

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

BAŞKAN: Prof. Dr. Niyazi AŞKAR

**PRENATAL DÖNEMDE MAGNETİK ALANA MARUZ
KALAN FARELERİN BEYİN DOKUSU KÜLTÜRLERİNDE
NÖRONAL MİGRASYON ANOMALİSİNE YOL AÇTIĞI
BİLDİRİLEN GENLERİN EKSPRESYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Alkım Gülşah ŞAHİNGÖZ YILDIRIM

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sermet SAĞOL

İZMİR-2014

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca iyi yetişmem için bana her konuda destek veren, bilgi ve deneyimlerini aktaran ana bilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Niyazi AŞKAR'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim ve tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, bilimsel yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sermet SAĞOL'a teşekkür ederim.

Bu tezin gerek fikir gerekse sürdürülme aşamasında çok büyük pay sahibi olan, her konuda içtenlik ve samimiyetle yardımlarını esirgemeyen hocalarım, Sayın Prof. Dr. Özgür ÇOĞULU'ya, Yrd. Doç. Dr. Emin KARACA'ya ve Uzm. Dr. Burak DURMAZ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Tezin deneysel aşamasında her türlü konuda desteklerini gördüğüm Fizyoloji ana Bilim Dalı'ndan sayın Prof.Dr. Lütfiye KANIT'a, Sayın Prof.Dr. Ersin Oğuz KOYLU'ya, sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuz GÖZEN'e, sinir bilim yüksek lisans öğrencileri Müzeyyen UĞUR ve Hasibe ŞAHİN'e, Biyoteknoloji yüksek lisans öğrencisi Gamze BEYOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Deney düzeneğinin kurulmasında yardımlarını esirgemeyen Ege Üniversitesi Fizik Bölümü'nden Sayın Prof.Dr. Teoman YILDIZ'a ve tezin istatistiksel bölümünde emekleri olan Medikal Biyoloji Bölümü'nden sayın Prof.Dr. Cumhuriyet GÜNDÜZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve yardımlarıyla bu alanda yetişmemde katkısı olan tüm değerli hocalarım, başta Sayın Prof. Dr. M.Kemal ÖZTEKİN, Prof. Dr. Ege Nazan TAVMERGEN GÖKER, Prof. Dr. Teksin ÇIRPAN, Prof. Dr. Fuat AKERCAN, Prof. Dr. Fatih ŞENDAĞ, Doç. Dr. Murat ULUKUŞ, Doç. Dr. M. Coşan TEREK, Yrd. Doç. Dr. Ahmet Mete ERGENOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Ahmet Özgür YENİEL olmak üzere ,Op. Dr. Ali AKDEMİR'e ve Op. Dr. Levent Akman'a ayrıca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve servis, doğumhane, poliklinik, ameliyathane hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Beni yetiştiren ve bugünlere ulaşmamı sağlayan aileme, her zaman yanımda olan ve beni her zaman destekleyen sevgili eşim Dr. Nuri YILDIRIM'a, kardeşim Irmak Anıl Şahingöz'e, oğlum Poyraz Emre YILDIRIM'a ve eşimin ailesine sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Alkım Gülşah ŞAHİNGÖZ YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

I. BÖLÜM

1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
-----------------------	---

II. BÖLÜM

2 GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Nöronal Migrasyon	2
2.1.1 Nöronal migrasyon, serebral korteksin tabakalı yapısının oluşumunun sağlanması	2
2.1.2 Santral nöronların, son yerleşme planlarına ulaşabilmek için glial hücreler ve aksonlar üzerinden migrasyon yapmaları.....	4
2.1.3 Glial hücrelerin radial migrasyonda iskelet olarak görev almaları.	4
2.1.4 Akson yolaklarının teğet migrasyon için iskelet oluşturmaları.....	5
2.2 Nöronal migrasyonda rol alan genler	8
2.3 Kortikal gelişimsel anomalilerinin klasifikasyonu.....	13
2.3.1 Şizensefali	15
2.3.2 Fokal Kortikal Displazi	15
2.3.3 Lizensefali	16
2.3.3.1 Tip I Lizensefali	16
2.3.3.2 Kaldırım Taşı Lizensefali (Tip 2).....	16
2.3.4 Heterotopi.....	17
2.3.5 Subependimal Heterotopi (Bilateral periventriküler nodüler hipertrofi). 18	
2.3.6 Fokal Subkortikal Heterotopi	18
2.3.7 Bant Heterotopi (Double Cortex).....	19
2.3.8 Polimikrogiri	20
2.3.9 Aicardi Sendromu	20
2.4 Manyetik Alan.....	20

III. BÖLÜM

3 YÖNTEM ve GEREÇ	27
3.1 Deney Tasarımı, Fare Beyin Dokusu Elde Edilmesi.....	27
3.2 Fare Beyin Dokusundan cDNA Sentezi.....	28
3.2.1 Total RNA izolasyonu.....	29
3.2.2 Total RNA Miktarının Ölçümü ve Kalite Kontrolü	29
3.2.3 Tek sarmak cDNA sentezi.....	30
3.3 Real-time PCR (Gerçek Zamanlı PZR).....	31
3.4 İstatistiksel Analiz	32

IV. BÖLÜM

4 BULGULAR	33
------------------	----

V. BÖLÜM

5 TARTIŞMA	36
------------------	----

VI. BÖLÜM

6 SONUÇ	40
---------------	----

VII. BÖLÜM

7 ÖZET	41
--------------	----

VIII. BÖLÜM

8 KAYNAKLAR.....	42
------------------	----

ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ

- Şekil 1.** Nöronların radial glial hücreler boyunca migrasyonu
- Şekil 2.** Serebral korteksteki nöronların migrasyonu
- Şekil 3.** Mikrotubuler hücre iskeletinin nöronal migrasyondaki yeri
- Şekil 4.** Teğet migrasyon
- Şekil 5.** Nöronal migrasyonda LIS1 ve RELN sinyal yolları
- Şekil 6.** X'e bağlı geçen lizensefalili erkek hastaya ait beyin MRI
- Şekil 7.** LIS1 gen mutasyonlu klasik lizensefali hastası
- Şekil 8.** Klasik bilateral periventriküler nodüler heterotopi
- Şekil 9.** DCX gen mutasyonunun etkilediği hastalarda beyin MRG
- Şekil 10.** Deney sisteminin şematik sunumu

Tablo 1. Nöronal migrasyon anomalilerinin genetiği

Tablo 2. Elektromanyetik spektrum

Tablo 3. IARC (International agency for research on cancer)'ye göre ajanların sınıflandırılması

Tablo 4. Çalışma ve kontrol gruplarında RNA derişimleri ve saflık oranları

Tablo 5. Gen ekspresyonlarında artış, Log₂ transformasyon ve p değerleri

I. BÖLÜM

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Teknoloji alanında ortaya çıkan yenilikler, insan yaşamını son derece kolaylaştırmakla birlikte; bu yeniliklerin sebep olduğu bazı etkiler insanın biyolojik yapısını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Özellikle elektrikli alet kullanımının insan yaşamının vazgeçilmez bir parçası haline gelmesi, bu aletlerin yaydığı manyetik alanın etkilerinin de araştırılması gereğini ortaya koymuştur. Başta cep telefonları olmak üzere kablosuz araçlar, yediden yetmiş herkesin kullanım alanına girmiştir. Bu nedenle bu cihazların biyolojik etkileri ile ilgili çok geniş bir alanda çalışmalar yapılmıştır. Radyofrekans dalgalarının malignite üzerine olan etkileri, hücre proliferasyonu üzerine olan etkileri, melatonin ve benzeri hormon salınımı üzerine olan etkileri, DNA zincir kırıklarıyla olan ilişkisi, apoptoz üzerine etkisi, erkek fertilesi üzerine olan etkileri ve davranış üzerine olan etkileri ile ilgili daha önce de bahsedilen çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu cihazların baş-boyun bölgesine yakın kullanılması nedeniyle, yaydığı radyofrekans dalgalarının sinir sistemi üzerine olan etkilerini ortaya koymayı amaçlayan çalışmalar da bunlar arasındadır. Ancak bu çalışma, radyofrekans dalgalarının nöronal migrasyon anomalilerine yol açan genler üzerine olan etkilerini ortaya koyan literatürdeki ilk çalışmadır.

Santral sinir sisteminin gelişimi oldukça kompleks bir süreçtir ve bu organizasyon içinde nöronal migrasyon da önemli bir yer tutar. Nöronal migrasyon, sinir hücrelerinin köken aldığı bölgeden son yerleşim bölgeleri olan ventriküler ve subventriküler zonlara göç etmesi olarak tanımlanır. Bu süreçte zamanlama ve yönelim çok iyi programlanmıştır. Kalıtsal genetik hatalar ya da dış faktörler, bu programı bozarak nöronal migrasyon problemlerine yol açabilir. Bu çalışmada günlük hayatta cep telefonu ya da diğer elektromanyetik alan oluşturan cihazlar nedeniyle maruz kalınan dozlarda radyofrekans maruziyetinin, daha önce literatürde nöronal migrasyon ile ilişkisi gösterilmiş genler üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

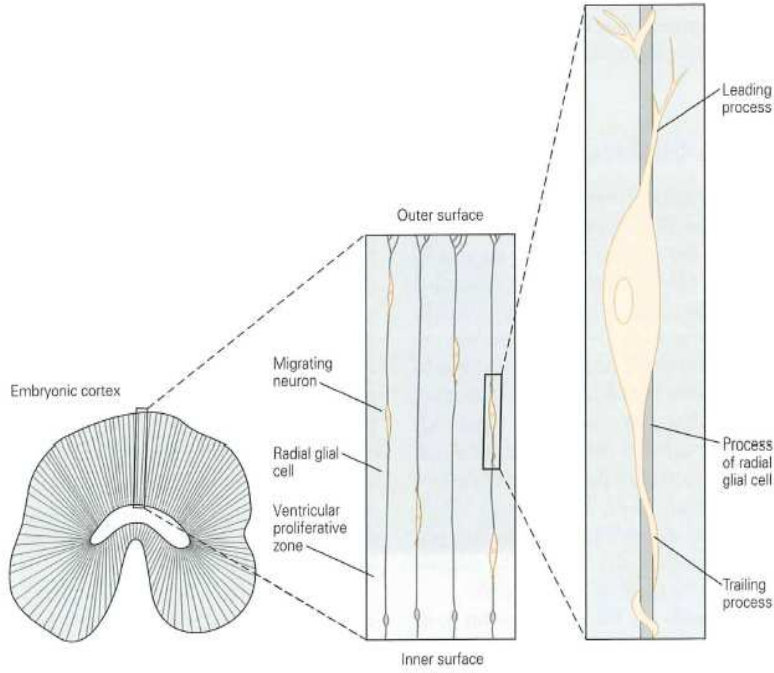
II. BÖLÜM

2. GENEL BİLGİLER

2.1 NÖRONAL MİGRASYON

2.1.1 Nöronal migrasyonun, serebral korteksin tabakalı yapısının oluşumunu sağlaması.

Memeli serebral korteksi üç ana safhada oluşur: Preplate, kortikal plate ve son olarak bu tabakaların matur hali. Preplate'in ventrikuler zonundaki prekursor hücreler, kortikal plate'te yerleşmeden önce radial glial liflere doğru migrasyon yapan nöronlara diferansiye olurlar. Bu migrasyon yapan hücreler, preplate'i subplate ve marjinal zon olmak üzere ikiye bölerler (Fig. 1)



Şekil 1. Nöronların radial glial hücreler boyunca migrasyonu. Radial glial hücrelerden oluşuktan sonra, embryonik serebral kortekste yeni oluşan hücreler, radial glial hücrelerin gövdelerini sararlar. Böylece ventrikuler zondan korteksin pial yüzüne migrasyonları esnasında, radial glial hücreleri iskelet olarak kullanırlar.

Kortikal plate içinde nöronlar, iyi tanımlanmış tabakalara organize olurlar. Nöronun laminar düzeni, *doğum günü* denen terimle koreledir. Bu terim, nöronun son hücre bölünmesini gerçekleştirdiği ve postmitotik bir nöron oluşturduğu zamanı ifade eder. Ventriküler zondan göç eden ve hücre döngüsünü erken safhada terk eden hücreler, korteksin en derin tabakasına yerleşirler. Hücre döngüsünden daha geç çıkan hücreler daha uzun yol katederek daha yüzeysel tabakalara yerleşmek için erken doğan nöronlardan daha fazla mesafe kateder. Netice olarak serebral kortekste tabakalaşma, erken-iç, geç-dış şeklinde olur (Fig. 2A)

Kortikal nöronların migrasyon ya da yerleşme programlanması ile ilgili ortaya çıkan sorunlar, insanda kortikal patolojilerin oluşmasına sebep olurlar (Fig. 2C). Lissensefalide (Yunancada düz beyin; kortikal yüzeyin düzleşmesi) nöronlar ventriküler zondan ayrılırlar fakat kortikal plate'e migrasyonlarını tamamlayamazlar. Sonuç olarak matür korteks, altı değil dört nöronal katmandan oluşur ve kalan katmanlardaki nöronların yerleşim düzenleri bozulmuş olur. Daha nadir olarak, lissensefaliye subkortikal beyaz cevherde ek bir nöron grubu eşlik edebilir. *LIS1* ve *doublecortin* genlerinde mutasyonu olan lissensefalili hastalarda, ağır mental retardasyon ve dirençli epilepsi görülebilir. *LIS1* ve *doublecortin* proteinleri mikrotubuller üzerinde yer alır, bu da bu proteinlerin mikrotubul bağımlı nukleer hareket üzerinde etkili olduklarını işaret eder. Ancak nöronal migrasyon üzerine net etkileri halen aydınlatılamamıştır.

