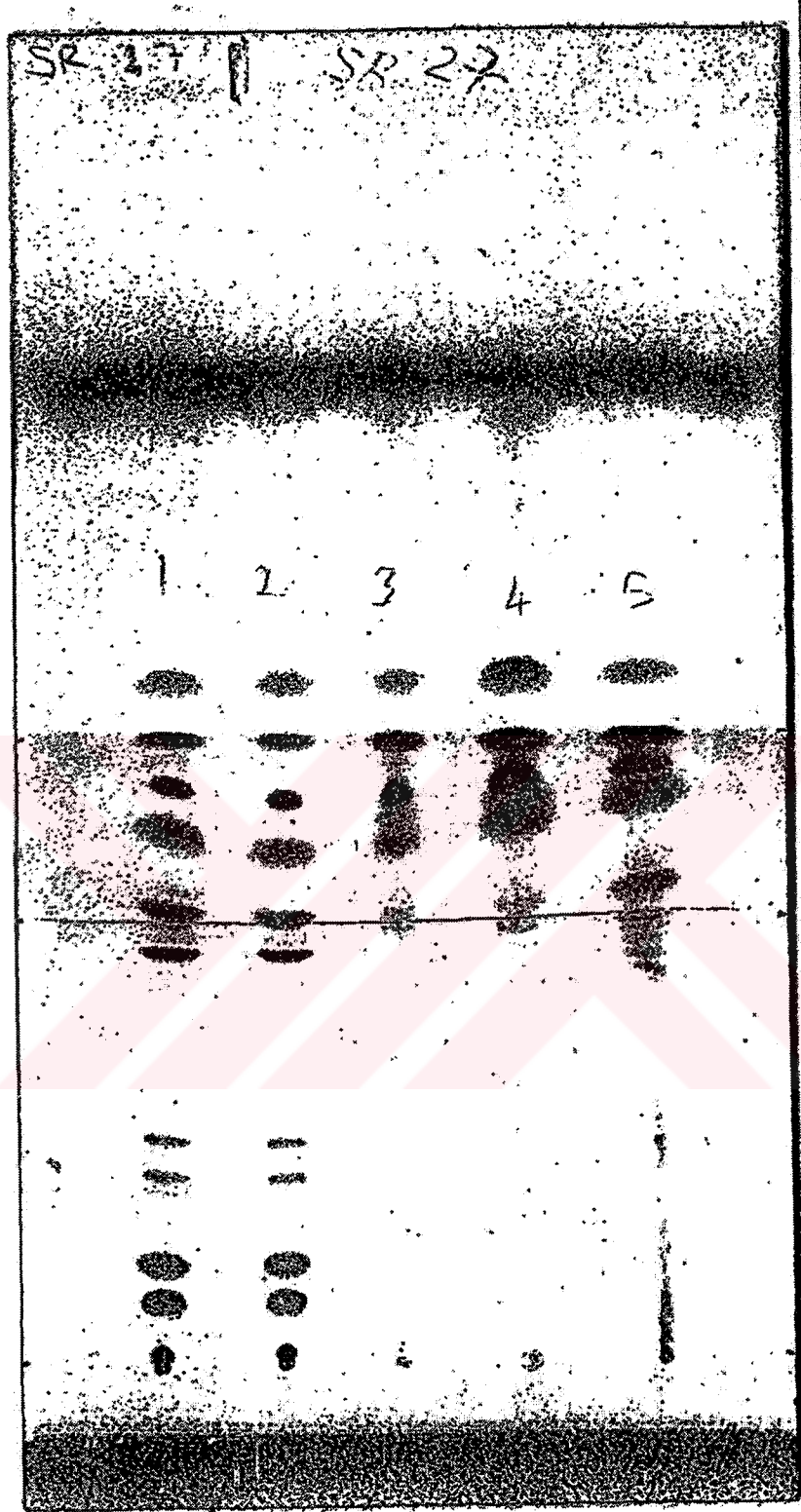


**Şekil 9. Serumen örneklerinin çeşitli çözücüler ile ekstraksiyonu:**

1, 2- eter, 3- kloroform/metanol/diştirile su (20/95/1, v/v/v),  
4, 5- hekzan/diştirileter/asetik asit (80/20/7, v/v/v)



**Şekil 10. Hekzan/dietileter/asetik asit (82/20/7, v/v/v) ile çözünen örneklerin görüntüsü**



**Şekil 11. İnsan sebum ve serumenine ait HPTLC plağı**

**1-2: standartlar, 3-4: sebum örnekleri, 5: serumen**

değiştirilmeden yürütüldü. Sadece 3. çözücü olarak petroleum eter / aseton (95/5, v/v) karışımı kullanıldı.

Bütün nonpolar gruplar etkilendi ve birbirlerinden geniş bantlar olarak ayrıldılar. Skualen, 3. çözücü hizasına çok yakınlı. Alkan bandı istenildiği gibi 3. çözücü hizasından uzaklaştırılmadı ve bu çakışma giderilemedi.

Polar lipidlerin daha net ayrıştırılması çalışmaları için önce birkaç serumen örneği birleştirilerek bir serumen havuzu oluşturuldu. Bu havuzdan alınan örnekler, 1 mL kloroform/metanol (1:1, v/v) ve kloroform/metanol/distile su (20/95/1, v/v/v) içerisinde ayrı ayrı ekstrakte edildi ve değişik hacimlerde (100-150 µL) plakaya tatbik edildi. Kloroform/metanol/distile su/aseton (18:15:3:1, v/v/v/v), çözücü karışımı olarak kullanıldı. Yürütme işlemi tatbik noktasından itibaren 10 cm'lik mesafede durduruldu. Aynı işlem iki kez tekrar edildi. Polar lipidler için net bant görüntüsü elde edilemedi. Sadece 1. çözücü hizasında yoğun bir birikim tesbit edildi.

Yine polar lipdler için (özellikle fosfolipidler) serumen örnekleri 1mL hekzan/dietileter/asetik asit içinde ekstrakte edildi. Örnekler, iki ayrı plakaya 100' er µL tatbik edildi. Çözücü 1 içinde aplikasyon noktasından itibaren 10 cm' lik mesafeye kadar iki kez yürütüldü. Plakalardan birinde bantlar görünür hale getirildi, diğeri ise sadece kurutuldu. Boyalı plakadaki hizaya bakılarak aynı hizadan diğerk plaka bir bistüri yardımı ile kazındı. Kazınan bölüm 1 mL kloroform/metanol (1:1, v/v) içerisinde ekstrakte edildi ve değişik hacimlerde (100-150 µL) plakaya tatbik edildi. Bu şekilde çok az belirgin fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin bantları gözlendi.

### **C) Kontaminasyona yönelik çalışmalar:**

Serumen örnekleri, kişilerden ucuna pamuk kaplanmış steril eküvyonlu çubuklar ile alındı. Kullanılan bu çubukların lipid profilini değiştirebilecek bir kontaminasyona sebep olup olmadığını göstermek amacıyla içinde serumen örneği bulunmayan, sadece pamuk kaplanmış çubuklar hekzan/dietileter/asetik asit karışımı içinde ekstrakte edildi ve plakalara tatbik edildi. Plaka üzerinde pamuk çubuğa ait herhangi bir bant oluşumu görülmedi ve kontaminasyon ihtimali net bir şekilde ortadan kaldırıldı.

### **D) Rf ve Rst değerleri:**

Kromatogram üzerinde belli koşullarda çalışmanın tekrarlanabilirliğini gösterebilmek amacıyla standart ve örnekler üzerinde Rf ve Rst değerleri çalışıldı (tablo 7).

**Tablo 7. Standart ile örnekler için Rf ve Rst değerleri**

	AD (cm)	BD (cm)	CD (cm)	RF	Rst
SK STANDART					
SK ÖRNEK	9.2	9.3	13	0.71	0.99
ME+KE Standart					
ME+KE Örnek	8.5	8.5	13	0.70	1
TG Standart					
TG Örnek	8.0	8.0	13	0.65	1
SYA Standart					
SYA Örnek	8.0	7.6	13	0.61	0.98
K Standart	7.5			0.58	
K Örnek	6.2	6.3	13	0.57	0.98
				0.48	
				0.47	

Rf Değeri: AD/CD olarak hesaplandı.

AD: A örnek bandının tatbik noktasına mesafesi

CD: 3. çözücü hizasının tatbik noktasına uzaklığı

Rst Değeri: AD/BD olarak hesaplandı.

AD: A örnek bandının tatbik noktasına mesafesi

BD: B standart bandının tatbik noktasına mesafesi

#### **E) Interassay ve Intraassay CV sonuçları :**

Sonuçların tekrarlanabilirliğini ve güvenilirliğini gösterebilmek açısından varyasyon katsayısı (CV) ölçümleri yapıldı. Bu amaçla aynı kişiden alınan serumen örneği ile aynı gün içinde iki ayrı plakaya toplam 10 aplikasyon yapıldı (intraassay CV). Ayrıca, aynı kişiden alınan serumen örneği farklı günlerde farklı plakalara toplam üç kez tatbik edildi (interassay CV).

Tablo 8 ve 9 da interassay ve intraassay CV sonuçları verilmiştir.

#### **2-Yaş, Cinsiyet ve Menstruel Siklusun Evrelerine Göre İnsan Serumen Lipidlerinin Karşılaştırılması :**

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi' ne başvuran kişiler ve hastane çalışanlarından 75' i erkek, 77' si kadın olmak üzere toplam 152 kişiden alınan 212 serumen örneği üzerinde gerçekleştirildi.

Her iki cinsiyet, 1-10, 11-18, 19-40, 40 üzeri olarak yaş gruplarına ayrıldı ve her bir grup için ayrı ayrı örnekler alındı. Menstruel siklus için aynı kişiden siklusun üç ayrı evresine ait örnekler alındı. Menstruel siklusun proliferatif, luteal ve menstruel evrelerinde serumen lipid profili karşılaştırıldı. 19-40 yaş kadın grubunda, menstruel siklusun üç ayrı evresinde alınan örneklerde tesbit edilen değerler toplanıp ortalamaları kullanıldı.

HPTLC plakalarında yürütme işlemi sonrasında dansitometrik tarama yapılarak lipid bantlarının pik yüksekliklerine ait sayısal değerler elde edildi. Başlıca beş lipid bantı tesbit edildi. Bunlar, skualen (SK), mum esteri+kolesterol esteri (ME+KE), triaçilgliserol (TG), serbest yağ asiti (SYA) ve kolesterol (K) olarak belirlendi. Diğer lipid bantları hem anlamlı bir yüzde teşkil etmediklerinden hem de diğerlerinden net bir şekilde ayrılmadıklarından değerlendirilmeye alınmadı.

**Tablo 8. Interassay CV değerleri:**

LİPİD KOMPOZİSYONU	$\bar{X}$	SD	INTERASSAY CV
SK	8.76	0.665	7.59
ME+KE	31.5	0.953	3.02
TG	18.0	0.4	2.2
SYA	22.3	2.17	9.7
K	19.43	2.05	10.5

(n=3)

**Tablo 9. Intraassay CV değerleri:**

LİPİD KOMPOZİSYONU	$\bar{X}$	SD	INTRAASSAY CV
SK	10.34	0.43	4.1
ME+KE	31.4	1.76	5.6
TG	23.75	1.64	6.9
SYA	18.0	0.87	4.8
K	16.43	2.5	15.2

(n=10)



Serumen lipid kompozisyonunun tesbiti, lipid bantlarına ait pik yükseklikleri değerlendirilerek yapıldı. Bu beş lipid bantının pik yükseklikleri toplanarak her birine ait yüzde kompozisyonlar elde edildi.