Reelin sinyal yolağı üzerine olan mutasyonlar, kortikal subplate'teki nöronal migrasyonun son safhasını bozar. Reelin, preplate ve marjinal zondaki bir grup nöron olan Cajal-Retzius hücrelerinden salgılanan bir ekstraselüler matriks proteindir. Bu hücrelerden çıkan sinyaller, kortikal nöronların migrasyonu için gereklidir. Reelin fonksiyonundan yoksun sıçanlarda, nöronlar radial glial katlantılarından ayrılmakta güçlük çekerler ve iç-dış migrasyon kuralına uymadan kortikal plate'in alt kısmında birikirler. Sonuç olarak hücre tiplerinin normal tabakalanması bozulur ve marjinal zon kaybolur. Reelin, ApoE reseptör 2 ve very-low density lipoprotein (VLDL) gibi hücre yüzeyi reseptörleri üzerinden etki eder. Reelinin bu reseptörlere bağlanması, intraselüler bir protein olan ve reelin signal iletimi yapan *Dab1*'i aktive eder. Cadherin benzeri adezyon proteinleri de reelin sinyal iletiminde rol oynar. Netice olarak da bu ileti yollarında görev alan proteinlerin yokluğunda benzer fenotipler ortaya çıkmaktadır.

2.1.2 Santral nöronların, son yerleşme planlarına ulaşabilmek için glial hücreler ve aksonlar üzerinden migrasyon yapmaları.

Nöronların migrasyonu, radial, teğet ve serbest migrasyon denen üç ana program üzerinden olur. Radial migrasyonda, santral nöronlar radial glial hücrelerin uzun ve dallanmamış prosesleri üzerinden hareket ederler. Teğet migrasyonda, santral nöronlar aksonal traktları kılavuz olarak kullanır. Serbest migrasyon ise perferal sinir sisteminde radial glia ya da aksonal traktus olmadan gerçekleşir.

2.1.3 Glial hücrelerin radial migrasyonda iskelet olarak görev almaları.

1970'lerde yapılan primat beynin kortikal gelişimi ile ilgili klasik anatomi çalışmalarında ventriküler zonda oluşan nöronların son pozisyonlarını alabilmeleri için radial glial hücreler boyunca migrasyon yaptıkları gösterilmiştir. Radial glial hücreler, radial nöronal migrasyon için primer iskelet olarak işlev görür. Hücre gövdeleri ventriküler yüze yakın yerleşmişlerdir ve gelişen serebral duvar boyunca dönen uzun lifleri meydana getirirler. Her radial glial hücrenin, apikal yüzeyde ventriküler zonda bir bazal ucu bulunurken, beynin pial yüzeyinde çok sayıda uçla sonlanırlar (Fig. 1). Radial glial katlantılar primat korteksin oluşumunda oldukça önemlidir, nöronlar bu sayede serebral duvar genişledikçe uzun mesafelerde migrasyon yapabilir.

Radial glial hücrelerin çoğu geçici yapılardır ve nöronlara ve astrositlere farklılaşırlar. Tek radial glial hücre iskeleti, 30 kortikal nöron oluşumundaki migrasyonu destekleyebilir.

Hangi güç ya da moleküller, radial glial hücreler üzerinde nöronal migrasyonu sağlar? Nöron, hücre döngüsünü terk ettikten sonra ilk olarak radial glial hücreler üzerinde döner ve nukleusu bu işlem için translokasyona uğrar. Migrasyon yapan nöronun bu öncül işlemi her ne kadar yavaş ve kararlı ilerlese de nukleus, hücre iskeletinin kompleks yapısı itibarıyla bu işleme aralıklı ve basamaklı bir yolla katılır. Mikrotubuler ağ, nukleus etrafında bir kafes oluşturur, nukleusun hareketi basal cisim denilen sentrozom benzeri bir yapı sayesinde olur ve bu yapı nukleus hareketi için bir mikrotubul ve kanal sistemi oluşturur (Fig. 3A). Lis1 ve doublecortin eksikliklerinden kaynaklanan durumlarda ortaya çıkan nöronal migrasyon anomalileri, bu genlerin mikrotubul oluşum ve fonksiyonunda ne kadar etkili olduklarını göstermektedir (Fig. 2).

Radial glial hücreler üzerinde olan nöronal migrasyon esnasında hücreler arasında adeziv ilişkiler de vardır. İntegrin gibi adezyon reseptörleri, radial glial hücreler üzerinde nöronların dağılımında etkilidir.

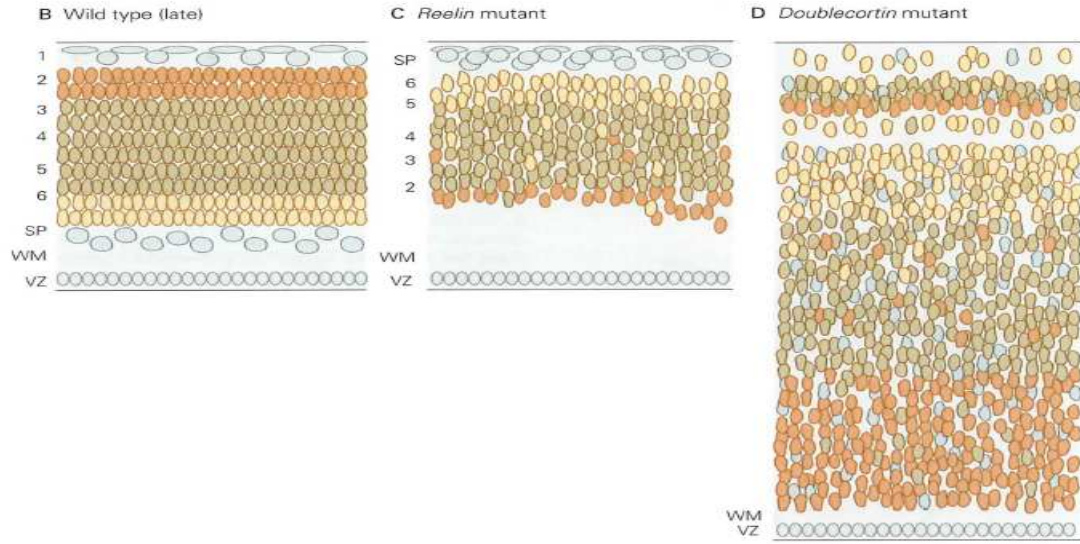
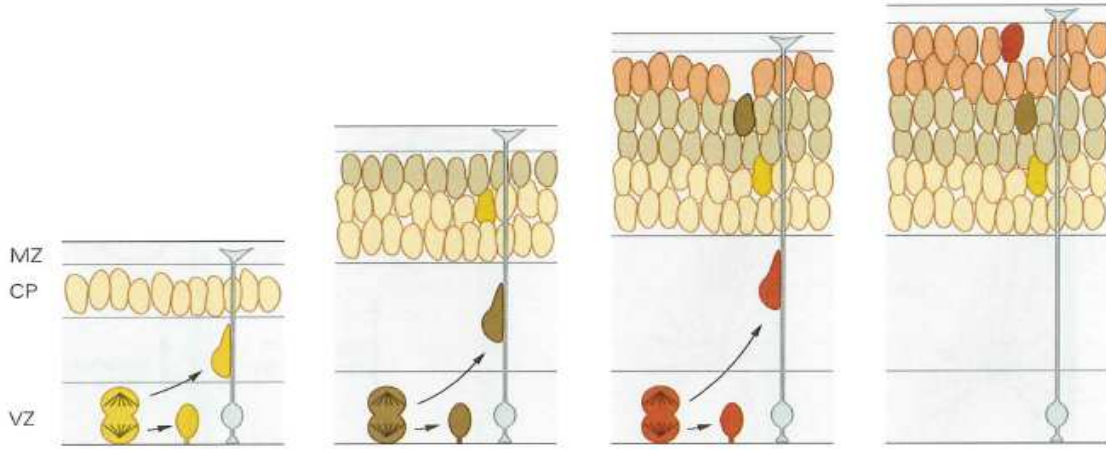
2.1.4 Akson yolaklarının teğet migrasyon için iskelet oluşturmaları.

Gelişmekte olan beyinde nöronal translokasyon için ikinci önemli mekanizma teğet migrasyondur. Bu migrasyon şekli, sinir siteminde farklı bölgeler oluşturmak ve özellikle nöronal dolaşımın kompleks yapısını artırmak için kullanılmaktadır. Bu migrasyon şeklinin temeli, önceden var olan ve nöronların son yerleşme yerlerini belirleyen aksonal yolaklardır. Gelişen kortekste, kortikal projeksiyon nöronlarının aksonları internal kapsüle ulaşırken; migrasyon yapan nöronlar da neokortekse girmeye başlarlar. Bu kesişme noktasında, göç eden nöronlar, korteksten ayrılan akson dallarına sıkıca bağlıdır.

Teğet migrasyonu takip eden nöronlar, kusursuz bir yol izlerler. Bu durum, en iyi nöronal üretimin iki ana bölgesi olan medial ve lateral ganglionik eminensleri barındıran ventral telensefalonda izlenebilir. Bu bölgede oluşan bazı nöronlar, bazal ganglion oluşumunda da rol alırlar. Bu ventral yapılardan ortaya çıkan teğet migrasyon yapan nöronlar, serebral korteks, hipokampus ve olfaktör bulbusun yapısına da katılırlar.