Serumen lipidlerinin yüzde kompozisyonları, yağ bezi lipidleri ile epidermal kökenli lipidlerin birbirlerine oranları ve yağ bezi lipidlerinin birbirleriyle oranları yaş, cinsiyet ve menstruel siklusun evrelerine göre karşılaştırıldı.

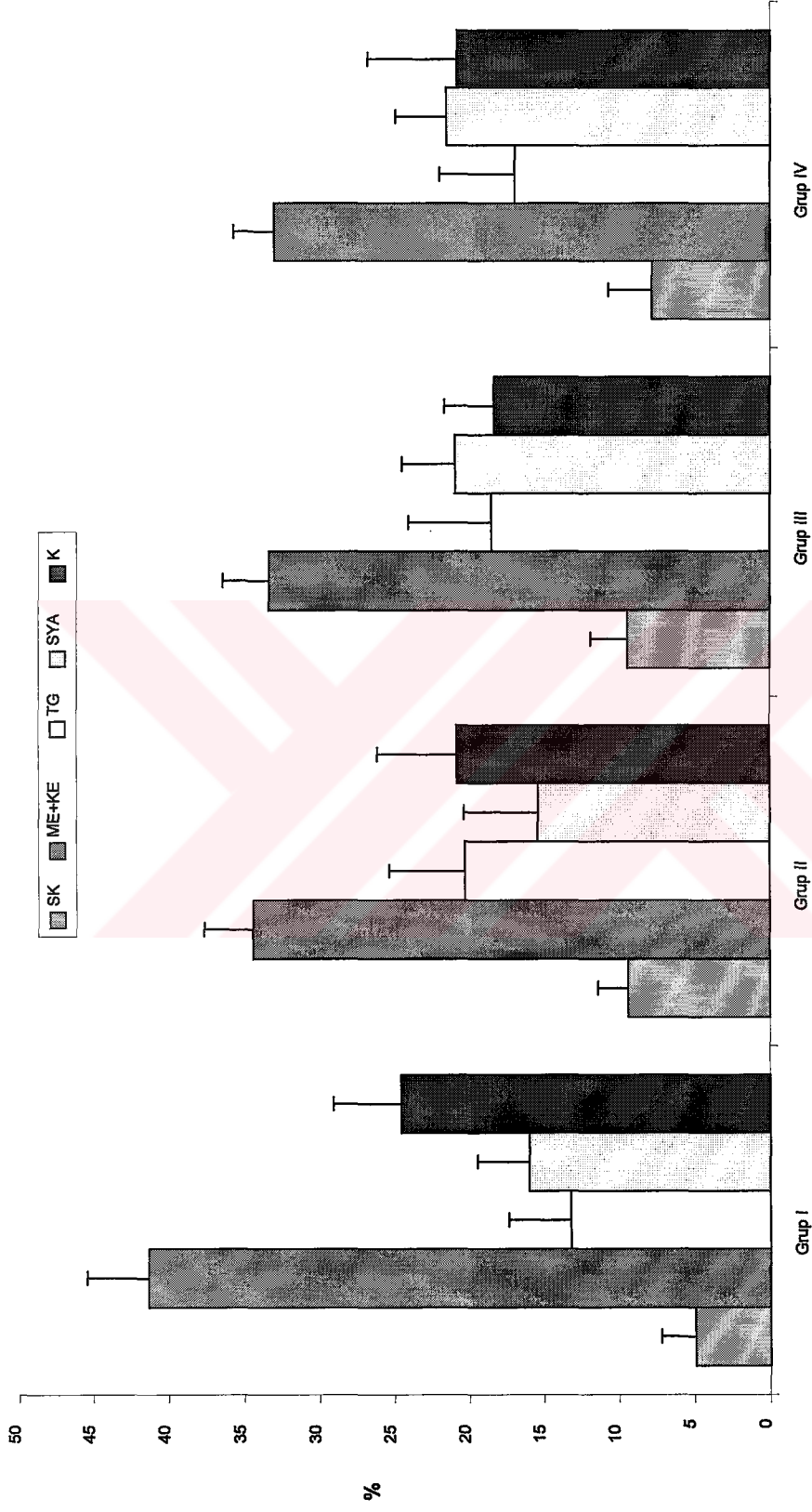
Mum esteri, skualen tamamen ve triaçilgliserol + serbest yağ asiti büyük çoğunlukla yağ bezinden köken alan lipidlerdir. Kolesterolün büyük bir kısmı ve kolesterol esteri epidermal kökenlidir. Yağ bezi kökenli lipidlerin pik yükseklikleri ayrı ayrı kolesterolün pik yüksekliğine oranlandı ve böylece yağ bezi kökenli/epidermal kökenli lipid oranı belirlendi. Bulunan değerlerin yaş, cinsiyet ve menstruel siklus evreleri ile değişimi ortaya konuldu.

Yağ bezinden köken alan lipidler de kendi içlerinde yaş, cinsiyet ve menstruel siklusun evrelerine oranlanarak aralarındaki değişimler belirlendi.

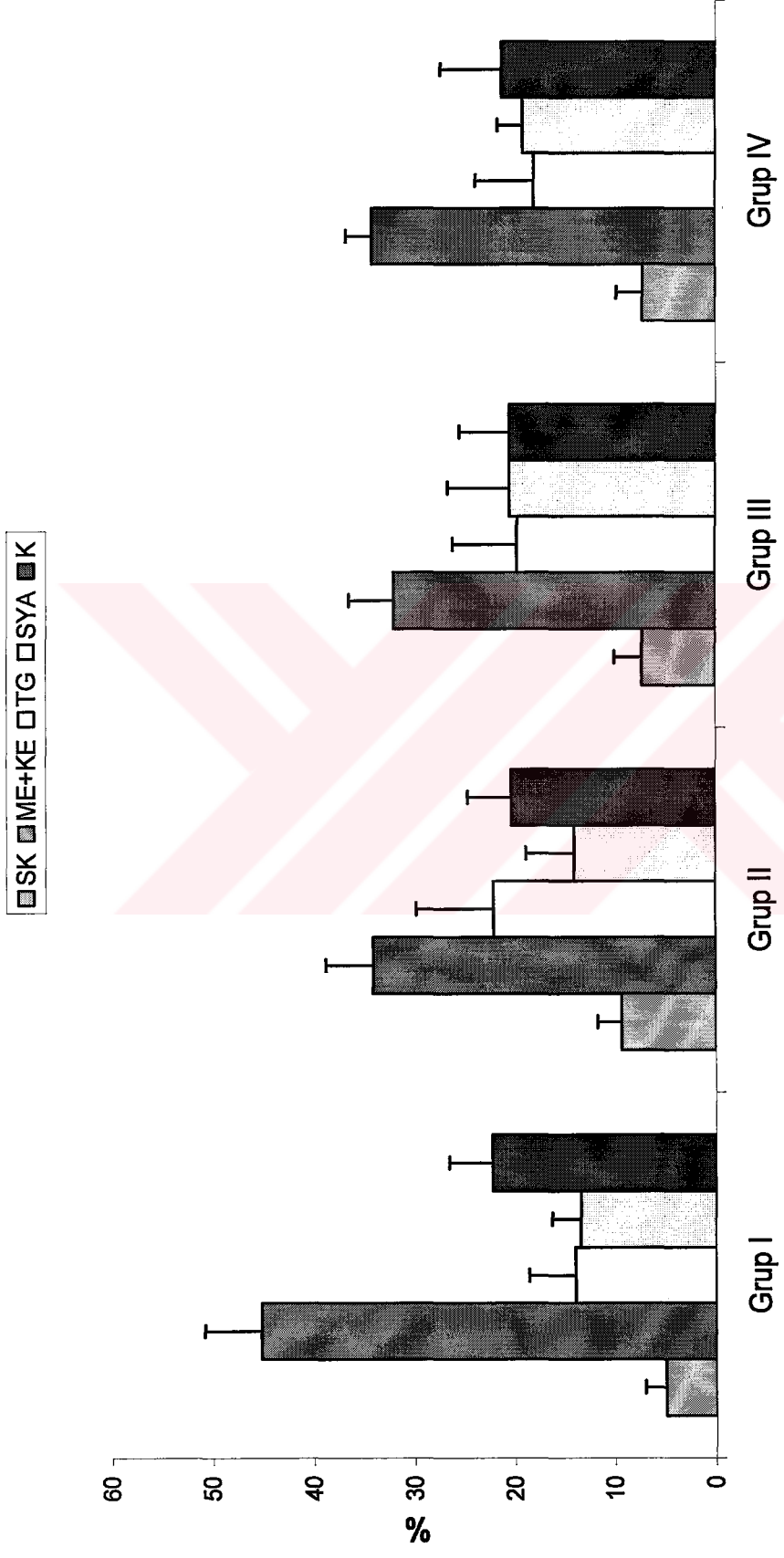
Her iki cinsiyet için 1-10 yaş grubu 1, 11-18 yaş grubu 2, 19-40 yaş grubu 3, 40 yaş üstü ise 4 rakamları ile ifade edildi. Menstruel siklus için menstruel evre 1, proliferatif evre 2, luteal evre 3 rakamları ile ifade edildi.

**Erkeklerde serumenin yaşa göre tespit edilen % lipid kompozisyonu: % SK ve % TG+SYA değerlerinin, diğer yaş gruplarına oranla 1. yaş grubunda en düşük, % ME+KE'nin ise aynı grupta en yüksek olduğu tablo 10. da görülmektedir. % SK değerinin, 19-40 yaş grubunda en yüksek değerine ulaştığı görülmektedir. % TG+SYA değerleri ise 3. yaş grubuna kadar artarken 4. grupta hafif bir düşme göstermektedir. % ME+KE düzeyi yaşla birlikte azalırken en belirgin düşüş 1. ve 2. gruplar arasında tespit edildi (şekil 12). % K düzeyi, 1-10 yaş grubunda en yüksek düzeyde iken 2. yaş grubunda düşmekte ve diğer gruplarda yaklaşık olarak aynı düzeyini korumaktadır (tablo 14).**

**Kadınlarda serumenin yaşa göre tespit edilen % lipid kompozisyonu:** Erkeklerde tespit edilen % lipid değerlerine büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (tablo 11). % SK ve % TG+SYA düzeyleri, 1. yaş grubunda en düşük düzeyde iken, diğer gruplarda bu yaş grubuna göre artış gösterdiği tespit edildi. Erkeklerde, 40 yaşın üzerinde muhtemelen hormonal aktivitenin azalmasına bağlı olarak 19-40 yaş grubuna göre SK düzeyinin azaldığı, kadınlarda ise 20' li yaşlardan itibaren bu azalmanın



**Şekil 12. Erkeklerde yaş gruplarına göre serum lipitlerinin % kompozisyonu**



**Şekil 13. Kadınlarda yaş gruplarına göre serum lipitlerinin % kompozisyonu**

başladığı belirlendi (şekil 13). % **ME+KE** düzeyi ise, 1. yaş grubunda en yüksek seviyede iken 2. yaş grubunda azalmakta ve diğer yaş gruplarında yaklaşık olarak aynı düzeyini korumaktadır. % **K** düzeyinde çok önemli farklar gözlenmedi (tablo 14).

**Erkeklerde serumen lipidlerinin kendi aralarındaki oranların yaşa göre karşılaştırması:** Yağ bezi orijinli lipid (**SK, ME+KE**) düzeylerinin büyük ölçüde epidermal kökenli olan **K** düzeyine oranları tablo 12’de görülmektedir. Temel farklılıklar, 1. grup ile diğer gruplar arasında tespit edildi.