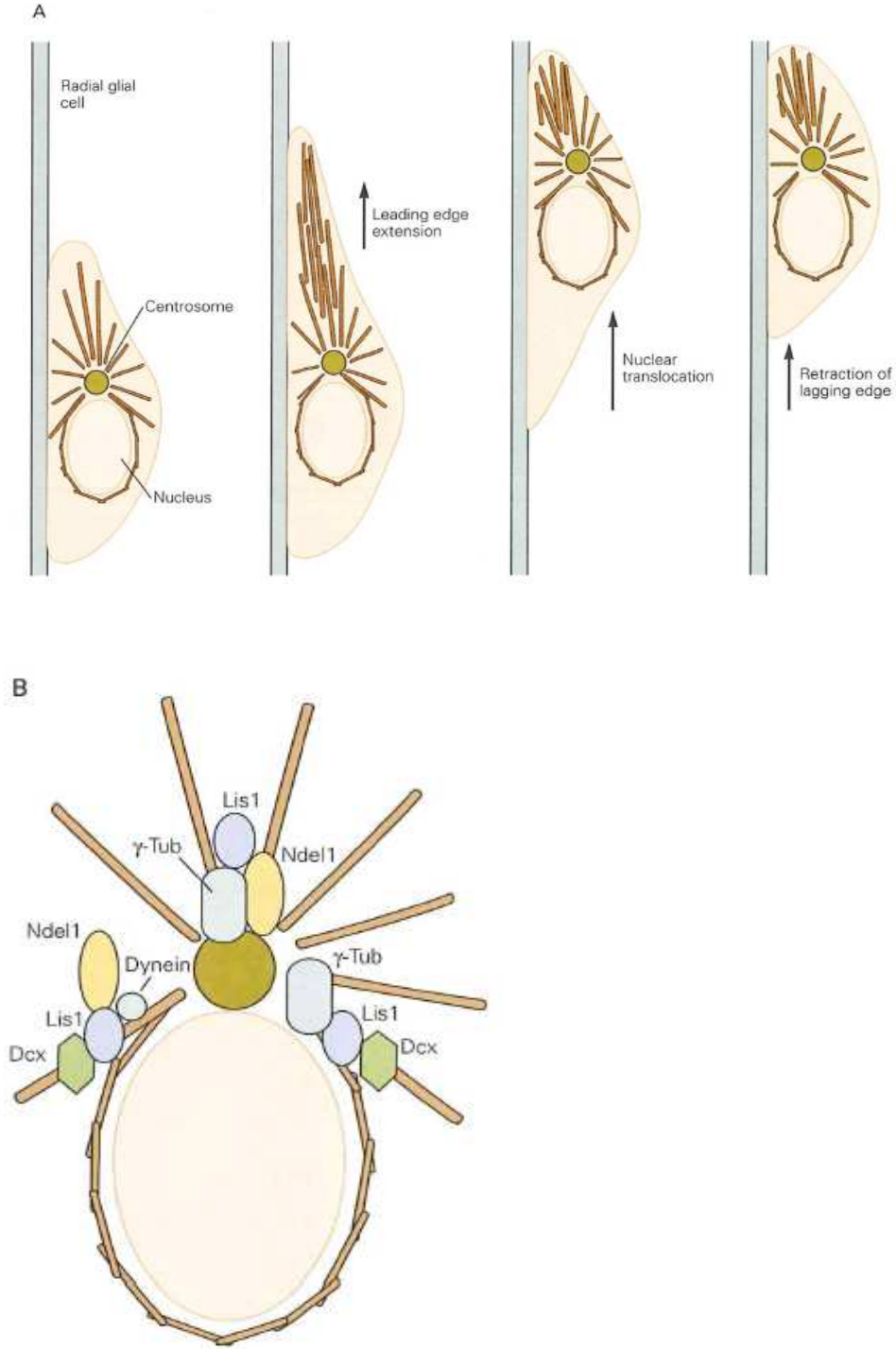
Medial ganglionik eminensden oluşan nöronlar teğet migrasyon yaparlar ve Cajal-Retzius nöronları da dâhil olmak üzere birçok ara nöronu oluşturmak üzere neokortekse yerleşirler. Bu kortikal nöronlar iki kaynaktan köken alırlar: Eksitator nöronlar kortikal ventriküler zondan, ara nöronlar medial ganglionik eminensden. Aksine lateral ganglionik eminensden köken alan nöronlar, rostrale doğru göç eder ve olfaktör bulbusun periglomerular ve granül ara nöronlarına katılırlar (Fig.4). Bu rostral migrasyon sisteminde nöronlar göç edebilmek için birbirlerini kullanırlar (zincir migrasyon). Erişkin beyinde ise rostral migrasyon yapan nöronlar, striatumun subventriküler zonundan köken alırlar. Ganglionik eminens nöronlarının karakteri ve teğet migrasyonunu transkripsiyonel faktörler belirler. Homeodomain proteinleri olan Dlx1 ve Dlx2, ganglionik eminensdeki hücreler tarafından eksprese edilir. Dlx1 ve Dlx2 aktivitelerinden yoksun sıçanlarda, nöronal migrasyondaki karışıklık kortekste GABAerjik ara nöronların sayısında belirgin azalmaya sebep olur. Benzer şekilde, transkripsiyonel faktörlerden Gsh2'yi kodlayan gende meydana gelen bir defekt neticesinde rostral migratuar akım bozulur ve ara nöronların olfaktör bulbusa ulaşımı gecikir.

A Cortical cells follow "inside-first outside-last" pattern of migration



Şekil 2. *Serebral korteksteki nöronların migrasyonu; korteksin tabakalı yapısının oluşumunu sağlar.*

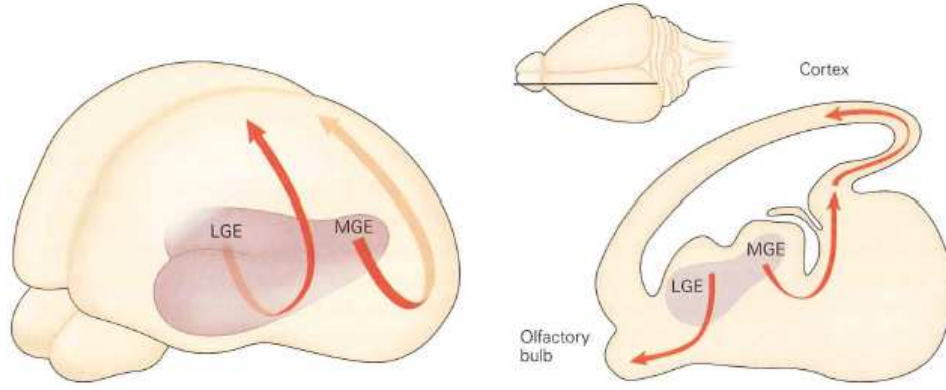
- A.** Normal kortikal gelişim esnasında nöronlar, kortikal plate'e girerken radial glial hücreleri iskelet olarak kullanırlar. Pial yüzeye yaklaştıkça nöronlar, migrasyonu durdurur ve radial glial hücrelerden ayrılırlar. (CP: kortikal plate, MZ: marjinal zon, VZ: ventrikuler zon)
- B.** Nöronal migrasyonun sıralı iç-dış paterni, matur serebral kortekste beyaz cevher (WM) ve subplate (SP) arasında altı nöronal tabaka oluşmasını sağlar.
- C.** Fonksiyonel reelin proteininden yoksun mutant sıçanlarda, kortikal plate'teki nöronların tabakalanması bozulur ve ters döner. Ayrıca, tüm kortikal plate, subplate'in altında gelişir.
- D.** Doublecortin (dcx) mutant sıçanlarda, nöronlar karakteristik tabakalı yapılarını kaybeder, bazı tabakalar daha az nöron içerir. Lissensefaliye sebep olabilen Lis1 mutasyonunda da benzer patolojiler izlenebilir.



Şekil 3. Mikrotübüler hücre iskeletinin nöronal migrasyondaki yeri

A. Mikrotübüler hücre iskeletinin nöronal migrasyonda önemli yeri vardır. Mikrotübüller, nükleusu bir kafes gibi sararlar.

B. Mikrotübüller, sentrozoma nöronal migasyon bozukluklarında hedef olan bir seri proteinle bağlanır.



Şekil 4. *Teğet migrasyon*, Ventral telensefalonda oluşan ara nöronlar, kortekse teğet migrasyon yolu ile göç ederler. Medial ganglionik eminense (MGE) oluşan nöronlar, teğet migrasyon yapıp neokortekse yerleşirler. Cajal-Retzius nöronları da dâhil olmak üzere ara nöronlara dönüşürler. Lateral ganglionik eminesteki (LGE) nöronlar, rostrale doğru göç eder ve olfaktör bulbusun periglomerular ve granül ara nöronlarına katılırlar. Rostral migrasyon sisteminde nöronlar göç edebilmek için birbirlerini kullanırlar (zincir migrasyon) (1).

2.2 NÖRONAL MİGRASYONDA ROL ALAN GENLER

Nöronal migrasyonun kesintiye uğraması lizensefali gibi bir takım malformasyonlara yol açar. Lissencephaly 1 (*LIS 1*) ve doublecortin (*DCX*) genlerindeki mutasyonlar smooth brain, pakigiri, subcortical bant heterotopisi gibi lizensefalinin klinik prezentasyonlarına yol açarlar. Lizensefaliye yol açan sebeplerin büyük kısmı akson gelişiminde defektlerle de ilişkilidir (2).

Akson gelişimindeki defektler de korpus kallozum agenezisi ve lizensefali hastalarındaki genişlemiş ventrikül örneklerinde olduğu gibi beyaz cevher anomalilerine yol açar (3).

Lizensefali tip 1 ve tip 2 olarak ikiye ayrılır. Tip 2 Lizensefali, glikozil transferaz enzim defekti sonucu bazal membranda defektle giden Walker- Warburg ve Fukuyama Musküler Distrofisi ile ilişkilidir. Polimikrogiriye benzer ancak tam tipik olmayan birçok küçük girus bulunur. Bu malformasyon perisilvian, parietal veya bifrontal gibi bölgesel olabilir (3).

Polimikrogiri yaygın bir kortikal malformasyon olmasına rağmen mekanizması tam anlaşılamamıştır. Patoloji spesmenlerinde orta ve derin kortikal tabakalarda anormal gelişim ya da nöronların yokluğu söz konusudur (4).

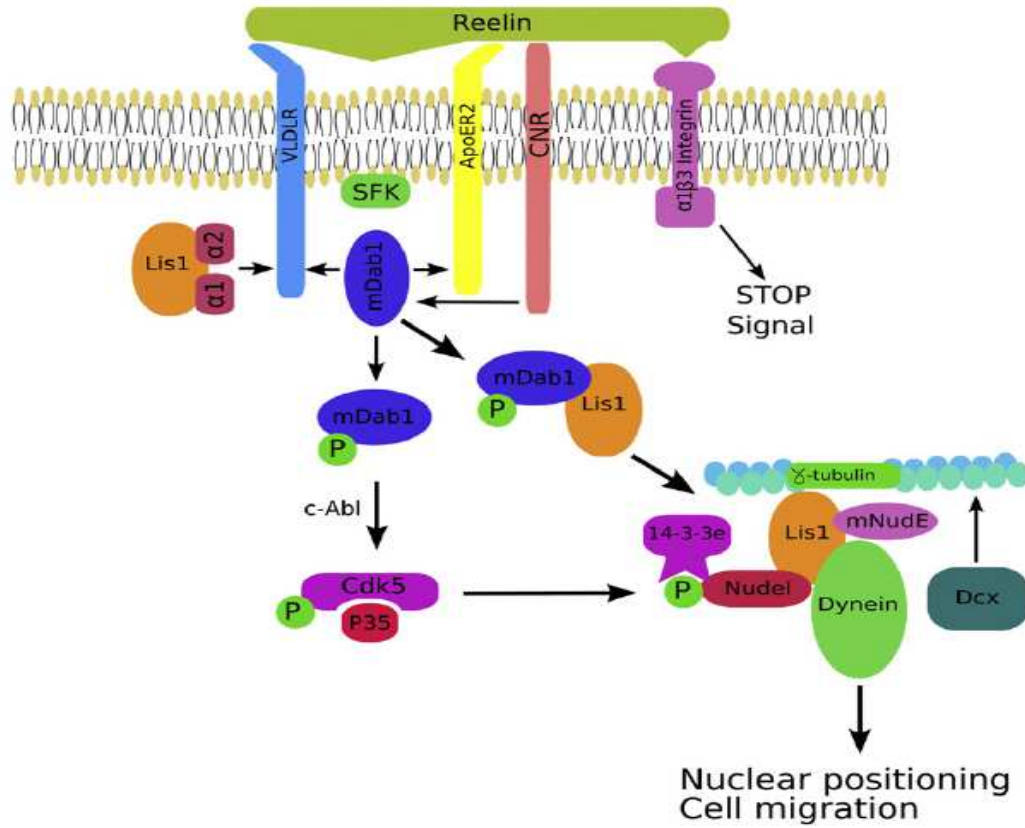
Mikrotübüllerin en önemli görevi transporttur ve mikrotübül bazlı motorlar tarafından yönetilir (5). LIS-1 proteini de dynein fonksiyonlarını yöneten bir motordur. Moleküler motorlar iki yönlü olarak çalışırlar. Kinesin, hücreden aksona doğru taşıma yaparken; dynein aksondan hücre gövdesine taşımacılık yapar (6) . *LISI* ve komşu bazı genlerin delesyonu Miller-Dieker Sendromu'na neden olabilir. Miller- Dieker sendromunda klasik lizensefaliye eşlik eden fasiyal anomaliler bulunur. Bunlar da *YWHAE* gibi komşu genlerin olaya katılması ile olur. *YWHAE* 14-3-3ε proteinini kodlar. Bu protein *LISI*'in düzenleyicisidir (7,8).

Gelişen nöronlarda vezikül transportunu düzenleyen ve *DCX* (doublecortin) geni tarafından kodlanan MAP (mikrotübül associated protein) bulunur (9) MAP'ler aksonlara ve dendritlere spesifiktir ve birçok görevleri vardır. MAP'lerin bağlanması ile mikrotübül yapısı stabilenir, transportun hedefine varması kolaylaştırılır ve motor ilişkileri bloklanarak ya da arttırılarak transportun özgülüğü sağlanır. Ancak *DCX* motor bağlanmasını inhibe etmez (10,11)

DCX'in, interventriküler tabakadan kortikal düzleme geçmesi gereken bütün radial olarak göç eden neokortikal nöronlar için gerekli olduğu öne sürülmüştür (12). *LISI* ilişkili lizensefali posterior beyin bölgelerinde daha etkili iken, *DCX* ilişkili lizensefali anterior beyin bölgelerinde daha etkilidir (13). *LISI* mutasyonlu hastalarda lizensefaliye genelde korpus kallozum hipoplazisi, dilate ventriküller de bulunmaktadır. Bu durum *LISI*'in nöronal migrasyona ek olarak akson formasyonunda da rol oynadığını düşündürmektedir (14).

RELN geni ve *RELN* reseptörünü kodlayan *VLDLR*'nin (very low density lipoprotein receptor) de lizensefaliye sebep olduğu gösterilmiştir (15,16).