**SK/K, TG+SYA/K** oranlarının 1. gruba göre diğer gruplarda daha yüksek olduğu belirlendi. Fakat, tamamen yağ bezi orijinli olan mum esterinin (**ME+KE**) kolesterole oranında ise bir değişim göstermediği belirlendi. Diğer yandan, **ME+KE/SK, ME+KE/TG+SYA** ve **TG+SYA/SK** oranları birlikte değerlendirildiğinde **SK** ve **TG+SYA**’nin **ME+KE**’ne göre bir artış gösterdiği, **SK**’nin **TG+SYA**’ne göre daha fazla arttığı görülmektedir. **TG/SYA** oranının 2. grupta diğer gruplara oranla en yüksek düzeyde olduğu tesbit edildi (tablo 15).

**Kadınlarda serumen lipidlerinin kendi aralarındaki oranların yaşa göre karşılaştırılması:** Kadınlarda serumen lipidlerinin oranları tablo 13’de verilmiştir. Yağ bezi kökenli lipidlerin (**SK, ME+KE** ve kısmen epidermal **TG+SYA**), epidermal lipidlere oranının erkekler ile benzer değişimler gösterdiği tespit edildi. Serumen lipidlerinin kendi aralarındaki oranlarda ise erkeklere göre en büyük farklılık **TG+SYA/SK** oranında görüldü. Yaş grupları arasında bu oran açısından belirgin bir fark gözlenmedi. **TG/SYA** oranı erkeklerdekine benzer bir patern gösterdi (tablo 15).

#### **Yaş grupları arasında cinsiyete göre serumen lipidlerinin karşılaştırılması:**

Serumen lipidlerinin % kompozisyonu, yaş grupları arasında cinsiyete göre karşılaştırıldı. % **SK** düzeyi, 19-40 yaş grubunda kadınlarda erkeklere oranla daha düşük tesbit edilirken, aynı grupta % **K** düzeyi, erkeklere oranla daha yüksek bulundu. % **SYA** değeri 1. grupta kadınlarda erkeklere oranla daha düşük olarak belirlendi.

Yaş grupları arasında cinsiyete göre serumen lipid oranları karşılaştırıldığında (tablo 17), **ME+KE/SK, TG+SYA/SK** oranları, 3. grupta kadınlarda erkeklere oranla daha yüksek tesbit edilirken, **SK/K** oranı daha düşük tespit edildi.

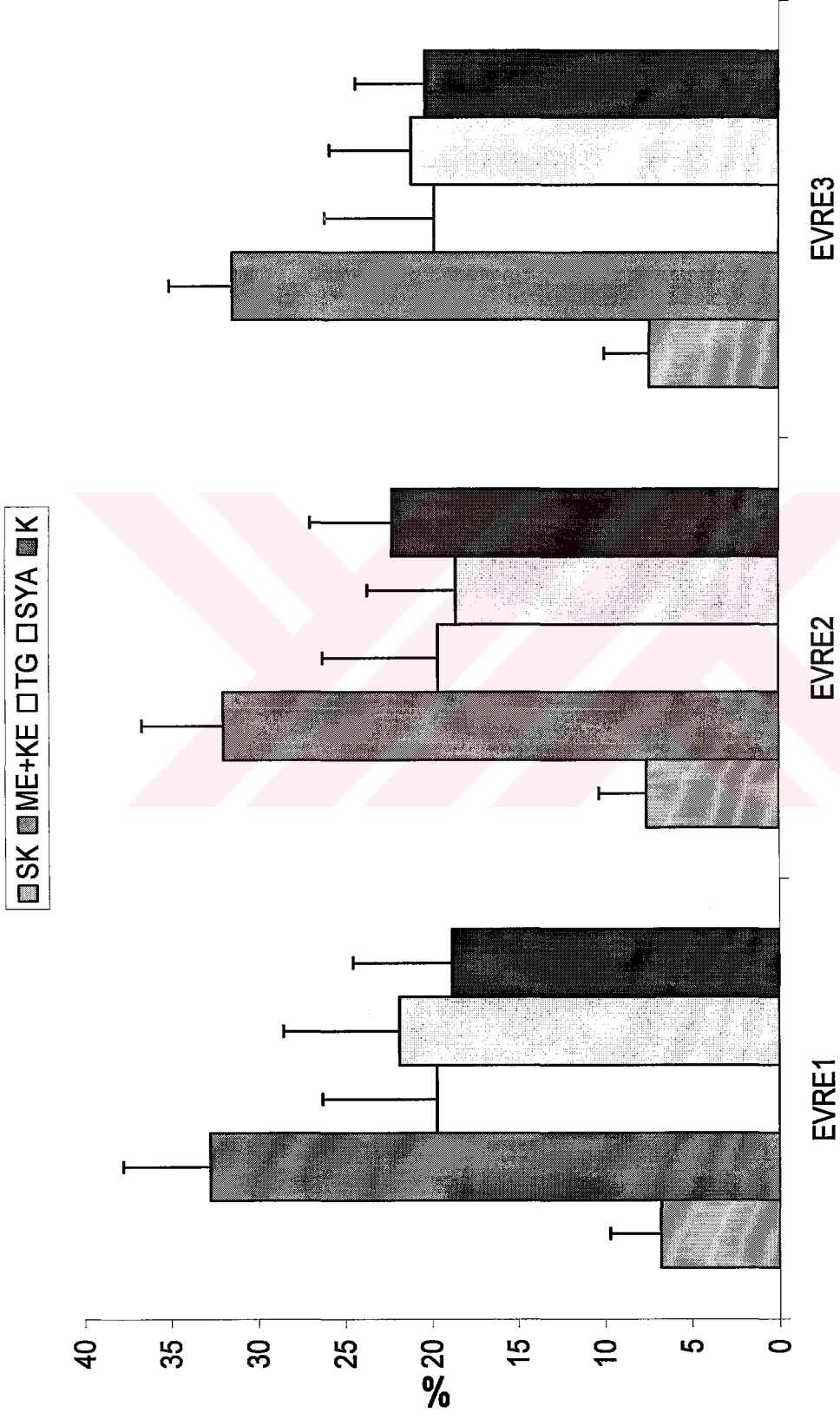
#### **Menstruel siklus evrelerinde serumen lipidlerinin karşılaştırılması:**

Menstruel siklus evrelerine göre serumen lipidlerinin % kompozisyon değişimleri tablo 18-19’da görülmektedir. Proliferatif evrede, % **SK** ve **K** düzeylerinde bir artış görülürken, % **SYA** ve **TG+SYA** düzeylerinde bir azalma tespit edildi. Luteal

evrede ise, proliferatif evreye göre % SYA ve TG+SYA düzeyleri artış gösterirken % K düzeyinde düşüş tespit edildi (şekil 14).

Menstruel siklus evrelerine göre serumun lipidlerinin kendi aralarındaki oranları incelendiğinde ( tablo 20-21), en fazla farklılığın, proliferatif evre ile menstruel evre arasında olduğu görüldü. **ME+KE/K** oranı, 1. evrede diğer evrelerden daha yüksek olarak belirlendi. **TG+SYA/K** oranı, 2. evrede diğer evrelerden daha düşük olarak belirlendi. **ME+KE/TG+SYA** oranı, 2. evrede diğer evrelere oranla daha yüksek olarak belirlendi. **ME+KE/SK** oranı, 2. evrede 1. evreye oranla daha düşük belirlendi. **TG+SYA/SK**, 2. evrede 1. evreye oranla daha düşük olarak belirlendi.





**Şekil 14. Menstruel siklus evrelerinde serumen lipidlerinin % kompozisyonu**

**Tablo 10 . Erkeklerde yaş gruplarına göre serumen lipidlerinin % kompozisyonu :**

Yaş Grubu	Ortalama Yaş	Örnek Sayısı	SK	ME+KE	TG	SYA	TG+SYA	K
1-10	7.0±2.42	15	4.92±2.29	41.32±4.10	13.20±4.18	15.97±3.48	29.18±3.96	24.56±4.52
11-18	14.8±1.97	15	9.34±2.02	34.36±3.24	20.24±5.06	15.36±4.99	35.52±5.41	20.78±5.31
19-40	30.1±5.58	30	9.36±2.47	33.32±3.07	18.46±5.56	20.92±3.55	39.38±3.47	18.33±3.30
40 +	49.510.02	15	7.78±2.89	32.99±2.70	16.91±5.02	21.51±3.38	38.45±4.25	20.78±5.94

**Tablo 11 . Kadınlarda yaş gruplarına göre serumen lipidlerinin % kompozisyon:**

Yaş Grubu	Ortalama Yaş	Örnek Sayısı	SK	ME+KE	TG	SYA	TG+SYA	K
1-10	4.61±2.40	18	4.98±2.05	45.24±5.60	14.02±4.59	13.48±2.86	27.44±3.85	22.29±4.33
11-18	15.20±2.51	15	9.34±2.37	34.13±4.71	22.13±7.68	14.08±4.78	36.22±5.03	20.32±4.35
19-40	29.20±4.91	90	7.25±2.73	32.04±4.46	19.73±6.43	20.53±6.19	40.27±5.13	20.49±5.02
40 +	50.0±7.30	14	7.24±2.60	34.18±2.61	18.09±5.84	19.18±2.52	37.22±4.92	21.29±6.10

**Tablo 12 . Erkeklerde yaş gruplarına göre serumen lipidlerinin kendi aralarındaki oranları:**

Yaş Grubu	Örnek Sayısı	SK/K	ME+KE/ K	TG+SYA/ K	ME+KE/ SK	ME+KE/ TG+SYA	TG+SYA/ SK	TG/SYA
1-10	15	0.21±0.12	1.75±0.43	1.24±0.36	10.91±7.24	1.45±0.31	7.54±4.59	0.89±0.46
11-18	15	0.48±0.18	1.76±0.47	1.89±0.84	3.93±1.31	0.99±0.19	4.05±1.44	1.54±0.88
19-40	30	0.53±0.18	1.88±0.44	2.23±0.53	3.85±1.25	0.85±0.13	4.52±1.31	0.94±0.39
40 +	15	0.43±0.23	1.70±0.45	2.01±0.64	5.22±3.26	0.86±0.13	5.89±3.24	0.82±0.32

**Tablo 13 . Kadınlarda yaş gruplarına göre serumen lipidlerinin kendi aralarındaki oranları:**

Yaş Grubu	Örnek Sayısı	SK/K	ME+KE/ K	TG+SYA/ K	ME+KE/ SK	ME+KE/ TG+SYA	TG+SYA/ SK	TG/SYA
1-10	18	0.22±0.12	2.12±0.60	1.28±0.34	11.29±6.57	1.70±0.50	6.55±3.30	1.12±0.57
11-18	15	0.48±0.18	1.77±0.56	1.90±0.65	3.94±1.34	0.96±0.22	4.05±0.92	1.85±1.00
19-40	90	0.40±0.24	1.70±0.69	2.13±0.81	5.21±2.57	0.81±0.21	6.85±4.39	1.12±0.66
40 +	14	0.39±0.23	1.73±0.50	1.96±0.82	5.50±2.47	0.93±0.18	5.66±1.67	0.98±0.41



**Tablo 14 . Erkek ve kadınlarda yaşa göre serumen lipidlerinin % kompozisyon değişiminin karşılaştırması (P < 0.05):**

Cinsiyet	Grup	SK	ME+KE	TG	SYA	TG+SYA	K
Erkek	1-2	↑	↓	↑		↑	↓
Erkek	1-3	↑	↓	↑		↑	↓
Erkek	1-4	↑	↓			↑	↓
Erkek	2-3					↑	
Erkek	2-4					↑	
Erkek	3-4	↓					
Cinsiyet	Grup	SK	ME+KE	TG	SYA	TG+SYA	K
Kadın	1-2	↑	↓	↑		↑	
Kadın	1-3	↑	↓	↑		↑	
Kadın	1-4	↑	↓			↑	
Kadın	2-3	↓				↑	
Kadın	2-4	↓				↑	
Kadın	3-4	↓				↓	

1-(1-10) yaş, 2-(11-18) yaş, 3-(19-40) yaş, 4-(40+) yaş

**Tablo 15 . Erkek ve kadınlarda yaşa göre serumen lipidlerinin kendi aralarında oranları ( P < 0.05 ) :**

Cinsiyet	Grup	SK/K	ME+KE/ K	TG+SYA/ K	ME+KE/ SK	ME+KE/ TG+SYA	TG+SYA/ SK	TG/SYA
Erkek	1 - 2	↑		↑	↓	↓	↓	↑
Erkek	1 - 3	↑		↑	↓	↓	↓	
Erkek	1 - 4	↑		↑	↓	↓		
Erkek	2 - 3					↓		↓
Erkek	2 - 4							↓
Erkek	3 - 4							
Cinsiyet	Grup	SK/K	ME+KE/ K	TG+SYA/ K	ME+KE/ SK	ME+KE/ TG+SYA	TG+SYA/ SK	TG/SYA
Kadın	1 - 2	↑		↑	↓	↓		↑
Kadın	1 - 3	↑	↓	↑	↓	↓		
Kadın	1 - 4	↑		↑	↓	↓		
Kadın	2 - 3					↓		↓
Kadın	2 - 4						↑	↓
Kadın	3 - 4							↓

1 - (1 - 10) yaş, 2 - (11 - 18) yaş, 3 - (19 - 40) yaş, 4 - (40 +) yaş

**Tablo 16 . Yaş grupları arasında cinsiyete göre serumen lipidlerinin % kompozisyon değişiminin karşılaştırması ( P < 0.05 ) :**

Yaş Grubu	Cinsiyet	SK	ME+KE	TG	SYA	TG+SYA	K
1 - 10	E → K				↓		
11 - 18	E → K						
19 - 40	E → K	↓					
40 +	E → K						↑

( E – Erkek, K – Kadın )

**Tablo 17 . Yaş grupları arasında cinsiyete göre serumen lipidlerinin kendi aralarında oranları( P < 0.05 ) :**

Yaş Grubu	Cinsiyet	SK/K	ME+KE/ K	TG+SYA/ K	ME+KE/ SK	ME+KE/ TG+SYA	TG+SYA/ SK	TG/ SYA
1 - 10	E → K							
11 - 18	E → K							
19 - 40	E → K	↓			↑		↑	
40 +	E → K							

( E – Erkek, K – Kadın )

**Tablo 18 . Menstruel siklus evrelerindeki serumen lipidlerinin % kompozisyonu :**

Evre	Hormon Etkisi	SK	ME+KE	TG	SYA	TG+SYA	K
Menstruel 1	Yok	6.78±2.91	32.76±5.02	19.73±6.58	21.87±6.66	41.62±5.09	18.85±5.70
Proliferatif 2	Östrojen	7.58±2.71	31.96±4.70	19.62±6.63	18.56±5.09	38.22±5.11	22.26±4.74
Luteal 3	Östrojen+ Progesteron	7.40±2.60	31.44±3.64	19.85±6.29	21.15±6.42	40.95±4.70	20.36±4.03

**Tablo 19 . Menstruel siklus evrelerine göre serumen lipidlerinin % kompozisyon değişiminin karşılaştırması (P < 0.05)**

Evre	SK	ME+KE	TG	SYA	TG+SYA	K
1-2	↑			↓	↓	↑
1-3						
2-3				↑	↑	↓

(Evre 1 : menstruel, Evre 2 : proliferatif, Evre 3 : luteal)

**Tablo 20. Menstruel siklus evrelerine göre serumen lipidlerinin kendi aralarındaki oranları (P < 0.05):**

Evre	Hormon Etkisi	SK/K	ME+KE/K	TG+SYA/K	ME+KE/SK	ME+KE/TG+SYA	TG+SYA/SK	TG/SYA
Menstruel 1	Yok	0.43±0.31	1.98±0.94	2.48±1.06	5.94±3.35	0.80±0.20	8.04±5.88	1.07±0.66
Proliferatif 2	Östrojen	0.38±0.21	1.52±0.52	1.82±0.60	4.81±1.96	0.86±0.25	5.87±2.80	1.21±0.70
Luteal 3	Östrojen+ Progesteron	0.38±0.18	1.61±0.42	2.10±0.55	4.89±2.09	0.78±0.17	6.65±3.76	1.09±0.62

**Tablo 21. Menstruel siklus evrelerine göre serumen lipidlerinin kendi aralarındaki oranları (P < 0.05):**

Evre	SK/K	ME+KE/K	TG+SYA/K	ME+KE/SK	ME+KE/TG+SYA	TG+SYA/SK	TG/SYA
1-2		↓	↓	↓	↑	↓	
1-3		↓					
2-3			↑		↓		

(Evre 1: menstruel, Evre 2: proliferatif, Evre 3: luteal)

## TARTIŞMA

Bu çalışmada seçilen yaş grupları, yaş, cinsiyet ve menstruel siklusta serumenin lipid kompozisyonundaki fizyolojik değişimleri ortaya koyabilmek amacıyla düzenlendi. Bir yaş ve altındakilerde ve yeni doğanlarda, serumenin insanlardaki koruyucu özelliği dikkate alınarak etik açıdan sakıncalı bulunduğundan örnek alınmadı.

Alınan serumen örnekleri, görünüş ve kıvam açısından mevcut bilgiler ile paralellik gösterdi (39). Çocuklardan alınan örneklerin, erişikinelere oranla daha açık renkli, parlak, yumuşak ve bol olduğu tesbit edildi. Erişkinlerden alınan örnekler ise sarıdan kahverengiye değişik renklerde daha sert ve daha az olarak gözlemlendi.

Örnekler plakalara değişik hacimlerde tatbik edildi (10-60  $\mu$ L). Lipid içeriği az olan numuneler daha berrak görünürken, lipid içeriği zengin olan numuneler ise bulanık görünümlü olarak belirlendi. Aynı şekilde plaka üzerinde bulanık numuneler, tatbik noktasında kirli sarı renkte bir görüntü oluştururken, berrak numuneler tatbik noktasında beyaz renkli bir görüntü oluşturdu. Berrak numuneler, plakaya daha fazla hacimlerde (40-60  $\mu$ L) tatbik edilirken, bulanık numuneler için daha düşük hacimler (10-30  $\mu$ L) yeterli oldu. Hacme bağlı olarak silik veya bantları birbirine karışmış olan numuneler, uygun bant görüntülerini elde etmek için hacimleri arttırılarak veya eksiltilerek tekrar çalışıldı.

HPTLC çalışması için seçilen çözücüler ne kadar uygun olsada, tek bir metod ile HPTLC plakası üzerinde aynı zamanda polar, nötral ve nonpolar lipidleri birbirinden ayırmak, teknik olarak bir çok zorluğu beraberinde getirmektedir. Özellikle polar

lipidlerin gösterilebilmesi daha zor görünmektedir. Polar lipidler, kloroform/metanol ile çözülen örneklerde daha belirgin olarak görülmesine rağmen, bant görüntüsü net olmayıp, plaka üzerinde kümelenmiş olarak görüntü verdi. Hekzan/dietileter/asetik asit ile çözülen örneklerde polar lipidler net bantlar olarak görülmesine rağmen, anlamlı yüzde teşkil edecek kadar pik yüksekliği vermediği gözlemlendi. Sadece polar lipidleri göstermek için yapılan çalışmalarda da net bant ayırımı gerçekleştirilemedi. Çözücü olarak kloroform/metanol/distile su kullanılarak yapılan çalışmada, yoğun hacimlerde (150 µL) örnek uygulaması ile fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin çok net olmasada gösterilebildi. Bu çalışmada kullanılan HPTLC metodunun, nötral ve non polar lipidlerin ayırımı için daha uygun bir metod olduğu kanaatine varıldı.

Lipid bantlarına ait elde edilen dansitometrik analiz ile iki ayrı sayısal değere ulaşılabilmektedir. Bunlar, lipid piklerine ait yükseklik ve alan değerleridir. Lipid bantlarına ait dansitometrik taramada, bazı pik alanları yanındaki diğer bir lipide ait pik alanı ile belli ölçüde içiçe geçebildiğinden lipid yüksekliğine ait değerler kullanıldı.

Çözücü 2 hizasına gelen lipid bantına ait görüntü mum esteri + kolesterol esteri olarak değerlendirildi. Standartlar karşılaştırıldığı zaman mum esteri ve kolesterol esterine ait standart (bee wax, kolesterol oleat), bantlarının üst üste çakıştığı belirlendi. Layton ve arkadaşları tarafından kolesterol esterlerinin yüzde kompozisyon olarak çok büyük bir oran (% 3) teşkil etmediği ifade edilmiştir (67). Kellum ve arkadaşları tarafından kolesterol esterleri tesbit edilememiştir (66). Nordstrom ve arkadaşları da çalışmalarında mum esteri + kolesterol esterini birlikte bir bant olarak göstermişlerdir (68). Bu bant görüntüsünün tamamının mum esterine ait olması daha kuvvetli bir ihtimal olarak görülmektedir. Kolesterol esterine ait standartın bu bölge ile çakışması sebebiyle mum esteri + kolesterol esteri (ME+KE) olarak tarif etmenin daha uygun olacağı düşünülerek sonuçların değerlendirilmesinde de ME+KE olarak yer verildi.

Çalışılan örneklerde hem yaş grupları içinde hem de menstruel siklus evrelerinde birtakım bireysel farklılıklar tesbit edildi. Bu bireysel farklılıklar, özellikle triaçilgliserol (TG) ve serbest yağ asiti (SYA) düzeylerinde tesbit edildi. Thody ile Cotteril ve arkadaşları, SYA nin deri yüzeyinde bakteriyel lipazların etkisiyle veya yağ bezi kanalında mevcut bulunan esterazların lipolizi neticesinde TG den oluştuğunu ifade etmektedirler (4, 20). Kişilerin bakteriyel floralarındaki birtakım değişiklikler TG ile SYA dönüşümünde bireysel farklılığa yol açmış olabilir. Bu bireysel farklılıklardan kaçınmak amacıyla, elde edilen verilerin daha sağlıklı ve daha güvenilir olacağı

düşünülmüş TG ve SYA düzeyleri, bir bütün olarak TG+SYA düzeyi olarak değerlendirildi.

Çalışmanın tekrarlanabilirliğini ve güvenilirliğini göstermek açısından Rf ve Rst değerleri ile interassay ve intraassay CV ölçümleri yapıldı. Sonuçların, standartlar ve örnekler açısından kabul edilebilir düzeylerde olduğu görülmektedir. Sadece kolesterole ait CV değerleri yüksek bulundu. Kolesterol için interassay CV değeri % 10.5, intraassay CV değeri % 15.2 olarak tesbit edildi. Kolesterol bantı, 1. çözücü hizasına yakın çıkmaktadır. Plaka üzerinde net bir bant olarak gösterilmesine rağmen, dansitometrik görüntü olarak 1. çözücüye ait pik yüksekliği ile çakışabilmektedir. Kolesterole ait yüksek CV değerlerinin bu çakışmadan kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Bortz ve arkadaşlarına göre, insan deri yüzeyinde bulunan alkanlar, çeşitli petrol distilasyon fraksiyonlarının bir karışımı olup çevreden direkt kontaminasyondan kaynaklanmaktadır (55). Çalışmamızda, 5 serumen örneğinde alkan bantı belirlendi. Bir kişiden, direkt kontaminasyonu gösterebilmek amacıyla, iki ayrı örnek alınarak çalışıldı. Kişinin bilinen özelliği, sobalı evde oturuyor olmasıydı. Kömür dumanının bu kontaminasyona neden olabileceği düşünülmekteydi. İlk serumen örneği alındı ve dış kulak yolu tamamen temizlendi. Yeni serumen örneği alınıncaya kadar sobalı ortamdan uzaklaştırıldı. İlk alınan serumen örneğinde alkan bantı mevcutken, ikinci serumen örneğinde alkan bantı tesbit edilmedi. Serumen lipid profili içinde alkanların olmadığı, eğer tesbit ediliyorsa çevreden kontaminasyona bağlı olarak gelişebileceği anlaşılmaktadır. Kömür dumanının bu kontaminasyonun muhtemel nedeni olarak değerlendirildi.