Göç eden nöronlarda *VLDLR*, apolipoprotein E reseptör 2, alfa3-beta1 integrin ve cadherins-related reseptör (CNRs) reseptörlerine bağlanarak etki eden büyük ekstrasellüler matrix protein *RELN* geni tarafından kodlanır (17). Farede *RELN* mutasyonları serebellar hipoplazi, anormal serebral kortikal nöronal migrasyon ve anormal aksonal ilişkiye sebep olmakta ve etkilenmiş farede nöronlar doğru yerlerine ulaşamamaktadır. Bu nedenle *RELN* geninin, beyinde hücre pozisyonlanması için gerekli hücre-hücre ilişkilerinde önemli olduğu düşünülmektedir. *RELN*'in alfa3-beta1 integrin reseptörüne bağlanması nöronal migrasyonu durdurucu etki yapmaktadır (18).



Şekil 5. Nöronal migrasyonda LIS1 ve RELN sinyal yolları. Ekstrasellüler RELN, üç reseptör kompleksinden birine bağlanır: kadherin bağlantılı nöronal reseptör (Cnr), VLDLR/ApoER2 veya β integrin. Bu bağlanma Cdk5/p35 sistemini aktive eden MDab1'i aktive eder. Cdk5, Nudel dahil birçok intrasellüler hedefi fosforile edebilir. Fosforile olmuş Nudel, Lis1, mNudE, Dynein ve mikrotübüller ile kompleks oluşturur. Bu kompleks hücre migrasyonunda ve nükleer pozisyonlanmada önemlidir. DCX'in aynı zamanda LIS1 ile etkileşerek, mikrotübül fonksiyonlarını düzenlediği düşünülmektedir. Ek olarak, RELN'in VLDLR ve ApoER2'ye bağlanması src-family kinaz (SFK) aktivasyonuna ve Dab1 fosforilasyonuna sebep olur. Fosforile Dab1 de LIS1 ile etkileşir. LIS1 aynı zamanda Pafah1b ($\alpha 1$ ve $\alpha 2$) kompleksinin katalitik subünitlerine ve sitoplazmik dynein kompleksine bağlanır. $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ subünitleri aynı zamanda VLDLR'ye bağlanır ve dab1 ile reseptör yarışını yapar. Katalitik Pafah1b subünitlerinin VLDLR'ye bağlanması P-dab1'i yerinden oynatabilir ve LIS1 ile olan ilişkisini arttırabilir (13).

Mikrotübüller, tubulin heterodimerlerinin polimerizasyonu ile oluşan tüp şeklinde yapılardır ve nöronal migrasyonda görev alırlar. Tubulin ise α ve β subünitlerinden oluşur. Bu subünitleri yapısal olarak benzer ancak hücresel düzeyde kendine özgü görevleri olan bir takım genler kodlar. Mikrotübüllerin uzaması ve polimerizasyonu, soluble tubulin

heterodimerlerine bağlanan GTP üzerinden sağlanır (19). TUBA1A alfa-tübülün protein ailesine aittir. TUBA1A ekspresyonu, erken doğmuş postmitotik göç eden nöronlarla sınırlıdır ve yetişkin beyinde spesifik alanlarla sınırlıdır (19).

Bazı *TUBA1A* mutasyonları polimerizasyonu sağlayan GTP bağlanmasını bloke ederek etki gösterir. TUBA1A sinir sisteminin gelişimi sırasında fazlaca eksprese olur ve lizensefalide ve pakigiride etkinliği gösterilmiştir (19). Etkilenen bireyler ileride mikrosefalik olabilirler ve ağır vakalarda agiri ve posterior pakigiriden, daha yaygın olarak ve hafif seyirli vakalarda perisilvian pakigiriye kadar değişen kortikal malformasyonlara sahip olabilirler. *TUBA1A* mutasyonlarında, *DCX* ve *LIS1* mutasyonları ile pek ilişkili olmayan ek defektler bulunur. Bunlar; beyin sapı ve serebellar hipoplazi, internal kapsül anterior kanat hipoplazisini içerir. Bu durum *TUBA1A* mutasyonuna spesifiktir ve caudat ve putamenin yetersiz ayrılması sonucu dismorfik bazal ganglionlar ile ilişkilidir (20).

Filamin A aktin yapısını düzenleyen bir proteindir. Aktin, mikrotübüllere ek olarak nöronal migrasyonda rol alan önemli bir hücresel yapıdır. Aktin yapısında meydana gelen değişimler, nöronal migrasyon sırasında yapısal değişimlere sebep olmaktadır. Filamin A, aktinin, integrinlerle bağlanmasına aracılık eden bir aktin bağlayıcı proteindir. Bu sebeple hem migrasyonda hem de hücre yapısının düzenlenmesinde önemlidir. Filamin A ekspresyonu sadece santral sinir sistemi ile sınırlı değildir. Dolayısı ile mutasyonları klinik olarak önem taşır. Filamin A damar yapılarının doğru gelişiminde de rol alır. Bu mutasyonu taşıyan hastalarda inme, patent ductus arteriosus ve biküspit aortik valv gibi kardiyak anomaliler bulunur (3).

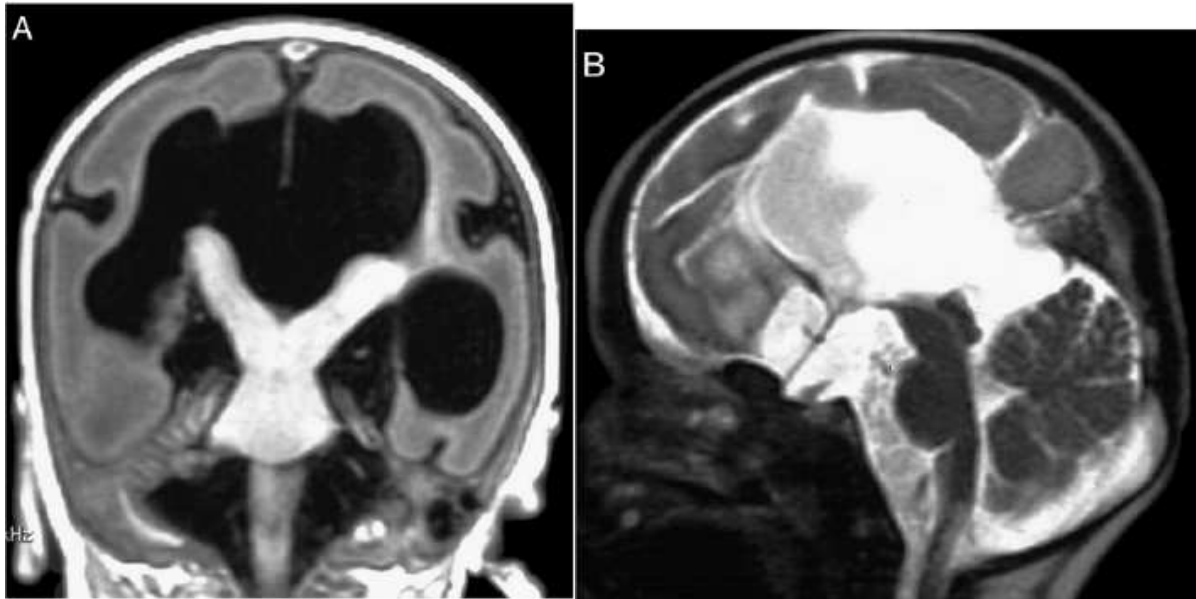
Filamin A mutasyonları santral sinir sisteminde ise, klasik bilateral periventriküler nodüller heterotopi veya Ehlers- Danlos Sendromu ile ilişkilidir (21). Periventriküler nodüller heterotopi vakalarında bazı nöronların göçünde başarısızlık olması sebebiyle lateral ventriküller boyunca uzanan gri cevherde, nodüller bulunur (22). Korteks anormal bir organizasyon gösterebilir (23).

Filamin A mutasyonları bütün periventriküler nodüller heterotopi vakalarının %25'ini ve X'e bağlı aktarılan periventriküler nodüller heterotopi vakalarının çoğunda bulunur (24.)

Bu mutasyon erkeklerde genelde lethal seyretmesine rağmen, izole hemizigot erkekler bulunmaktadır (25). Periventriküler nodüller heterotopisi olan hastalar genellikle adölesan

veya yetişkinlik dönemine kadar semptom vermezler. Eğer entelektüel bir sorunları yoksa genellikle ilk semptom epileptik nöbettir (3).

ARX mutasyonu, etkilenmiş hemizigot erkek çocuklarda infantil spazm ve anormal genitalya ile birlikte lizensefalinin bulunduğu nörolojik bozukluklara yol açar. Tüm *ARX* mutasyonları entelektüel bozukluklarla ilişkili olsa da; lizensefaliye yol açan mutasyonlar proteinin DNA bağlanma bölgesinde ya da *ARX* proteininin fonksiyon kaybına yol açan erken trunkasyonu ile olur (26,27). *ARX* 4 adet polialanin bölge içermektedir. *ARX* mutasyonlarının %59'u ilk iki polialanin bölgesinde genişleme sonucu oluşur. Polialanin genişlemeler Ohtahara Sendromu veya infantil spazmlarla birlikte jeneralize distoni veya diskinezi kombinasyonları olan epilepsi ile ilişkilidir (27,28). Hayvan çalışmalarında *ARX* geninin sadece eksitator nöronların radyal göçünde rol oynamadığı aynı zamanda GABAerjik internöronların doğru gelişiminde kritik önemi olduğunu göstermiştir (29). Buna ek olarak hayvan çalışmaları *ARX*'in pankreas gelişiminde de rolü olduğunu göstermiştir. Bu da ağır olarak etkilenen hastalarda medikal yaklaşım gerektirecek uzamış ve ciddi hipoglisemiye açıklayabilir (30). *ARX*, *DCX* gibi X'e bağlı kalıttır (27).



Şekil 6. X'e bağlı geçen lizensefalili erkek hastaya ait beyin MRI; koronal kesit (A) ve sagittal kesit (B). *ARX* gen mutasyonuna bağlı komplet korpus kallozum agenezisi ve ambiguous genitalia (13).

İnsan *LARGE* geni 22. kromozom üzerinde 22q12.3-13.1 lokasyonunda yer almaktadır. En büyük 5. insan genidir ve en yüksek oranda kalp, beyin ve iskelet kasında eksprese edilir. Mental retardasyon, yapısal beyin anomalileri, nöronal migrasyon anomalileri, müsküler distrofi bu genle ilgili patolojilerde ortaya çıkabilecek durumlar olarak tanımlanmıştır. (31) *LARGE* geninde oluşan defekte α -distroglikan proteininde hipoglikolizasyon neticesinde bahsedilen defektlerin oluştuğu düşünülmektedir (32).

Tablo 1. Nöronal migrasyon anomalilerinin genetiği

Cortical malformation	Mode of inheritance	Gene	Locus	Pathway defect
Lissencephaly				
Lissencephaly with abnormal genitalia	X-linked	<i>ARX</i>	Xp22.1	Transcriptional regulation
Isolated lissencephaly or subcortical band heterotopia ("double cortex syndrome")	X-linked	<i>DCX</i>	Xq22.3-q23	MT-based transport
		<i>TUBA1A</i>	12q13.12	MT-based transport
Classical lissencephaly	LIS1 haploinsufficiency	<i>LIS1</i>	17p13.3	MT-based transport
Miller-Dieker syndrome	Microdeletion	<i>LIS1 + YWHAE</i>	17p13.3	MT-based transport
Lissencephaly with cerebellar hypoplasia	Autosomal recessive	<i>RELN</i>	7q22.1	Signaling
	Autosomal recessive	<i>VLDLR</i>	9p24.2	Signaling
Cobblestone lissencephaly				
Fukuyama congenital muscular dystrophy or Walker-Warburg syndrome		<i>FCMD</i>	9q31.2	Matrix protein glycosylation
Muscle-eye-brain disease or Walker-Warburg syndrome		<i>FKRP</i>	19q13.32	Matrix protein glycosylation
		<i>POMT1</i>	9q34.13	Matrix protein glycosylation
		<i>POMT2</i>	14q24.3	Matrix protein glycosylation
Muscle-eye-brain disease		<i>LARGE</i>	22q12.3	Matrix protein glycosylation
		<i>POMGnT1</i>	1p34.1	Matrix protein glycosylation
Periventricular heterotopia				
Bilateral periventricular nodular heterotopia	X-linked	<i>FilaminA</i>	Xq28	Actin regulation
Periventricular nodular heterotopia with microcephaly	Autosomal recessive	<i>ARFGAP2</i>	20q13.13	Vesicle trafficking

*Referans no: 3

2.3 KORTİKAL GELİŞİMSEL ANOMALİLERİN KLASİFİKASYONU

Serebral kortikal gelişimsel malformasyonların sıklığı 1/100000'dir (33,34). Çocukluk çağında mental-motor retardasyon ve epilepsinin artan sıklıkta saptanan nedenlerindedir. Bu artışın temelinde gelişen teknoloji ile birlikte görüntüleme metotlarında sağlanan ilerlemedir (35).

Nöronal göç sırasında, bu göçü engelleyen herhangi bir şey kortikal bozukluklara yol açabilir.

Nöral proliferasyon memeli türleri arasında değişkenlik gösterse de GABAerjik kortikal internöronlar; medial ve caudal eminensler ile dorsal germinal epitelin subventriküler bölgesinde üretilerek; medial ganglionik eminensden tangenital olarak, dorsal subventriküler zondan radial olarak göç ederek gelişmekte olan kortekse ulaşırlar (36).

Dorsal subventriküler zonda, nöroepitelyal hücreler fibroblast growth faktör aracılığı ile radial glial hücrelere dönüşürler (37).

Nöroepitelyal hücreler sayılarını arttırmak için simetrik olarak bölünürlerken, radial glial hücreler hem kendilerini yenilemek hem de intermedier progenitor hücreleri oluşturmak için asimetrik olarak bölünürler. Hem radial glial hücreler hem de intermedier progenitor hücreler glutaminerjik hücreler üretirler (38,39).

Türler arasında karşılaştırma yapıldığında, intermedier progenitor hücrelerin sayısal olarak artması; artmış kortikal büyüklük ve kompleksite ile ilişkilidir (40).

Ağır konjenital mikrosefali vakalarında progenitor hücre mitoz siklusunu kontrol eden genlerde mutasyonlar gösterilmiştir (41).

Nöronal migrasyonda mikrotübül transportunun, sentrozomal pozisyonlanmanın, LIS1 bağlantılı nükleer transportun, DCX bağlantılı mikrotübül stabilizasyonunun, FLNA ve ARFGEF2'nin ilişkili olduğu vezikül füzyonunun, MEKK4 ve FLNA ilişkili nöroepandimal katılımda rol oynadığı ortaya konulmuştur (42-44). Bu nedenle *TUBA1A*, *TUBB8*, *TUBB2B* ve *TUBB3* gibi mikrotübül proteinlerini etkileyen mutasyonların migrasyon anomalilerine yol açması şaşırtıcı değildir (45-49). Nöronal migrasyonun birçok basamağında farklı genler rol almaktadır ve bunların mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu konular aydınlığa kavuştukça hastalıkların sınıflamalarında değişiklikler olacaktır (50).

Nöronal migrasyon anomalileri Barkovich ve arkadaşları tarafından 2012'de revize edilmiş ve hastalıklar dört gruba ayrılmıştır (50).

Grup 1; Anormal nöronal ve glial proliferasyona veya apoptoza sekonder malformasyonlar

Grup 2; Anormal nöronal migrasyona bağlı malformasyonlar

Grup 3; Anormal postmigrasyonel gelişime sekonder malformasyonlar

Grup 4; Başka türlü sınıflandırılmayan kortikal gelişimsel malformasyonlar

2.3.1 Şizensefali

Hemisfer boyunca ventrikulun endimal yüzeyinden korteksin pia örtüsüne kadar uzanan, gri madde ile çevrili bir yarıktır. Bazı otoriteler bu anomalinin kortikal organizasyon bozukluğu olduğuna inanırlar. Çünkü yarıkları polimikrogirik veya pakigirik korteks ile çevrelenmiştir. Tek taraflı yarıklara sıklıkla kontralateral bir polimikrogiri eşlik eder (51).

Şizensefalilerin %60'ı unilateraldir. Yarıklar beyin herhangi bir yerinde bulunabilir ancak en sık perisilvian alanda olurlar. Hastalığın kliniğini de tutulan beyin bölgesi belirler. Tipik özellikleri nöbet, gelişme geriliği, hemiparezi veya tetraparezidir. Yaşamın ilk iki yılı içerisinde semptom verir. Kapalı ve açık olmak üzere iki tipi vardır. Kapalı olanların prognozu daha iyidir. Kapalı olanlarda dudaklar birbirine yakın iken açık olanlarda yol boyunca BOS ile dolu olup dudaklar ayrıktır (52,53). En iyi prognoz unilateral kapalı şizensefali tipidir. 'De Morsier Sendromu' hastaların üçte birinde saptanabilen septum pellucidum agenezisi ve optik sinir hipoplazisinin eşlik ettiği bir durumdur (54). Şizensefali vakalarının yarısında çoklu antiepileptik kullanımı gerektiren dirençli epileptik nöbetler vardır (55,56). Şizensefalinin tipi ile nöbetler arasında direkt ilişki saptanmamış olsa da unilateral tipte daha çok olduğu belirlenmiştir (57).

EEG anormallikleri yarığın lokalizasyonundan çok genişliği ile ilgilidir. Cerrahi olgularda rezeksiyonlar intraoperatif elektrokortikografi eşliğinde ve gerektiğinde derin elektrotların yardımıyla yapılmalıdır (58).

2.3.2 Fokal Kortikal Displazi

Kortikal laminasyonda anormallik, korteks tabakalarında anormal sayıda geniş atipik nöronlar, subkortikal ak maddede nöronal izole heterotopiler ve kimi zaman balon hücreler bulunur (59).

Bitişik normal dokudan kesin sınırlarla ayrılamayabilir. Bazı durumlarda fokal lezyonları olan beyinlerin kapsamlı araştırmalarında yaygın minor displastik değişiklikler görülür. Displazi herhangi bir beyin bölgesinde olabileceği halde en sık frontal lobda rastlanır. (60). Klinik olarak en sık dirençli parsiyel nöbetler vardır. Epilepsia parsialis continua presantral alanı tutan displazilerde daha fazla bildirilmiştir (61).

2.3.3 Lizensefali

Lizensefali genel anlamda agiri-pakigiri kompleksi olarak kullanılmaktadır. Girus yokluğuna agiri, birkaç kaba, düz girus varlığına da pakigiri denmektedir. Komplet lizensefali agiri ile eş anlamlı kullanılırken inkomplet lizensefali agiri-pakigiri tablosunu ifade etmek için kullanılabilir. Nöron migrasyonu durduğunda klasik (tip 1) lizensefali, fazla migrasyon olduğunda “cobblestone”(kaldırım taşı) (tip 2) lizensefali meydana gelmektedir.

2.3.3.1 Tip 1 Lizensefali

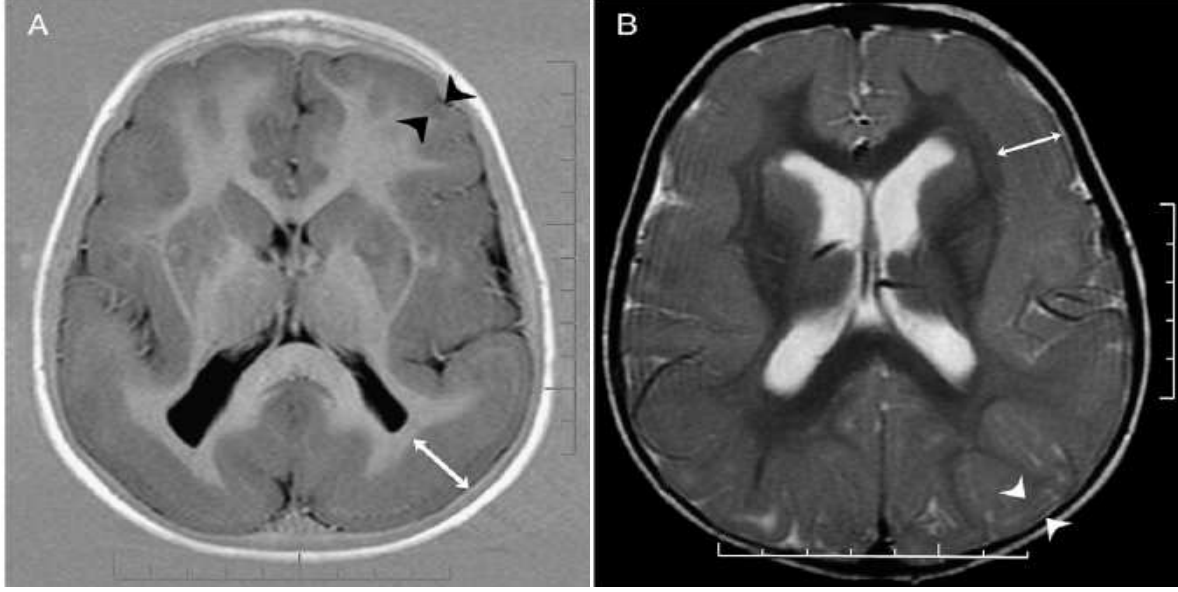
Makroskopik olarak beyin yüzeyi düz, transvers kesitlerde “8” şeklinde, silvian fissürler vertikal yerleşimli, lateral ventrikül oksipital hornları embriyondakine benzer şekilde ektazik, korpus kallozum hipo/agenetik, beyin sapı ve serebellum değişik derecelerde hipogenetik görülür.

Miller-Dieker Sendromu da bir agiri-pakigiri kompleksidir. Hastalarda 17p 13.3 delesyonu vardır. Genital ve kardiyak anomalilerin yanı sıra parieto-occipital bölgede agiri, frontotemporal bölgede pakigiri bulunur. Tipik yüz görünümüleri bitemporal çöküklük, kısa burun, küçük çene, belirgin alın şeklindedir. İzole lizensefali vakalarında dismorfik özellikler daha hafiftir (34,62,63).

X'e bağlı lizensefali erkekleri etkiler ve sorumlu gen Xq 22.3-q23'tür. Bu grupta agiri-pakigiri frontal bölgede daha belirgin olarak görülmektedir. Bu çocukların annelerinde bant heterotopi saptanabilir (64-66). Komplet lizensefaliler hipotonik doğar ve hızlıca orofarengal ve apandiküler spastisite geliştirirler. İnkomplet lizensefalilerde klinik daha hafiftir.

2.3.3.2 Kaldırım Taşı Lizensefali (Tip 2)

Bu çocuklar doğumda hipotoniktirler. Eşlik eden eklem kontraktürleri, oküler anomaliler olabilir. Laminin 1 ve 2 nöron migrasyonunda kılavuz olarak rol oynamakta olup Fukayama ve kas-göz-beyin hastalığında eksik bulunmaktadır. Laminin β -2 ise Walker-Warburg sendromunda eksiktir.



Şekil 7. *LIS1* gen mutasyonlu klasik lizensefali hastası (erkek) (A): Beyin MRI: aksiyal kesit;; (B) *DCX* mutasyonlu bayanda lizensefali. A’da tipik olarak posterior da malformasyon daha fazladır. Anterior beyinde gri cevher ve kortikal kalınlık daha iyi korunmuştur; frontal loblarda kortikal kalınlık yaklaşık 6 mm’dir (iki siyah ok başı; normal kortikal kalınlık 4mm). Posterior beyinde 3 cm’dir (beyaz ok). B’de anteriordaki malformasyon posterior dan daha fazladır; frontal loblarda kortikal kalınlık 2cm civarındadır (beyaz ok). Posterior da, kortikal kalınlık 4 mm civarındadır (iki beyaz ok başı) (13).

2.3.4 Heterotopi

Radyal yönde göç eden nöronların migrasyonlarının durması sonucu sinir hücrelerinin anormal yerleşimine bağlı gri madde bozukluklarıdır. Nöronların sinaptik bağlantılarında sorun vardır. Görüntüleme yöntemlerinde gri cevher ile aynı özellikte gözükür.(67). Heterotopide eşlik eden epileptik nöbetler ve başka diğer anomaliler vardır. Diffüz veya fokal heterotopi şeklinde olabilir. Diffüz formlar kendi içerisinde subkortikal bant heterotopisi (51) ve bilateral periventriküler nodüler heterotopi olarak ayrılır (68). Heterotopilerde ilk nobetler kortikal gelişimin diğer malformasyonlarından görece geç olarak ve en sık 20’li yaşlarda ortaya çıkar (69,70).

2.3.5 Subependimal Heterotopi (Bilateral periventriküler nodüler hipertrofi)

Lateral ventrikül ve temporo-occipital lobda yerleşimli olup asimmetriktirler. Gelişimleri normaldir ancak ikinci dekatta nöbetler başlar. Ailesel olanlarda Xq28 lokusunda bulunan *Filamin 1* geni mutasyonu saptanmıştır. MRG’de düz, ovoid kitlelerdir ve tüm sekanslarda gri madde ile izointensitirler. Klinik fenotip asemptomatik bireylerden epileptik nöbetlere ve normal kognitif fonksiyonlardan orta ya da ağır mental retardasyona kadar geniş bir spektrumu kapsar (69-72).