Willie ile Layton ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarda insan sebumunun % lipid kompozisyonuna ait farklı görüşler ifade etmektedirler. İnsan sebumunun, % 50-57.5 TG+SYA, % 1.5-7 kolesterol, % 2-3 kolesterol esteri, % 11-12 skualen, ve % 17-26 mum esterlerinden oluştuğu bildirilmektedir (69, 67). Bu çalışmada da skualen, mum esteri + kolesterol esteri, triaçilgliserol, serbest yağ asiti ve kolesterol anlamlı olarak tesbit edilen başlıca lipidlerdir. Yaş, cinsiyet ve menstruel sıklusa göre değerlendirildiklerinde insan serumen lipidlerinin, sabit bir yüzde kompozisyonuna sahip olmadıkları, fizyolojik değişkenler ile yüzde kompozisyonların da değiştikleri anlaşılmaktadır.

Deri yüzeyindeki çoğu lipid yağ bezlerinden köken almaktadır. Geriye kalan lipidlerin çoğu epidermin stratum korneum hücrelerinden kaynaklanıp, bu kaynakların



kısmi katkısı, numune alınan belirli bir bölgedeki yağ bezlerinin sayısına bağlıdır. Kafatası ve yüzde santimetrekarede 900 yağ bezi bulunurken kolda 40 kadar tespit edilmiştir (7). Aynı kişinin alın bölgesinden sebum, dış kulak yolundan ise serumen örneği alınarak analiz edildiğinde sebum ve serumenin yüzde lipid kompozisyonlarının birbirinden farklı olduğu tespit edildi. Aynı kişinin sebumunun % 12.5 SK, % 33 ME+KE, % 48.1 TG+SYA, % 6.4 K içerdiği, serumenin ise % 5.5 SK, % 34.9 ME+KE, % 39.2 TG+SYA ve % 20.4 K içerdiği tespit edildi. Yağ bezinden köken alan lipidlerin sebumda, epidermal kökenli lipid katkısının serumende daha fazla olduğu en belirgin farklılık olarak gözlenmektedir.

İnsanlarda yağ bezi aktivitesi, yaşa ve cinsiyete bağımlı farklılıklar göstermektedir (35, 70). Yağ bezi sekresyonu çocuklarda düşüktür ve androjenlerin etkisi altında çocukluk çağının ortalarından sonuna doğru artmaya başlamaktadır. Bu yükseliş onlu yaşların sonuna kadar devam eder, ancak bundan sonra bir değişiklik görülmediği ifade edilmiştir (35). Erkeklerde, genç erişkinlikten 80 yaşa kadar sebum düzeyi değişmemektedir. Kadınlarda, yağ bezi sekresyonu menapozdan sonra tedrici olarak azalır ve 70 yaşa kadar önemli bir değişiklik göstermemektedir (35,70). Hem erkek hem de kadınlarda androjenlerin endojen üretiminin yaşla birlikte azalmasının, yağ bezi sekresyonunun azalmasının sebebi olduğu belirtilmektedir (35).

Bu çalışmada insan serumeninin lipid kompozisyonunun biyolojik değişkenler ile (yaş, cinsiyet ve menstruel siklus) nasıl değiştiği araştırıldı. Yaş, cinsiyet ve menstruel siklus ile serumenin yüzde kompozisyonunda farklılıklar meydana geldiği tesbit edildi. Yaşa göre değerlendirildiğinde, kadınlarda ve erkeklerde göze çarpan en belirgin farklılıkların 1. grup ile diğer gruplar arasında olduğu anlaşılmaktadır. Her iki cinsiyette kompozisyon farklılıkları, özellikle androjen etkisine bağlı fizyolojik düzeyde hormonal değişimlerin olduğu ergenlik döneminden itibaren görülmektedir. Kompozisyon farklılığının, yağ bezlerinin aktivasyonuna paralel olarak daha çok yağ bezi kökenli lipidlerin (SK ve kısmen epidermal olan TG+SYA) artışına bağlı olduğu anlaşılmaktadır.

TG+SYA düzeyindeki temel farklılık, diğer gruplar ile 1. grup arasında belirlendi. Ergenliğin başlamasıyla beraber erkeklerde ve kadınlarda artış olduğu görülmektedir. TG+SYA düzeyindeki bu artışın 11-18 yaş grubunda TG artışına bağlı olarak geliştiği, 20'li yaşlardan itibaren SYA düzeyindeki artışa bağlı olarak değiştiği anlaşılmaktadır. TG düzeyinin ergenlikle beraber artış göstermekte olduğu ve daha sonra değişmediği belirlendi. SYA düzeyinin, ergenlikle beraber değişmediği, 20'li

yaşlar ile birlikte artmaya başladığı ve yaş artışıyla beraber bu artışın devam ettiği belirlendi. SYA oranındaki bu değişimin hormonal aktivitenin (androjen) artışına bağlı olmadığı düşünülmektedir.

K düzeylerinin, kadınlarda yaşa göre değişiklik göstermediği, erkeklerde ise 1. gruba göre diğer gruplarda daha düşük olduğu belirlendi. Kadınlarda, ergenlik dönemi ile ortaya çıkan östrojen katkısının, erkek ve kadın kolesterol düzeylerindeki bu farklılığın sebebi olabileceği düşünülmektedir. Kolesterolle ait CV değeri, % 15 oranında belirlendi Yaşa göre kadın ve erkek oranları arasındaki bu farklılığın, yüksek CV değerinden ortaya çıkmış olmasında muhtemeldir.

Millns ve arkadaşlarına göre, yüzey lipidlerinin skualen içeriğinin yağ bezi aktivitesinin ve bez büyüklüğünün bir göstergesi olabileceği, ayrıca mum esteri düzeyinin veya mum esteri/kolesterol+kolesterol esteri oranının yağ bezi aktivitesini yansıtabileceği ifade edilmektedir (10). Çalışmamızda, tüm yağ bezi lipidleri, kendi aralarında ve epidermal lipidlerle oranlanarak daha geniş olarak ele alındı. Tüm lipidlerin değerlendirilmesi ile fizyolojik düzeyde hormonal varyasyonların ve lipid kompozisyonları arasındaki değişimlerin daha net görülebilecekleri düşünüldü.

Serumenin yağ bezi kökenli lipidleri ile epidermal kökenli lipidleri yaşa oranlandığı zaman, yine en büyük farklılıkların 1. grup ile diğer gruplar arasında olduğu belirlendi. Yağ bezi kökenli lipidlerden SK ve kısmen epidermal katkılı TG+SYA, K ile oranlandığı zaman her iki cinsiyette de androjen aktivitesinin artması ile birlikte bu oranların arttığı anlaşılmaktadır. ME/K+KE, yağ bezi aktivite göstergelerinden biridir. Bu oranın 20'li yaşlarda en yüksek değerine ulaştığı, çocukluktan erişkinliğe kadar belirgin farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir (71). ME/K+KE oranının yaşla birlikte arttığı (9-15 yaş) belirtilmiştir (72). Çalışmamızda, ME+KE/K oranlarında belirgin bir farklılık gösterilemedi. Kadınlarda 3. grup 1. gruba oranla daha düşük olarak belirlendi. Kolesterolün kadınlarda sabit kalışı ve ME+KE düzeyinin yaşla beraber düşüş göstermesinin bu farklılığın nedeni olabileceği düşünülmektedir. Proliferatif evrede, östrojen etkisi ile % K düzeyi artmaktadır. Östrojenin epidermal katkısını artırmasına bağlı olarak, bu yaş grubunda erkek ve kadın cinsiyet farklılığının gelişmiş olabileceği de düşünülmelidir.

Serumenin yağ bezi kökenli lipidleri kendi aralarında oranlandığı zaman, her iki cinsiyette de ergenlik dönemi ile birlikte, SK ve TG+SYA düzeylerinde bir artış olmasına karşılık ME+KE düzeylerinde azalma görülmektedir. Yaşamın ilk on yılında ME+KE düzeyi kompozisyonda önemli bir % oluştururken, ergenlikle beraber SK ile

TG+SYA düzeylerinin kompozisyona hakim olduğu ve androjen aktivitesinin azaldığı 40 yaş üzeri grupta, SK oranı düştüğü halde TG+SYA oranının artmaya devam ettiği anlaşılmaktadır. TG+SYA, kısmen epidermal kökenli olduğu için, epidermal katkının bu artışın muhtemel kaynağı olabileceği söylenebilir. Mum esteri ise tamamen yağ bezi kökenli bir lipid olmasına rağmen, androjen aktivitesinin başlaması ile birlikte oran olarak azalmaktadır. ME+KE'nin, yağ bezi aktivitesinin artışından ve androjen etkisinden etkilenmediği görülmektedir. Androjenlerin, insan serumunda lipid kompozisyonu üzerine temel etkisinin SK ve TG+SYA düzeyleri üzerine olduğu anlaşılmaktadır. Sonuçlar, ME+KE üreten yağ hücrelerinin, SK ve TG+SYA üreten yağ hücrelerinden farklı olabileceğini düşündürmektedir.

İnsan serumu lipidleri cinsiyete göre karşılaştırıldığı zaman, tek farklılığın 19-40 yaş grubunda olduğu görülmektedir. 19-40 yaş grubunda erkek ve kadın cinsiyet arasındaki temel farklılığın SK ve K düzeylerinden kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Androjenlerin, SK düzeyi üzerine daha fazla etkisi olduğu görülmektedir. Erkek cinsiyette, androjen etkisinin kadınlara oranla daha belirgin olduğu anlaşılmaktadır. Kadınlarda 19-40 yaş grubundaki epidermal katkının daha fazla olduğu görülmektedir. Thody ve arkadaşlarına göre, östrojenler, yağ bezi aktivitesini insan ve deney hayvanlarında inhibe etmektedir. Östrojenler yağ bezlerini, ya hipofiz gonodotropinlerini baskılayıp androjenlerin üretimini inhibe ederek veya testosteronun testosteron bağlayan globuline bağlanmasını artırarak inhibe etmektedirler (4). Bu yaş grubunda, östrojen etkisinin daha belirgin olduğu ve androjen etkisini azalttığı düşünülebilir.