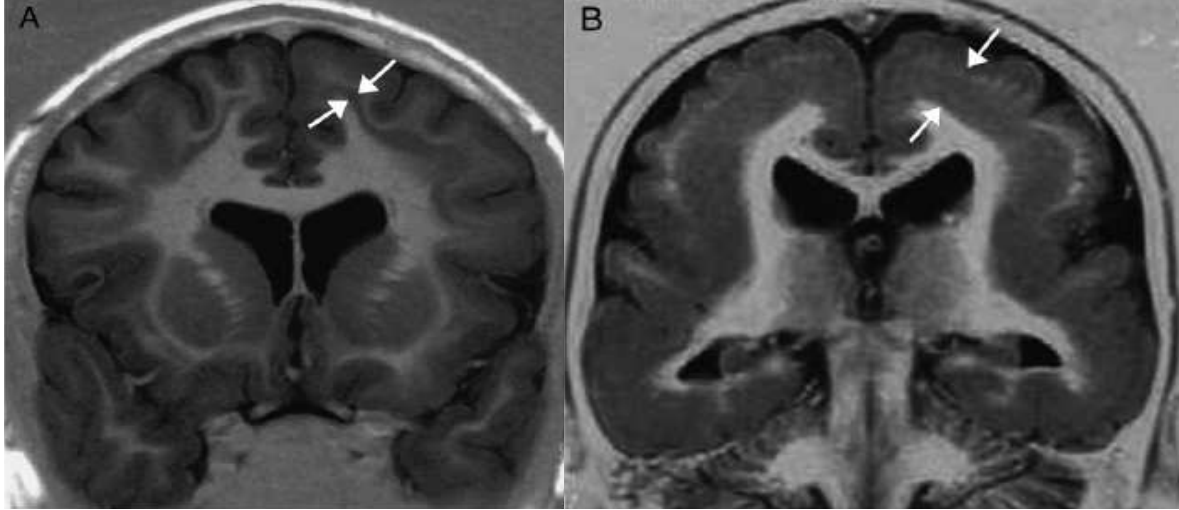


Şekil 8. *Klasik bilateral periventriküler nodüler heterotopi*; Beyin MRI: aksiyal kesit. *FLNA* geninin missense mutasyonunu taşıyan kadında tipik, klasik bilateral periventriküler nodüler heterotopi. Subependimal heterotopinin nodülleri bilateral simetrik ve ventriküler duvarlara genişçe komşudur (siyah ok başları) (13).

2.3.6 Fokal Subkortikal Heterotopi

Etkilenen bölgeye göre epileptik nöbetler ve değişen derecelerde mental-motor retardasyon görülür. MRG’de tüm sekanslarda gri madde ile izointens ve heterojendir. Bazen multinodüler gri madde kitleleri olarak bazen de bantlar şeklinde saptanır. O taraf hemisferde

küçüklük, ince korteks, sık sulkus görülebilir. Olguların yarısından fazlasında corpus kallozum agenezisi vardır (70,71).



Şekil 9. *DCX* gen mutasyonunun etkilediği hastalarda beyin MRG. (A,B) Beyin MRG: *DCX* geninin farklı iki mutasyonunu taşıyan iki genç kadının coronal kesitleri. Korteksin yanında, ondan ince bir beyaz cevher tabakasıyla ayrılan, korteksle aynı sinyal intensitesini gösteren bölge subkortikal bant heterotipisidir (beyaz oklar). B'deki hasta daha şiddetli etkilenmiştir. Korteks daha basit ve heterotopik band daha kalındır (13).

2.3.7 Bant Heterotopi (Double Cortex)

Etyolojisinde *DCX* (double cortin) geni sorumlu tutulmaktadır. Diğer formlarda olduğu gibi değişen derecelerde mental-motor gerilik ve epileptik nöbetler vardır. MRG'de lateral ventrikül ile korteks arasında homojen bir bant olarak saptanır. Korteks ile bant heterotopi arasındaki normal beyaz madde seçilir. Bandın kalınlığı ne kadar fazla ise prognoz o denli ciddi olur. Kız çocuklarında daha sık rastlanır. Pakigiri ağırlaştıkça ve heterotopik bant kalınlaştıkça Lennox- Gestaut sendromu ve bazı diğer jeneralize semptomatik epilepsi formlarını geliştirme riski o oranda artar. Serilerde %50'ye yakın Lennox-Gestaut özellikleri gösteren jeneralize ve yine parsiyel nöbetler saptanmıştır (73).

2.3.8 Polimikrogiri

Korteksin normal altı katlı tabakasının bozulduğu, displazilere göre daha geniş bir alanı ilgilendiren, çok sayıda küçük girusun bulunduğu anomali şeklindedir. Tutulan beyin bölgesine göre semptomlar değişse de epileptik nöbetler, mental-motor gerilik izlenir. En sık perisylvian fissur çevresinde izlenir. Konjenital bilateral perisylvian sendrom (bilateral operküler polimikrogiri) psodobulber felç, epilepsi, mental gerilik ve bazı dismorfik özelliklerin olduğu özel bir sendromdur (68). Polimikrogiri birçok sendromla birlikte ve farklı genlerin etkilenmesi sonucu olabilir.

2.3.9 Aicardi Sendromu

Aicardi sendromu X'e bağlı geçen, erkeklerde fatal seyreden sebebi tam bulunmamış bir hastalıktır. Ağır mental retardasyon, korpus kallozum agenezisi, infantil spazmlar, ince tabakalanmamış polimikrogirik bir korteks, periventriküler veya subkortikal nodüler heterotipi ile karakterizedir (74).

2.4 MANYETİK ALAN

Radyofrekans (RF) , elektromanyetik spektrumda 3 kHz ile 300 GHz frekans aralığında yer alan banttır. Mikrodalga radyasyon, RF'nin bir alt tipi olarak kabul edilir. 300 GHz ile 300 MHz arasında yer alır. Benzer özelliklerde olduklarından dolayı tanımlamalar da her ikisi de kullanılabilir.

Günümüzde cep telefonları, mikrodalga fırınlar, baz istasyonları, radarlar RF yaymaktadırlar. Günlük hayatta bu cihazların sık kullanımı sağlıkla ilgili endişeleri arttırmış ve çalışmaların yoğunlaşmasına sebep olmuştur.

Dozimetre, belirli bir kaynak tarafından yayılan radyasyonu ölçmeye ve olay yeri ile internal alanları değerlendirmeye yarar. İç alanlar ve akımlar, termal veya non-termal şekilde canlı sistemlerle etkileşirler. Bu etkileşim, objenin cinsi ve büyüklüğü, elektriksel özellikleri, uygulama sıklığı gibi durumlardan etkilenir. Dozimetre hesaplanırken kullanılan değerlerden biri de SAR (specific absorption rate)'dır. Mobil telefonlar baş-boyun bölgesine 1.6 W/kg veya 2 W/kg SAR ile ilişkilidir. Lokal pik SAR değerlerini, anten özellikleri, objenin

radyasyon kaynağına olan uzaklığı, baş modelinin iletim ve absorpsiyon özellikleri gibi birçok faktör belirler (75).

Specific Absorbtion Rate (SAR)= energy/ (mass*time)= Joules/kg(s)= Watts/kg (76,77).

Tablo 2. Elektromanyetik spektrum

The electromagnetic spectrum ^a			
Class	Frequency (f)	Wavelength (λ)	Energy (E)
Extremely low freq.	3 Hz–30 Hz	100 Mm–10 Mm	12.4 feV–124 feV
Super low freq. ^b	30 Hz–300 Hz	10 Mm–1 Mm	124 feV–1.24 peV
Voice freq.	300 Hz–3 kHz	1 Mm–100 km	1.24 peV–12.4 peV
Very low freq.	3 kHz–30 kHz	100 km–10 km	12.4 peV–124 peV
Low freq.	30 kHz–300 kHz	10 km–1 km	124 peV–1.24 neV
Medium freq.	300 kHz–3 MHz	1 km–100 m	1.24 neV–12.4 neV
High freq.	3 MHz–30 MHz	100 m–10 m	12.4 neV–124 neV
Very high freq.	30 MHz–300 MHz	10 m–1 m	124 neV–1.24 μeV
Ultra high freq.	300 MHz–3 GHz	1 m–1 dm	1.24 μeV–12.4 μeV
Super high freq.	3 GHz–30 GHz	1 dm–1 cm	12.4 μeV–124 μeV
Extremely high freq.	30 GHz–300 GHz	1 cm–1 mm	124 μeV–1.24 meV
Far infrared	300 GHz–3 THz	1 mm–100 μm	1.24 meV–12.4 meV
Mid infrared	3 THz–30 THz	100 μm–10 μm	12.4 meV–124 meV
Near infrared	30 THz–300 THz	10 μm–1 μm	124 meV–1.24 eV
Visible light ^c			
Near ultraviolet	300 THz–3 PHz	1 μm–100 nm	1.24 eV–12.4 eV
Extreme ultraviolet	3 PHz–30 PHz	100 nm–10 nm	12.4 eV–124 eV
Soft x-rays	30 PHz–3 EHz	10 nm–100 pm	124 eV–12.4 keV
Hard x-rays	3 EHz–30 EHz	100 pm–10 pm	12.4 keV–124 keV
Gamma rays	30 EHz–300 EHz	10 pm–1 pm	124 keV–1.24 MeV

Freq: frequency; ELF: extremely low frequency.

^aRadio waves have frequencies from 3 kHz to as high as 300 GHz. Microwaves are radio waves with frequencies between 300 MHz and 300 GHz.

^bAnother conflicting designation that includes this frequency range is ELF, which refers to frequencies from 3 to 300 Hz. (In this collected work, range of frequencies of 3–300 Hz is accepted as ELF).

^cThe frequency range of the visible light is between 400 and 790 THz (Wikipedia, 2012a).

Gerçekçi bir yetişkin baş modeli ve onun küçültülmesiyle elde edilen infant baş modelinin kullanıldığı bir çalışmada maksimum ısı artışı; yetişkinde göz kürelerinde (0.07°C), infantta ise kasta (0.0058°C) elde edilmiştir. Tüm dokulardaki ortalama ısı artışı, göz küreleri hariç tutulduğunda infantta daha yüksek olmuştur (78). Bazı yayınlarda çocuklarda ciddi SAR artışları saptansa da yetişkinlerle arasında fark olmadığını savunan yayınlar da vardır (79,80).

Hondou, yüzlerce cep telefonunun bir araya geldiğinde yaydığı radyasyonun, mikrodalga fırın ya da satellit hava durumu istasyonları ile kıyaslanabilir düzeye geldiğini bulmuştur (81). Toropainen ise asansör, tren gibi ortamlarda bulunan çok sayıdaki cep telefonunun ICNIRP (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection) tarafından önerilen güvenli limitleri aşmadığını savunmuştur (82).

2000 yılında 13 ülkenin katıldığı, uluslararası, koordineli vaka-kontrol çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada en sık görülen iki beyin tümörü tipi olan menengioma ve glioma sıklığı ile mobil telefon kullanımını arasındaki ilişki araştırılmıştır. 5 sene boyunca, 5000'den fazla sayıda tümörlü hasta sorgulanmıştır. Bu araştırmanın sonucunda her iki tümör tipinde de anlamlı ilişki bulunmamıştır (83).

D'Ambrosio ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, insan periferik kan kültürleri SAR değeri cep telefonunun üzerinde olan (5 W/kg) manyetik alanda bırakılmışlardır ancak hücre proliferasyonu açısından anlamlı farklılık görmemişlerdir (84).

Aldinucci ve arkadaşları ise nükleer manyetik rezonans aparatına (4.75 Tesla) 1 saat boyunca maruz bırakılan insan periferik kan mononükleer hücrelerinde, kalsiyum hareketlerini, hücre proliferasyonunu, proinflatuar sitokinlerin üretilmesini uyarabileceğini göstermiştir (85).

D'Andrea ve arkadaşlarının yaptıkları bir derlemede RF'nin kan-beyin bariyerinin üzerindeki etkileri termal maruziyet varsa olabileceği, düşük doz uygulamalar sonrası hasar bildiren çalışmaların tartışmalı olduğu, yüksek derecelerde RF maruziyetinin sinir sisteminin yapısına ve fonksiyonuna zararlı olduğu, izole beyin dokuları ile yapılan çalışmaların ise termal hasarı desteklemediğini belirtmişlerdir (86).

Griefhan ve arkadaşları 16-22 yaş arası gönüllüleri çok düşük doz (16.7 Hz) manyetik alana maruz bırakarak tükürük melatonin düzeylerini değerlendirmiş ve herhangi bir değişim saptamamışlardır. Çalışmanın sonucunda insanda melatonin supresyonunun en çok tekrarlayan maruziyetler sonucunda olabileceğini öne sürmüşlerdir (87).

Black ve Heynick ise RF radyasyon ile pineal bez arasında ilişki olmadığına işaret eden kısıtlı araştırma bulunduğunu hatta RF radyasyona maruz kalan hayvanların yaşam boyu çalışmalarında, hayvanların endokrin, hematolojik ve immün sistemlerinde kümülatif yan etki olmadığını savunmuşlardır. (88).

Tice ve arkadaşları 5 W/kg SAR üreten cep telefonlarına uzun süre maruz kalmakla DNA zincir kırıkları ya da başka DNA hasarları olabileceğini, ayrıca insan lenfositlerinde kromozomal hasar oluşabileceğini belirtmişlerdir (89). Mashevic ve arkadaşları da insan lenfositlerini, devamlı olarak 830 MHz RF enerjisinde ve 1.6- 8.8 W/kg SAR düzeylerinde 72 saat boyunca düzenli maruz bıraktıklarında genotoksik yan etkiler bildirmişlerdir (90).

Birkaç çalışmada, yüksek derecelerde RF alanlarına maruziyetle hayvanlarda tümör oluşum riskinin artabileceği gösterilmiştir. (91-93). Ancak orta düzey maruziyetlerde tümör gelişim oranlarında değişiklik olmadığını gösteren çalışmalar da vardır (94-97).

French ve arkadaşları tarafından 2001 senesinde ortaya atılan bir hipotez, kanser ve cep telefonu kullanımı arasında direkt ilişki olabileceğini düşündürmüştür. Cep telefonu radyasyonuna tekrarlayan maruziyetlerin, ısı-şok proteinlerinin devamlı ekspresyonuna yol açan ve normal fonksiyonlarını etkileyen devamlı bir stres oluşturduğunu savunmuşlardır. Isı-şok proteinlerinin kanser indüksiyonunda rol oynadıkları düşünülmektedir (98).

Shallom ve arkadaşları, tavuk embriyolarını 915 MHz radyasyona ve SAR değeri 1.5 ve 2.5 W/kg olacak şekilde değişik deneylerde maruz bırakmışlardır. Hsp 70 (heat-shock protein 70) değerleri kontrol grupları ile kıyaslandığında, maruziyetin başlangıcından 3 saat sonra pik yapmak suretiyle, % 30 oranında artmıştır. Ortam sıcaklığı 38.8 °C'yi aşmadığından bu artışın sıcaklık değerlerinden bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır. Çünkü 39°C'ye kadar ısıtılan embriyolarda Hsp 70 değerleri değişmemiştir (99). Bu bulgular Kwee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarla da desteklenmiştir (100). Karaca ve arkadaşlarının fare beyin hücre kültürlerini 0.725 W/kg SAR değerinde 3 gün boyunca, günde 6 saat maruz bıraktıkları bir çalışmada apoptotik hücrelerin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında iki kat arttığı, apoptotik ve anti-apoptotik yollarda ve kanser patogenezinde önemli rol oynayan genlerden STAT3 düzeylerinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 7 kat azaldığını göstermişlerdir (101).

Muscat ve arkadaşları 2000 senesinde vaka-kontrol çalışması yapmışlar ve bu çalışmaya 1994-1998 arasında 422 hastanede tespit edilen 469 beyin tümörü vakası dahil edilmiştir. Aylık ortalama kullanım kontrol grubunda 2.2 saat, vaka grubunda 2.5 saat; ortalama kullanım süresi kontrol grubunda 2.7 sene, vaka grubunda 2.8 sene olarak saptanmıştır. Çalışmada beyin kanseri ile cep telefonu kullanımı arasında ve temporal lob tümörleri ile telefon lateralizasyonu arasında ilişki bulunmamıştır (102).

Heynick ve arkadaşları 2003 senesinde elektromanyetik alanlara maruziyet ve kanser ile ilgili çalışmalarını derlemiş ve yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda "in vivo ya da in vitro olarak manyetik alanların kanser yaptığı var sayımı desteklenemez" görüşüne varmışlardır (103).

Cooper ve arkadaşları, Dolk ve arkadaşlarının, Birleşik Krallık'taki West Midlands bölgesinde bulunan Sutton Mast radyosu ve televizyon vericisinin etrafında yaşayanlarda 1987-1994 arasındaki kanser dataalarını inceleyerek yetişkin ve çocukluk dönemi lösemilerini araştırdıkları çalışmayı güncellemişlerdir. Kaynağa 10 km uzaklıkta yaşayan kadınlarda lenfatik ve heamopoietik kanserlerde, özellikle akut myeloid ve kronik lenfatik lösemide belirgin artış olduğu aynı zamanda erkek akut lenfatik lösemi oranlarında da artış olduğu sonucuna varılmıştır. Az sayıda çocukluk çağı lösemisi olduğundan, çocukluk çağındaki risk artışından söz edilememiştir.(104-106).

De Roos ve arkadaşlarının nöroblastoma ve parental mesleksel elektromanyetik alana maruziyet konusunda yaptıkları vaka-kontrol çalışmasında anneleri RF yayan cihaz yanında çalışan nesillerde nöroblastom sıklığında hafif artış görülmüştür (107).

Groves ve arkadaşları, 1980 yılında Robinette ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmayı revize etmişlerdir. 20.021 Kore Savaşı Amerikan Deniz Donanması teknisyenleri ile daha az manyetik alana maruz kaldığı farzedilen diğer gaziler, RF maruziyeti ile ilişkili mortalite açısından kıyaslanmışlardır. Orijinal çalışmada RF maruziyetine bağlı yan etki bildirilmemiştir. Genişletilmiş 40 yıllık takip sonrasında yüksek doz maruziyet olanlarda, düşük doz maruz kalanlara göre beyin ve testis kanserinden ölüm riski daha düşük saptanmıştır. Yine yüksek doz maruziyetinde olanlarda sigara ile bağlantılı hastalıklardan ölümlerde belirgin azalma saptanmıştır. Yüksek doz maruziyet yaşayanların üçte birinde belirgin olarak non-lenfositik lösemi oranları artmıştır (108-109).

Kundi ve arkadaşlarının 2004 senesinde Amerika Birleşik Devletleri'nden dört (102,110-112), iki tane İsveç'ten (113,114) bir tane Finlandiya'dan (115), bir tane Danimarka'dan (116), bir tane Almanya'dan (117) olmak üzere cep telefonu ve kanser arasındaki ilişkiyi inceleyen dokuz yayını değerlendirmişlerdir. Bu çalışmaların çoğu beyin tümörü üzerine odaklansa da, tükürük bezi tümörleri, akustik nöromalar, hemopoietik ve lenfatik kanserler, intraoküler melanomlar ve diğer tümörler de dahil edilmiştir. Otörler bütün çalışmalarda mobil telefon kullanımının süre limitasyonu, maruziyet doz ölçümleri gibi nedenlerle eksiklikler olduğunu belirtmişlerdir. Ancak sonuç olarak cep telefonu kullanımı ile artmış kanser riski arasında kanıt olduğunu belirtmişlerdir (118).

IARC (International agency for research on cancer) radyofrekans- elektromanyetik alanı grup 2B olarak tanımlamıştır. Iarc klasifikasyonu aşağıdaki gibidir;

- Group 1 *Carcinogenic to humans*
- Group 2A *Probably carcinogenic to humans*
- Group 2B *Possibly carcinogenic to humans*
- Group 3 *Not classifiable as to its carcinogenicity to humans*
- Group 4 *Probably not carcinogenic to humans*

(IARC monographs)

Tablo 3. IARC (International agency for research on cancer)'ye göre ajanların sınıflandırılması

Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–108

CAS No	Agent	Group	Volume	Year
037319-17-8	Pentosan polysulfate sodium	2B	108	in prep
	Pickled vegetables (traditional in Asia)	2B	56	1993
000136-40-3	Phenazopyridine hydrochloride	2B	24, Sup 7	1987
000050-06-6	Phenobarbital	2B	79	2001
000077-09-8	Phenolphthalein	2B	76	2000
000063-92-3	Phenoxybenzamine hydrochloride	2B	24, Sup 7	1987
000122-60-1	Phenyl glycidyl ether	2B	47, 71	1999
000057-41-0	Phenytoin	2B	66	1996
105650-23-5	PhIP (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine)	2B	56	1993
	Polychlorophenols and their sodium salts (mixed exposures)	2B	53, 71	1999
003564-09-8	Ponceau 3R	2B	8, Sup 7	1987
003761-53-3	Ponceau MX	2B	8, Sup 7	1987
007758-01-2	Potassium bromate	2B	73	1999
000125-33-7	Primidone	2B	108	in prep
	Printing processes (occupational exposures in)	2B	65	1996
	Progestins	2B	Sup 7	1987
	Progestogen-only contraceptives	2B	72	1999
001120-71-4	1,3-Propane sultone	2B	4, Sup 7, 71	1999
000057-57-8	beta-Propiolactone	2B	4, Sup 7, 71	1999
000075-56-9	Propylene oxide	2B	60	1994
000051-52-5	Propylthiouracil	2B	79	2001
000089-82-7	Pulegone	2B	108	in prep
	Radiofrequency electromagnetic fields ¹	2B	102	2013
	Refractory ceramic fibres	2B	43, 81	2002
023246-96-0	Riddelliine	2B	10, Sup 7, 82	2002
000094-59-7	Safrole	2B	10, Sup 7	1987
	<i>Schistosoma japonicum</i> (infection with)	2B	61	1994
000132-27-4	Sodium <i>ortho</i> -phenylphenate	2B	73	1999
	Special-purpose fibres such as E-glass and '475' glass fibres	2B	81	2002
010048-13-2	Sterigmatocystin	2B	10, Sup 7	1987
018883-66-4	Streptozotocin	2B	17, Sup 7	1987
000100-42-5	Styrene	2B	60, 82	2002
000095-06-7	Sulfallate	2B	30, Sup 7	1987
000599-79-1	Sulfasalazine	2B	108	in prep

¹ Includes radiofrequency electromagnetic fields from wireless phones

Elbetieha ve arkadaşları, fareleri kontrol grubundaki manyetik alana maruz kalmamış partnerleri ile çiftleşene kadar 90 gün boyunca 50 Hz manyetik alana 25 mT'da maruz bırakmışlardır. Manyetik alana maruz bırakılan erkek farelerin testis, seminal vezikül, preputial bez ve vücut ağırlıklarında bir farklılık saptanmazken, dişilerde over ağırlığı belirgin artmış, vücut ve uterus ağırlıkları değişmemiş olarak bulunmuştur. Sonuç olarak farelerde, düşük doz manyetik alana maruziyetin, fertilité ve üreme üzerine olumsuz etkisi saptanmamıştır (119).

Daşdağ ve arkadaşları cep telefonlarından yayılan radyasyonun lipit profili, malonilaldehit düzeyleri, p53 immun reaktivite, sperm sayısı ve morfolojisi, testisin histolojik yapısı üzerine olan etkilerini araştırmak için yaptıkları bir çalışmada bu parametrelerde belirgin farklılık saptanmamıştır. Bu çalışma aynı zamanda maruziyetinin testiküler yapı ve fonksiyon üzerine olumsuz etkisi olmadığını göstermiştir (120).

Çocuk davranış problemlerini inceleyen iki bağımsız Danimarka çalışmasında, gebeliğinde cep telefonu kullanan annelerin, çocuklarında 7 yaş civarında davranışsal güçlükler belirttikleri sonucuna varılmıştır (121,122). Bu durumun arkasındaki mekanizma tam anlaşılacakla birlikte melatonin sekresyonu ile ilgili hipotez ileri sürülmüştür. Annenin çeneye yakın alanlarda cep telefonundan maruz kaldığı RF elektromanyetik alan unmyelinize hücrelerde sinyal iletimini değiştirerek, pineal bezde melatonin sekresyonunu etkilediği şeklinde hipotez ortaya atılmıştır. Melatoninin, maternal metabolizmada ve seks hormon düzenlenmesinde değişiklik yaparak fetal beyin gelişimini etkilediği düşünülmektedir (123). Ancak RF manyetik alanın melatonin sekresyonunu etkilediği gerek hayvan deneyleri gerekse insan çalışmalarında tartışmalıdır (124-126). Guxens ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise gebelikte maternal cep telefonu kullanımının 5 yaşındaki çocuklarda, anne veya öğretmen tarafından bildirilmiş davranışsal problemleri arttırmadığını bulmuşlardır (127).