Menstruel siklus evrelerinde, serumun lipid kompozisyonu değerlendirildi ve lipid kompozisyonunun menstruel siklus evrelerinde de farklılık gösterdiği belirlendi. Burada oluşan temel farklılıkların, proliferatif evre ile diğer evreler arasında olduğu görülmektedir. Siklusun başında (menstruel evre), östrojen ve progesteron değerleri çok düşüktür. Proliferatif evrede östrojen miktarı giderek artmaktadır. Ovulasyondan 30-60 saat önce pik yapar, ovulasyonu takiben geçici olarak düşer. Luteal evrede, hiç bir zaman preovulatuvar pikten fazla olmamak kaydıyla değişen değerlerde devam eder. Progesteron, proliferatif evrede çok düşüktür. Ovulasyondan itibaren yükselmeye başlar, luteal evrenin ortasında en yüksek değerine ulaşır ve daha sonra düşmeye başlar. Menstruasyona yakın günlerde ovulasyondaki değerine ulaşır (65). Hormon etkisinin bulunmadığı menstruel evre ile luteal evre arasında anlamlı farklılıklar bulunmamaktadır. Proliferatif evrede, epidermal katkının kolesterol düzeyinin

yükselişine bağlı olarak arttığı düşünülebilir. SK düzeyindeki artışının, TG+SYA azalmasına ve K artışına bağlı olarak rölatif bir yükselme olması muhtemeldir. TG+SYA düzeyindeki düşüşün temel nedeninin SYA düzeyindeki düşüş olduğu anlaşılmaktadır. Evreler arasında TG oranlarında herhangi bir değişiklik gösterilemediği için, bu düşüşün sebebinin TG hidrolizine bağlı olarak geliştiğini söylemek mümkün görünmemektedir. SYA kullanımının arttığı, bu durumun SYA düzeyinin ve buna bağlı olarak TG+SYA düzeyinin düşmesine sebep olabileceği düşünülmektedir. Luteal evrenin, proliferatif evre ile zıt etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu evrede, epidermal katkının azaldığı görülmektedir. Evreler arasındaki serumun lipid kompozisyon farklılıklarının, fizyolojik düzeydeki hormonal etkiden kaynaklandığı söylenebilir. Proliferatif evrede östrojen etkisi, luteal evrede ise, östrojen ve progesteronun ortak etkisinden çok, progesteron etkisi ile SYA ve K düzeyleri değişmektedir. Progesteronun, lipid kompozisyonu üzerine östrojene zıt etki gösterdiği söylenebilir. ME+KE düzeyi, menstruel siklusun hiçbir evresinde farklılık göstermedi. ME+KE üretiminin östrojen ve progesteron etkisinden bağımsız olarak gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Östrojenin TG+SYA ve K kompozisyonu üzerine etkisinin, androjenlerin etkisine zıt olduğu, progesteronun ise belirgin olmamakla beraber östrojene zıt olarak etki gösterdiği görülmektedir. ME+KE kompozisyonunun östrojen, progesteron ve androjenlerden etkilenmediği söylenebilir.

Sebum sentezi ile deri yüzeyine sekresyonu arasında geçen zaman 8 gündür. Germinatif hücre bölünmesi ve aktif farklılaşma arasında ise 5-6 günlük bir süre vardır. Yağ bezi hücreleri için tam bir transizyon zamanı 13-14 gün olarak belirtilmiştir (73). Menstruel siklusta örnekler, tam bir transizyon zamanı hesaplanarak alındı. Menstruel evre (siklusun 2. ve 3. günleri), için transizyon zamanı hesaplanarak örnekler, 16-17. günlerde, proliferatif evre (12-13.gün) için, 26-27. günler, luteal evre (21.gün) için, takip eden siklusun 6-7. günlerinde alındı. Örnekler alınırken sebum transizyon zamanının, bazı kişilerde farklı olabileceği veya birtakım faktörlerin transizyonu geciktirebileceği ve bununda bir evrenin yağ bezi içeriğinin diğer evre ile karışabileceği ihtimalinin de göz önünde bulundurulması gereklidir. Fizyolojik düzeyde hormon etkisinin, serumun lipid kompozisyonu üzerine etkisinin tam olarak gösterilebilmesi için bu sürenin yeterli olmaması da mümkündür.

Huang ve arkadaşlarına göre, serumun hidrofobik özelliği ve viskozitesi tek bir bileşenden ziyade lipid sınıflarının kombinasyonundan oluşmaktadır. Bu bileşenlerin % kompozisyon farklılıklarının, serumun fiziksel özelliklerine yansıdığı ifade

edilmektedir. Hidrofobisite, yüzey gerilimini etkileyerek, deriyi dış etkenlere karşı korumada önemli bir rol oynamaktadır (3). Klinik gözlemler, çocukların erişkinlere oranla daha az dış kulak yolu enfeksiyonuna yakalandığını ortaya koymaktadır. İnsan serumunun lipid kompozisyonu yaşa ve cinsiyete göre incelendiğinde, her iki cinsiyette daha hidrofob lipid kompozisyonun, 1-10 yaş grubuna ait olabileceğini düşündürmektedir. Bu grupta ME+KE, her iki cinsiyette de lipid kompozisyonunun çoğunluğunu (% 41.32 - %45.24) oluşturmaktadır. Hidrofob yapı düşünüldüğü zaman, çocukların erişkinlere oranla daha koruyucu bir serumene sahip olabileceği, çocuk serumunun bu özelliğinin erişkinlere oranla dış kulak yolu enfeksiyonuna yakalanma olasılığını daha aza indirebileceği düşünülebilir .

Verniks kazeoza, gebeliğin son dönemlerinde üretilen doğal bir fetal bariyer olarak bilinmektedir (74, 75, 76). Yağ bezi ve epidermal kökenli lipidler ile bunun içine gömülü korneositlerden oluşmaktadır (77). Verniks kazeozanın % 62.5 lipid, % 36 protein ve % 1.5 karbohidrattan oluştuğu bildirilmiştir (78).

Yağ bezinden köken alan lipidler, hidrofobik bariyer etkisi gösterirken, korneositler suyun tahliyesinde yardımcı olmaktadır (77).

Verniks kazeoza, lipidden zengindir. Mum ve kolesterol esterleri, skualen, kolesterol ve triaçilgliserol içermektedir. Yüksek skualen ve mum esteri içerdiği için yağ bezi kökenli lipidleri daha fazla bulundurduğu ifade edilmektedir (79). Doğuma yakın dönemlerde (37. gebelik haftası), skualen içeriğinin rölatif olarak artmaya başladığı bildirilmektedir (80). Verniks kazeozanın hidrofobik lipid kompozisyonunun transepidermal su kaybını önlediği, fetal deriyi amniyon sıvısı ile fetal idrardan koruduğu ve doğum sırasında kayganlaştırıcı özelliği sayesinde doğumu kolaylaştırdığı ifade edilmektedir (81).

İnsan fetal adrenal gelişimi, 8-10. gebelik haftasında dehidroepiandrosteron sulfat (DHEA-S) sentezi ile başlamaktadır. Bu olay, 9-12. haftalarda tüy oluşumunu ve 13-15. haftalarda yağ bezleri gelişimini başlatır. DHEA-S, gebeliğin 2. ve 3. dönemlerinde artmaya başlar, buna bağlı olarak tüy oluşumu ile yağ bezi salgısında artış oluşur. DHEA-S aktivitesi, doğumla birlikte azalmaya başlar ve doğumdan sonraki 5. haftaya kadar azalarak devam eder. Bundan sonra durgun bir dönem başlar ve bu dönem, adrenarşa kadar devam eder. DHEA-S aktivitesindeki artış ile yağ bezi hücrelerinin, büyüdüğü ve salgılarının arttığı, aktivitenin azalmasıyla beraber yağ bezi hücrelerinin küçüldüğü ve sekresyonlarının azaldığı bir hipotez olarak ifade edilmektedir (81).

Fötal hayat süresince, transepidermal su kaybına ve amniyon sıvısına karşı daha fazla hidrofob faktöre ihtiyaç bulunduğu belirtilmektedir (81). Dış kulak yolunda da böyle bir bariyere ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır. Doğumla birlikte sıvı içerisindeki yaşam bitmiş olsa bile, yaşamın ilk yıllarında da benzer şekilde buna yakın bir hidrofob kompozisyonun devamlılığının gerektiği düşünülmektedir. Yaş ilerledikçe bu hidrofob bariyere daha az ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Onlu yaşlardan itibaren mum esterlerinin yerini skualen ve TG+SYA, kırklı yaşlardan sonra ise TG+SYA'nin almakta olduğu anlaşılmaktadır.

Mum esterleri, uzun zincirli yağ asitleri ve alkollerin esterleşmesinden oluşmaktadır. Uzun zincirli yağ asitlerinin sentezi, zincir uzaması şeklinde gelişmektedir. Bunun içinde NADPH gibi indirgeyici ekivalanlara ihtiyaç vardır, bu nedenle vücuda pahalıya mal olan bir süreçtir (82).

Derinin suya karşı koruma gerekliliği açısından şüphesiz fötal hayat daha önemlidir ve daha fazla korumaya ihtiyaç gösterir. Onun için serumen kompozisyonunun daha hidrofob özelliğe sahip olması gerekir ki bu da daha fazla mum esteri içeriği ile sağlanabilir. Ancak doğumdan sonra tedrici olarak suya karşı koruma ihtiyacı azalmaktadır. Serumdeki hidrofobisite, triaçilgliserol tarafından yeterince sağlanmaktadır.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan serumunun lipid kompozisyonu, yaş ve cinsiyet ile birlikte değişmektedir. Menstruel siklusun evrelerinde de lipid kompozisyonu değişiklik göstermektedir. Lipid kompozisyonundaki farklılıkların muhtemel sebebi, yaş ve cinsiyetle meydana gelen fizyolojik düzeydeki hormonal varyasyonlar olabilir.

İnsan serumu lipidlerindeki yaşa göre belirgin kompozisyon farklılıkları, hormonların aktif olmadığı 1-10 yaş grubu ile diğer yaş grupları arasında gelişmektedir. 1-10 yaş grubunda, lipid kompozisyonu çoğunlukla ME+KE'den oluşmaktadır. Androjen aktivitesinin başladığı ergenlik döneminden itibaren SK ve TG+SYA oranları artmaktadır ve erkeklerde SK artışı TG+SYA artışından daha fazla iken, kadınlarda eşit oranlarda arttığı söylenebilir. Yaş ilerledikçe SK artışı sabitlenmekte olup, TG+SYA artmaya devam etmekte ve lipid kompozisyonunun çoğunluğunu oluşturmaktadır.

Serumun lipid kompozisyonu, menstruel siklusun evrelerine göre de değişiklik göstermektedir. Temel farklılık, östrojen hakimiyetinin olduğu proliferatif evre ile diğer evreler arasında görülmektedir. Östrojen hakimiyeti ile SYA ve dolayısı ile TG+SYA oranları düşmekte, K oranı artmaktadır. Östrojen hakimiyeti ile epidermal katkı artmaktadır. Progesteron ve kısmen östrojen hakimiyetinin olduğu luteal evrede, progesteronun muhtemel etkisiyle SYA ve buna bağlı olarak TG+SYA artmakta, K oranının düşmekte olduğu görülmektedir.

Her iki cinste 19-40 yaş grubu haricinde lipid kompozisyon farklılığı görülmemektedir.

Hormonlar, insan serumen lipid kompozisyonundaki farklılıkların ana sebebi olarak değerlendirilebilir. Androjen etkisi ile SK ve TG+SYA artışı oluşmaktadır ve SK oranındaki artış TG+SYA oranından daha fazla olmaktadır. Östrojen etkisi ile SYA ve TG+SYA oranı düşmekte olup K oranı artmaktadır. Muhtemelen progesteron etkisi östrojen ile zıt gelişmektedir.

Tüm yaş grupları incelendiği zaman 1-10 yaş grubuna ait lipid kompozisyonunun, ME+KE hakimiyetine bağlı olarak daha hidrofob bir kompozisyon olduğu anlaşılmaktadır. Bu özelliği ile çocukların erişkinlere oranla daha koruyucu serumen örtüsüne sahip olduğu ve dış kulak yolu enfeksiyonuna yakalanma risklerinin daha az olduğu düşünülmektedir. Yaş ile birlikte insan serumeninin daha ekonomik bir lipid kompozisyonuna sahip olduğu görülmektedir. Cinsiyete ve menstruel siklus evrelerinde serumen lipid kompozisyonunun yaştaki kadar koruyuculuk özelliklerini değiştirebilecek belirgin bir değişim gözlenmedi. Serumenin lipid kompozisyonunu oluşturan öğelerden mum esterlerinin dış kulak yolu hastalıklarına karşı bir predispozisyon faktörü olarak değerlendirilebileceği, serumen lipid kompozisyonundaki değişim ortaya konarak çeşitli dış kulak yolu hastalıklarının tedaviye cevabının takibinde kullanılabileceği kanaatine varılmıştır. Ayrıca, serumen lipidlerinin sentezinde plazma lipid, lipoproteinlerinin bir kaynak olarak kullanılıp kullanılmadığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Özellikle, plazma lipid, lipoprotein konsantrasyonlarının değiştiği durumlarda, serumen lipid kompozisyonunun değişip değişmediği ve dış kulak yolu üzerinde ne tür bir etkisi olabileceğinin tespitine yönelik daha ileri çalışmalara ihtiyaç göstermektedir. Beslenme farklılıkları gibi bir başka değişken ile serumen lipid kompozisyonu etkileniyor mu, varsa bu kompozisyon farklılığı koruyuculuğu etkiliyor mu tespitine yönelik çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.



# **YAŞ, CİNSİYET VE MENSTRUEL SIKLUS EVRELERİNE GÖRE İNSAN SERUMEN LİPİD KOMPOZİSYONUNUN YÜKSEK PERFORMANS İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE ARAŞTIRILMASI**

## **ÖZET**

Serumen, dış kulak yolu epitel döküntüsü ve kıllar ile birlikte, serüminöz ve yağ bezlerinin sekresyonlarının kombine bir karışımıdır. Serumenin lipid içeriği, epidermis ve yağ bezleri tarafından oluşturulmaktadır. İnsan serumeninin lipid içeriği, esas olarak oluşturduğu koruyucu lipid tabaka ile dış kulak yolunun enfeksiyonlara karşı korunmasında rol oynamaktadır. Yağ bezlerinin kontrolünde, başlıca endokrin mekanizmalar rol oynar. Adrojenler, yağ bezlerinin en iyi uyaranları olarak bilinmektedir. Nonendokrin mekanizmalar da mevcut olabilir.

İnsanlarda, yaş ve cinsiyete göre hormon düzeylerinde değişiklikler bildirilmiştir. Önceki çalışmalarda, yaşa ve cinsiyete göre serumenin total lipid ve total protein içeriğinin değişmediği belirtilmiştir. Bu konuda detaylı bilgilere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışmada, yüksek performans ince tabaka kromatografisi (HPTLC) ile yaş, cinsiyet ve menstrual siklus evrelerinde insan serumeninin lipid kompozisyon değişiklikleri incelendi. Her iki cinsiyette de incelenen yaş grupları şöyledir: Grup 1: 1-10 yaş, grup 2: 11-18 yaş, grup 3: 19-40 yaş ve grup 4: 40 yaş üzeri. İlave olarak menstrual siklusun üç ayri evresinden de serumen örnekleri alındı. Toplam 242 serumen örneği analiz edildi. Serumen örnekleri, dış kulak yolundan steril bir pamuk çubuk

yardımıyla alındı. Lipidler, hekzan/dietileter/astik asit (80/20/7, v/v/v) içerisinde ekstrakte edilerek HPTLC plakalarına tatbik edildi. HPTLC plakaları, bir dansitometrede taranarak miktar analizleri gerçekleştirildi.

Her iki cinsiyetteki serumen örneklerinde, mum esterleri 1-10 yaş grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Triaçilgliserol+serbest yağ asitleri ve skualen düzeyleri, her iki cinsiyette de yaş ile birlikte artış gösterdi.

Erkeklerde, 19-40 yaş grubunda serumenin skualen içeriği, aynı yaş grubundaki kadınlara oranla anlamlı olarak yüksek iken, kolesterol içeriği düşük olarak belirlendi.

Menstruel siklus evrelerinde, başlıca farklılıkların proliferatif evre ile luteal ve menstruel evreler arasında olduğu tespit edildi. 19-40 yaş arasındaki kadınların serumen örneklerinde, proliferatif evrede diğer evrelere oranla Triaçilgliserol+serbest yağ asitleri düzeyleri daha düşük, kolesterol düzeyleri daha yüksek olarak belirlendi. Sonuç olarak, serumenin lipid kompozisyonunun yaş, cinsiyet ve menstruel evrelerde değişiklikler gösterdiği, başlıca farklılıkların 1-10 yaş grubu ile diğer yaş grupları arasında olduğu anlaşılmaktadır. Endokrin mekanizmaların serumenin lipid profilinin tayininde önemli rol oynayabileceği gözlenmektedir. Serumenin, enfeksiyona karşı koruyuculuk derecesi, lipid kompozisyonu ile bağlantılı olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Yüksek performans ince tabaka kromatografisi, serumen, yağ bezi, lipid.

## **INVESTIGATION OF AGE, SEX AND MENSTRUEL STAGE VARIATION IN CERUMEN LIPID COMPOSITION BY HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY**

### **SUMMARY**

Cerumen is a mixture of desquamated keratinocytes and hair combined with the secretions of both the ceruminous and the sebaceous glands of the external auditory canal. Lipid content of the cerumen is derived from two sources, the epidermis and the sebaceous glands. The role of human cerumen is believed to protect the external ear canal against infection in which its lipid content plays an essential role through forming a protective lipid film. The endocrine mechanisms play a major role in sebaceous gland control. Androgens are the best known stimulators of the sebaceous glands. Other nonendocrine mechanisms may also exist.

Age and sex variation in various hormonal levels of humans are well-documented. However, previous studies indicate no age and sex-related changes in total lipid and protein content of cerumen, thus detailed information is lacking. To this end, in the current work age, sex and menstrual phase variation in human cerumen lipid composition was investigated by sequential, one dimensional High-Performance Thin Layer Chromatography. The following age groups of both sexes were investigated: Group I: Range 1-10 years, Group II: Range 11-18 years, Group III: Range 19-40 years and Group IV: over 40 years. Additionally, cerumens from three stages of menstrual cycle were also taken. Total of 242 cerumen samples were analysed. Cerumen samples for determination of lipid composition were collected from external ear canal with a sterile cotton bud. The lipid was recovered by extraction into hexane/diethylether/acetic

acid (80/20/7, v/v/v) and analysed by sequential, one dimensional high performance thin layer chromatography. All high performance thin layer chromatography plates were scanned with a densitometer for the quantification of the lipids.

Peak values for wax esters occurred in cerumen samples from both sexes between the ages 1-10. Triacylglycerol+free fatty acids and squalen content increased with age in both sexes.

Males aged 19-40 had a significantly greater percentage of cerumen lipid squalen content than females from identical age group. However cholesterol content was found to be lower.

In terms of menstrual cycle stages, the main difference was observed between proliferative and luteal or menstrual stages. Cerumen samples from females aged 19-40 at proliferative stage of menstrual cycle had significantly lower triacylglycerol+free fatty acids content while percentage of cholesterol being higher than those at luteal or menstrual stages.

It was concluded that proportions of lipid constituents of cerumens varied with age in both sexes. Lipid composition of cerumen from the subjects aged 1-10 differed markedly from other age groups. Endocrine mechanisms appear to take an important part in the determination of the lipid profile of the cerumen. To what degree the cerumen can provide protection against infection might be related to its lipid configuration.

**Key words:** High Performance Thin Layer Chromatography, cerumen, sebaceous gland, lipid.

### KAYNAKLAR

1. HC Hanger, GP Mulley: Its Fascination and Clinical Importance: a Rewiev. Journal of the Royal Society of Medicine, vol85, 1992
2. Jeffery T. Bortz, Philip W. Wertz, Donald T. Downing: Composition of Cerumen Lipids. J. Am. Acad. Dermatol., vol. 23 (5):1, 1990
3. H. P. Huang, L. M. Fixter, C. J. Litte: Lipid Content of Cerumen From Normal Dogs and Otitic Canine Ears. Veterinary Record, 134: 380-381, 1994
4. Anthony J. Thody, Sam Shuster: Control of Function Sebaceous Glands. Physiological Society, 69; 383-416, 1989
5. SP Chung, O. H. Lowry, B. H. Senturia: Micro-chemical Studies on Normal Cerumen 1. The Lipid and Protein Content of Normal Cerumen. Laryngoscope, 65: 927-934, 1955
6. C. Cipriani, G. Taborelli, G. Gaddig, A. Melograna: Production Rate and Composition of Cerumen. Laryngoscope, vol. 100, 1990
7. N. Nicholaides: Skin Lipids: Their Biochemical Uniqueness. Science, 186; 19-26, 1974
8. Skin. [www.flashandbones.com/readingroom/pdf/719.pdf](http://www.flashandbones.com/readingroom/pdf/719.pdf)
9. The Intequemernt Lesson: Layers of skin. <http://loudoun.nv.cc.va.us/vetonline/vet11/Integument/integument-lesson.htm>
10. B. Young, John W. Heath: Functtional Histology, sayfa 162-172, 2000
11. Junquera L. C., Kelly R. D.: The Adipose Tissue in: Basic Histology, 1992
12. Melanin: Types, Synthesis and Hormonal Regulation Electronic Textbook of Dermatology, Anatomy of The Skin. [http:// telemedicine org/anatomy/anatomy htm](http://telemedicine.org/anatomy/anatomy.htm), 2004
13. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji A.B.D Laboratuvarı:Sıçan göğüs deri kesiti, hematoksilen eozin boyama X 40. Dr. Mehmet Gül'ün preparatlarından kendi isteği ile alınmıştır, 2005-07-17
14. Kan Niizuma: Lipid Droplets of The Sebaceous Gland: Some New Observations From Tannic Acid Fictation. Acta Dermatovener (Stockholm),59: 401-405, 1979

15. Sebum: Sebum Derm Net NZ. <http://dermnetnz.org/acne/sebum.html>, 2004
16. M. M. T. Downie, T. Kealy: Lipogenesis in The Human Sebaceous Gland: Glycogen and Glycerophosphate are Substrates for Synthesis of Sebum Lipids. *Journal of Investigative Dermatology*, 111: 199-205, 1998
17. Skin conditions: Moisture Deficient/Lipid Deficient Sensitive Skin. <Http://www.eucerin.co.uk/skin/conditio3.html>.
18. Lou Punto, Sarah Jindal: Skin Lipids, The Lipid Barrier and Barrier Repairing Ingredients. New York SCC/nyscc.org/news/archive/tech0102.htm, 2004
19. A. Weerheim, M. Ponc. Determination of Stratum Corneum Lipid Profile By Tape Stripping in Combination With High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Arch. Dermatol.*, 293: 191-199, 2001
20. J. A. Cotteril, W. J. Cunliffe, B. Williamson, L. Bulusu: Age and Sex Variation in Skin Surface Lipid Composition. *Br. J. Derm.*, 87, 33, 1972
21. Apostolos Pappas, Michael Anthonavage, Joel S. Gordon: Metabolic Fate and Selective Utilization of Major Fatty Acids in Human Sebaceous Gland. *The Society for Investigative Dermatology*, 118: 164-171, 2002
22. Lan Ge, Joel S. Gordon, Charleen Hsuan, Kurt Steen, Stephen M. Prouty: Identification of The  $\Delta$ -6 Desaturase of Human Sebaceous Glands: Expression and Enzyme Activity. *Journal of Investigative Dermatology*, 120 (5): 707, 2004
23. F. John Ebling: Hormonal Control and Methods of Measuring Sebaceous Gland Activity. *The Journal Investigative Dermatology*, 62: 161-171, 1974
24. C. Rosingoli, J. C. Nicolas, A. Jomard, S. Micheel: Involvement of The SREBP Pathway in The Mode of Action of Androgens in Sebaceous Glands In Vivo. *Experimental Dermatology*, 12 (4), 480, 2003
25. Sam Shuster, Anthony J. Thody: The Control and Measurement of Sebum Secretion. *The Journal of Investigative Dermatology*, 62: 172-190, 1974
26. Vincent A. Ziboh, S. L. Hsia: Lipogenesis in Rat Skin: A Possible Regulatory Role of Glycerol 3-Phosphate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 131: 153-162, 1969
27. John S. Straus, Peter E. Pochi, Donald T. Downing: The Sebaceous Glands: Twenty-Five Years of Progress. *The Journal of Investigative Dermatology*, 67: 90-97, 1976
28. Christos C. Zouboulis, Bernhard P. Korge, Dietmar Mischke, Constantin E. Orfanos: Altered Proliferation, Synthetic Activity, and Differentiation of Cultured Human Sebocytes in The Absence of Vitamin A and Their Modulation By Synthetic Retinoids. *The Society for Investigative Dermatology*, 101: 628-633, 1993
29. John Ridden, D. Ferguson, Terence Kealey: Organ Maintenance of Human Sebaceous Glands: In vitro Effects of 13-cis Retinoic Acid and Testosterone. *Journal of Cell Science*, 95: 125-136, 1990
30. Christos C. Zouboulis, Bernhard P. Korge, Hirohiko Akamatsu, Longqing xia, Sigrid Schiller: Effects of 13-cis Retinoic Acid, All-Trans-Retinoic Acid, and Acitretin on The Proliferation, Lipid Synthesis and Keratin Expression of Cultured Human Sebocytes In Vitro. *The Society Investigative Dermatology*, 96: 792-797, 1991
31. Thomas I. Doran, Stanley S. Shapiro: Retinoid Effects on Sebocyte Proliferation. *Methods in Enzymology*, vol. 190, 1990

32. John L. Millns, Howard I. Maibach.: Mechanisms of Sebum Production and Delivery in Man. Arch. Dermatol. Res., 272: 351-362, 1982
33. Donald T. Downing, John S. Strauss, Peter E. Pochi: Changes in Skin Surface Lipid Composition Induced By Severe Caloric Restriction in Man. The American Journal of Clinical Nutrition, 25: 365-367, 1972
34. Peter E. Pochi, Donald T. Downing, John S. Strauss: Sebaceous Gland Response in Man to Prolonged Total Caloric Deprivation. The Journal of Investigative Dermatology, 55: 303-309, 1970
35. Peter E. Pochi, John S. Strauss, Donald T. Downing: Age- Related Changes in Sebaceous Gland Activity. The Journal of Investigative Dermatology, 73: 108-111, 1979
36. William James Cunliffe, John Nigel Kearney, Nicholas Barry Siimpson: A Modified Photometric Technique for Measuring Sebum Excretion Rate. The Journal of Investigative Dermatology, 75: 395-398, 1980
37. A. Campos, A. Arias, L. Betancor, C Rodriguez: Study of Common Aerobic Flora of Humman Cerumen. The Journal of Laryngology of Otology, vol. 112 (7): 613-617, 1998
38. Isabella Okuda, Brian Bingham, Philip Stoney, Michael Hawke: Organic Composition of Cerumen. The Journal of Otolryngology, 20: 3, 1991
39. Michael Hawke, M.D.: Update on Cerumen and Ceruminolytics. Ear Nose Q Throat Journal, 81(8): 23-27, 2002
40. John Jacop Ballenger, James B. Snow, Jr.: Otolaringoloji: Baş ve Boyun Cerrahisi. sayfa 840-841 2000
41. H. Ferner, J. Staubesand: Sobotta İnsan Anatomi Atlası Cilt 1: sayfa 245, 1985
42. Bailey Otolaryngology, Head and Neck Surgery: Second edition. sayfa 1543-1544, 2000
43. Main T., Lim D.: The Human External Auditory Canal, Secretaoy System an Ultrastructural Study. Laryngoscope, 86(8): 1164-76, 1976
44. Meral Tekelioğlu: Özel Histoloji, sayfa 294-296, 2002 Ankara
45. Prof. Dr. Deniz Erdoğan, Prof. Dr. M. Tahir Hatiboğlu: Genel Histoloji, 1999
46. Francesca Tesca-Riva, Paolo Puxeddu: Secretory Mechanisms of Humman Ceruminous Glands:A Transmission and Electron Microscopic Study. The Anatomical Record, 196: 363-372, 1980
47. Shugyo Y., Sudo N., Yamosita T., Kumazawe T., Kanamura S.: Morphological Differences Between Secretory Cells of Wet and Dry Types of Human Ceruminous Glands. Am. J. Anat., 181(4): 377-384, 1988
48. Bende M.: Human Ceruminous Gland Innevation. Journal Laryngology Otology., 95(1): 11-15, 1981
49. Kiroaki Tomita, Koki Yamada, Mohsen Ghadami, Tokako Ogura: Mapping of The Wet/Dry Earwax Locus to The Pericentromeric Region of Chromosome 16. Lancet.. London, 359: 200-2003, 2002
50. Yasin A., Mostafa MA, Moawad MK: Cerumen annd Micro-Chhemical Analysis. J. Llaryngol. Otol., 80: 933-938, 1966
51. Craig N. Burkhart, Craig G. Burkhart, Sherry Williams, P.C. Andrews, Vijay Adappa, James Abogast: In Pursuit of Ceruminolytic Agents: A Study of Earwax Composition. The American Journal of Otology, 21: 157-160, 2000

52. Masumi Inaba, Tai Ho Chung, Jung Chu Kim, Jang He Kim: Lipid Composition of Earwax In Hircismus. *Yonsei Medical Journal*, 28(1): 49-51, 1987
53. D. J. Harwey: Identification of Long-Chain Fatty Acids and Alcohols From Human Cerumen By The use of Picolinyl and Nictinate Esters. *Biomedical and Enviromental Mass Spectrometry*, 18: 719-723, 1989
54. Craig N. Burkhart, Michael A. Kruge, Craig G. Burkhart, Curtis Black: Cerumen Composition By Flash Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Otology and Neurootology*, 22: 715—722, 2001
55. Jeffery T. Bortz, Philip W. Wertz, Donald T. Downing: The Origin of Alkanes Found In Human Skin Surface Lipids. *The Society For Investigative Dermatology*, 93: 723-727, 1989
56. Ahmet Kızılay, Orhan Özturan, Levent Saydam: Epithelial Migration The Normal and Operated Tympanic Membranes. *T. Klin. J.E.N.T.*, 1: 11-16, 2001
57. Cerumen: [http// www. Fact-index.com/c/ce cerumen html.](http://www.Fact-index.com/c/ce_cerumen.html), 2004
58. Y. Selin Pata, Candan Öztürk, Yücel Akbaş, Kemal Görür, Murat Ünal, Cengiz Özcan: Has Cerumen A Protective Role In Recurrent External Otitis ?. *Am. J. of Otolaryngology*, 24: 209-212, 2003
59. J. E. Osborne, J. D. Batty: Do Patients With Otitis Externa Produce Biochemically Different Cerumen?. *Clin. Otolaryngology*, 15: 59-61, 1990
60. Peter V. Driscoll, Anand Ramachandru, Dean E. Drezner: A Key To Understanding Malignant External Otitis. *Am. Acad. of Otolayngol – Head and Neck Surgery*, 109: 676-679, 1993
61. Tuu-Jyi Chai, Toby C. Chai: Bactericidal Activity of Cerumen. *Antimicrbial Agents and Chemotherapy*, 18(4): 638-641, 1980
62. F. Jagoux, F. Legent, C. Beauvillain de Montreuil: Chronic Cough and Ear Wax. *The Lancet London*, 360: 618-619, 2002
63. Pr. Dr.Turgay Atagü, Pr. Dr Sezai Şahmay: *Jinekoloji 2. Baskı. Sayfa: 153-168, 2001*
64. Jonathan S. Berek, Eli Y. Adashi, Paula A. Hilard: *Novak Jinekolji 12. Baskı. Sayfa: 161-169, 1998*
65. Prof. Dr. Mülazım Yıldırım: *Klinik Jinekoloji 2. Baskı. Sayfa: 13-14, 1992*
66. Robert E. Kellum, Shoji Toshitani, Kathse Strangfeld: Human Sebaceous Gland Lipids: In Vitro Incubations With C- Labelled Compounds. *The Journal of Investigative Dermatology*, 60: 53-57, 1973
67. Layton A. M., Hughes B. R., Hull S. M., Eady E. A., Cunliffe W. J.: Seborrhoea-an Indicator for Peak Clinical Response In Acne Patients Treated With Antibiotics. *Clinical and Experimental Dermatology*, 17: 173-175, 1992
68. Nordstrom K. M., Schmus H. G., Mc Ginley K. J., Leyden J. J.: Measurement of Sebum Output Using A Lipid Absorbent Tape. *J. Invest. Dermatol.*, 87: 260-263
69. Willie J J., Kydonieus A.: Palmitoleic Acid Isomer (C16: 1Δ6) In Human Skin Sebum Is Effective Againts Gram-Positive Bacteria. *Skin Pharmacol. Appl. Skin physiol.*, 16(3): 176-187, 2003
70. Strauss J S, Pochi P E, Downing D T: The Sebaceous Glands: Twenty-Five Years of Progress. *The Journalof Investigative Dermatology*, 67: 90-97, 1976
71. Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, Sato Y: Effect of Aging on Sebaceous Gland Activity and on the Fatty Acid Composition of Wax Esters. *J. Invest. Dermatol*, 89: 507-512, 1987



72. Stewart M E, Steele W A, Downing D T: Changes in the Relative Amounts of Endogenous and Exogenous Fatty Acids in Sebaceous Lipids During Early Adolescence. *J. Invest. Dermatol.*, 92: 371-378, 1989
73. Downing D T, Straus J S: On the Mechanism of Sebaceous Secretion. *Arch. Dermatol. Res.* 272: 343-349, 1982
74. Haubrich, Kathlee A: Role of Vernix Caseosa in the Neonate: Potential Application in the Adult Population. *AACN Clinical Issues.* 14 (4): 457-464, 2003
75. Maria Imelda, Bautista M D, Randall Wickett, Marthy O. Visscher, William L. Pickens, Steven B. Hoath: Characterization of Vernix Caseosa as a Natural Biofilm: Comparison to Standard Oil- Based Ointments. *Pediatric Dermatology.* 17 (4): 253-257, 2000
76. Hiroyuki Yoshio, Maria Tollin, Gudmundur H., Gudmundson, Hugo Lagercrantz, Hans Jörnvall, Giovanna Marchini, Birgitta Agerberth: Antimicrobial Polypeptides of Human Vernix Caseosa and Amniotic Fluid: Implications for Newborn Innate Defense. *International Pediatric Research Foundation,* 53: 211-216, 2002
77. James J. Leyden, Gary L. Grove: Vernix Caseosa: A Natural Biofilm in Very Low Birthweight Infants. *Pediatric Dermatology,* 18(4): 361-362, 2001
78. Baker SM, Balo NN, Abdel Aziz FS: Is Vernix Caseosa a Protective Material to Newborn? A Biochemical Approach. *Indian J. Pediatr.,* 62 (2): 237-239, 1995
79. William L. Pickens, Ronald R. Warner, Ying L. Boissy, Raymond E. Boissy, Steven B. Hoath: Characterization of Vernix Caseosa: Water Content, Morphology and Elemental Analysis. *Journal of Investigative Dermatology,* 115 (5): 875-882, 2000
80. Wysocki SJ, Grauaug A, O'Neill G, Hahnel R: Lipids in Forehead Vernix From Newborn Infants. *Biol. Neonate,* 39 (5-6): 300-304, 1981
81. M. K Irmak, E. Oztaş, H. Vural: Dependence of Fetal Hairs and Sebaceous Glands on Fetal Adrenal Cortex and Possible Control from Adrenal Medulla. *Medical Hypotheses,* 62 (4): 486-492, 2004
82. M. I. Gurr, A. T. James: *Lipid Biochemistry: An Introduction,* 3. Baskı, sayfa 124-125, 1980