III. BÖLÜM

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

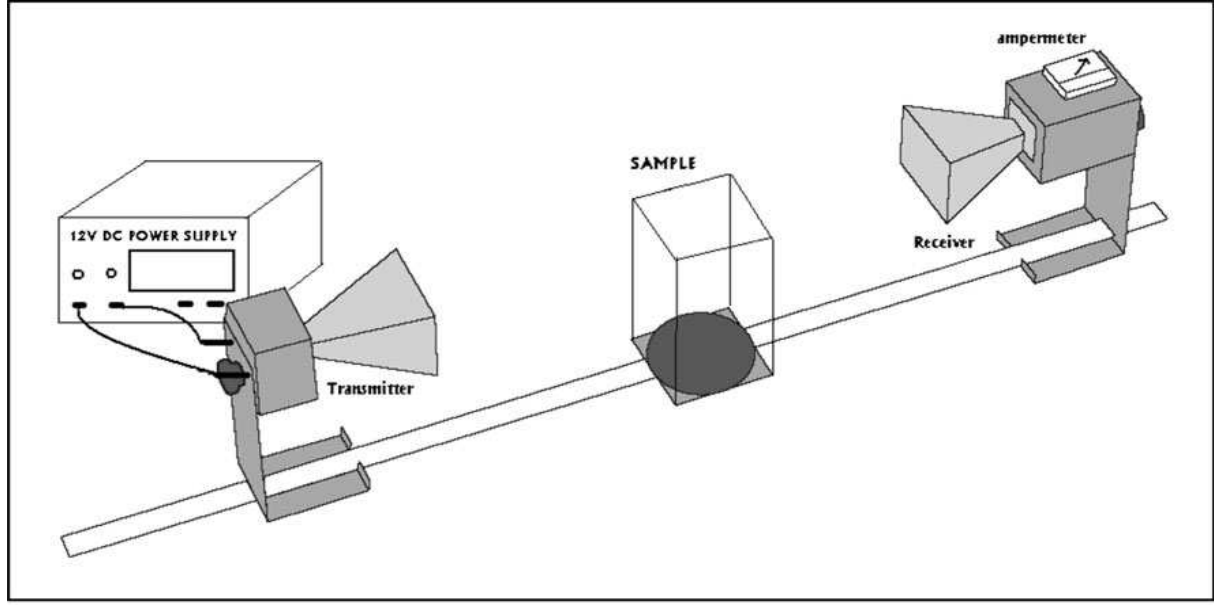
3.1. DENEY TASARIMI, FARE BEYİN DOKUSU ELDE EDİLMESİ

Bu deneysel çalışmada ağırlıkları 150-200 gr arasında olan gebe Balb/c fareleri kullanıldı. Bu farelerin bakımı Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarları'nda ücretsiz olarak sağlanmıştır. Tüm hayvanlar her birinde 8 fare (6 dişi, 2 erkek) olacak şekilde parmaklıklı kafeslere yerleştirilip, oda sıcaklığı 23-24°C'de tutularak hayvanların normotermik olmaları sağlanmıştır. Tüm hayvanlar standart fare yemi olan TARIŞ fare yemi ile beslenmiştir.

RF/mikrodalga etkisini oluşturmak için bir mikrodalga kaynağı kullanılmıştır. Bu sistem, manyetik alan oluşturabilecek başka bir kaynağın olmadığı boş bir test odasına kurulmuştur. Odadaki elektrik kaynaklarından kaynaklanan manyetik alan 0.021 W/kg olarak hesaplanmıştır. Kullanılan mikrodalga cihazı üç komponentten oluşmuştur.

- 1- 2.8 cm Mikrodalga vericisi (C051-044.672)
- 2- 2.8 cm Mikrodalga alıcısı (C052-0.45.674)
- 3- 12 V DC güç kaynağı (Cihazların hepsi UNILAB, Blackburn, UK).

Sinyal, 8.0mW güç çıkışıyla 10.715 GHz oskilatör frekansında kullanılmıştır. (128,129). Mikrodalga kaynağının ışın genişliği 6 cm ve örnek üzerine olan maruziyet 0,84 mW/cm² olarak belirlenmiştir. Ortalama SAR değeri 0,725 W/kg'dır. Elektromanyetik radyasyonun SAR değeri, semcad-x bilgisayar programı ile hesaplanmıştır. Deneyimizde seçilen SAR değerleri, mobil telefon sistemlerinin değerleri ile uyumlu olarak seçilmiştir. Sistem günde 12 saat açık kalacak şekilde farelerin gebelikleri boyunca çalıştırılmıştır.



MICROWAVE EQUIPMENT SETUP

Şekil 10. *Deney sisteminin şematik sunumu (101)*

Deneyde kullanılacak olan gebe fareler randomize olarak 2 gruba ayrılmıştır. Birinci grup, gebelikleri süresince radyo frekans dalgalarına maruz kalan farelerden doğan, 2. grup ise aynı ortamda bulunan fakat radyo frekans dalgalarına maruz kalmayan farelerden doğan yavru farelerden oluşmuştur ve doğumdan sonraki 24–48 saat içinde fare yavrularından elde edilen beyin dokusunun tamamı kullanılmıştır. Doğumdan sonraki 24–48 saat içinde, kontrol grubunda doğan 12, çalışma grubunda ise 29 albino fare yavrusuna intraperitoneal ketamin (50mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) anestezisi altında dekapitasyon yapıldıktan sonra beyin dokuları çıkartılmıştır.

Elde edilen fare beyin dokusundan total RNA, elde edilen total RNA'lar cDNA'ya dönüştürülerek - 80 °C'de çalışma zamanına kadar saklanmıştır. Nöronal migrasyonda görevli olduğu bilinen 7 genin (DCX, TUBA1A, YWHAE, ARX, RELN, LARGE, FLNA) Real-time PCR ile ekspresyonları gösterilmiştir.

3.2. FARE BEYİN DOKUSUNDAN cDNA SENTEZİ

Total RNA izolasyonunda Roche Magna Lyser homojenizatör aletinden faydalanılarak, elde edilen beyin parçalarından RNA eldesi işlemine başlamadan önce dokuların homojenize olması sağlanmıştır.

Denek farelerden işlem sırasında çıkarılan beyin parçaları cryo tüplere alınıp sıvı azot tankına anında aktarılmış ve işlemi takiben kısa bir süre içerisinde RNA izolasyonu uygulanmıştır.

3.2.1. Total RNA İzolasyonu

- 1-Başlangıç miktarı olarak 100 mg parça alındı
- 2-Bu parça 1000 µl'lik ependrofa alınıp, üzerine 1 ml Tripure solusyonu eklendi.
- 3- 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 4- 0,2 ml kloroform eklenip,15 sn kadar elde alt üst edilerek çalkalandı.
- 5- Oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edildi. Daha sonra 12.000 rpm'de15 dk, +4°de santrifüj edildi.
- 6- Supernatant temiz bir tüpe transfer edildi ve üzerine 0,5 ml isopropanol eklendi.
- 7- Oda sıcaklığında inkübe edildi ve 12.000 rpm de 15 dk,+4°de santrifüj edildi.
- 8- Supernatant atıldı, dipteki pellet 1 ml %75'lik etanol eklenmesi ile resüspanse edildi.
- 9-10.000 rpm'de, 5 dk, +4° C' de santrifüj edildi.
- 10- Dipte kalan pellet kurutulduktan sonra üzerine su eklenip resüspanse edilip, cDNA işlemi için bekletmeden kullanıldı. Kullanılmayan miktarı ise -80°C 'ye kaldırıldı.

3.2.2. Total RNA Miktarının Ölçümü ve Kalite Kontrolü

İzolasyon sonrası elde edilen total RNA konsantrasyonu sonuçları spektrofotometrede ölçüldü. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlendi. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanlarının oranı ile kontrol edildi; ideal saflıktaki kaliteli RNA'nın A260/A280 absorban oranının 1,8-2,0 olması beklenmektedir. Spektrofotometrik ölçümün yanı sıra RNA degradasyonunun kontrolü agaroz jel elektroforeziyle gerçekleştirilmiştir. Genel olarak reaksiyon başına 5ng total RNA'nın ortalama düzeyde ifade edilen mRNA tespitinde yeterli olacağı düşünülmektedir. Buna bağlı olarak gen ekspresyonu bakılacak materyalin özelliğine bağlı olarak RNA miktarı reaksiyon başına 5ng ile 5 µg arasında olmalıdır.

3.2.3. Tek Sarmal cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti kullanılmıştır. Her örnek için RNA+H₂O'dan 11 µl kondu ve 2 µl Random hexamer primer (vial 6) eklendi. (RNA miktarı yeterli ise örnek başına 3 seri cDNA sentezi yapılabilir. Bu üç cDNA sulandırılarak, array aşamasına devam edilebilir)

RNA örneği	11 µl
Random hexamer primer (vial 6)	2 µ
Toplam	13 µl

Tüpler thermalcycler'a yerleştirildi ve 65 °C' de 10 dk RNA'lar denatüre edildi.

Bu arada mastermix hazırlandı. (Bu miktarlar örnek sayısıyla çarpılarak hazırlanır)

Tek Reaksiyon için

Reaction Buffer (vial 2)	4 µl
Protector RNase Inhibitor (vial 3)	0,5 µl
Deoxynucleotide Mix (vial 4)	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase (vial 1)	0,5 µl
Toplam	7 µl

Thermalcycler'dan alınan örnekler soğutma kabına yerleştirildi. Her tüpe 7 µl hazırlanan karışımdan dağıtıldı ve pipetle 3-4 kez karıştırıldı. Tüpler thermal cycler'a yerleştirildi ve aşağıdaki hazırlanmış program çalıştırıldı:

25 °C'de	10 dk
50 °C'de	60 dk
85 °C'de	5 dk
4 °C'de	1 dk bekleme

Bu işlem sonucunda elde edilen cDNA buza alındı, hemen kullanılmayan örnekler de -80°C'de saklandı.

3.3. REAL-TIME PCR (GERÇEK ZAMANLI PZR)

Her 2 fare grubundan elde edilen beyin dokularından elde edilen total RNA ve cDNA sentezini takiben, nöronal migrasyonda görevli olduğu bilinen DCX, TUBA1A, YWHAЕ, ARX, RELN, LARGE, FLNA genlerinin ekspresyonlarını göstermek amacıyla real-time PCR yöntemi kullanılmıştır.

Real-time kantitatif RT-PCR analizleri LightCycler 480 (Roche) cihazı ve yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Glisiraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve actin beta, ekspresyon analizinde değerlendirilmek üzere referans genler (housekeeping gen) olarak seçildi.

Real-time yöntemi şu şekilde gerçekleştirildi:

Elde edilen cDNA'lar 96'lık plakada spesifik primer ve probalar ile reaksiyona girerek hedeflenen RNA ekspresyon düzeyi belirlemede kullanıldı. RealTime Ready çalışmasında yer alan referans gen PCR kontrolü görevinin yanı sıra araştırılan genin ekspresyonunun rölatif kantitasyonda kullanılır. Tek bir cDNA örneği için hem hedef hem referans gen ekspresyonunun bakılabildiği RealTime Ready çalışmasında, reaksiyon başına cDNA ile birlikte final hacmi 25 µl olacak şekilde, 96 reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı.

ddH ₂ O	528 µl
LightCycler 480 Probe Master	1056 µl
<hr/>	
Toplam hacim	1684 µl

Elde edilen bu karışım dikkatlice pipetlendi; hiçbir şekilde vorteks yapılmadı. Daha sonra kuyucuk başına 20 µl olacak şekilde dağıtıldı. Elde edilen cDNA, konsantrasyonu 5ng-5 µg/plate olacak şekilde en az 480 µl'ye sulandırıldı. Dilüe edilmiş cDNA örneği RNA negatif kontrol olan H12 kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara 5'er µl dağıtıldı. H12 kuyucuğuna negatif kontrol olarak 5 µl RNA eklendi. Plaka sealing foil ile kapatıldı ve kuyucukların kenarına yapışmış olabilecek damlacıkların inmesi için 1500g'de 2 dakika santrifüj edildi.

RealTime Ready panelin çalışabilmesi için gerekli olan PCR koşulları aşağıda belirtilmiştir:

Denaturasyon 1 döngü

95⁰C 10 dakika

Amplifikasyon 45 döngü

95⁰C 10 saniye

60⁰C 30 saniye

72⁰C 1 saniye Her 72⁰C'de single floresan okuma yapılmalıdır.

Cooling 1 döngü

40⁰C 30 saniye

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

LightCycler 480 yazılımı data analizi, second derivative ya da fit point metodu ile gerçekleştirildi. Bu yöntem, plaka üzerindeki referans genlerin ekspresyonu ile Dcx, Tuba1a, Ywhae, Arx, Reln, Large, Flna genlerinin ekspresyonlarının rölatif kantitasyonu için kullanılır. Elde edilen gen ekspresyon sonuçları için rölatif kantitasyon yapılabilmek için Δ/Δ Ct metodu kullanıldı. Bu metod ile gen ekspresyonu Ct değerleri ACTB house keeping (referans geni) ile normalize edildi (bu değer Δ Ct olarak geçer) ve gruplar birbirleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuç Δ/Δ Ct'yi verdi. Kat değişimleri de $2^{-\Delta/\Delta}$ Ct değeri üzerinden hesaplandı. Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirmesi de student's t-testi kullanılarak yapıldı.

IV. BÖLÜM

4. BULGULAR

Bu çalışmada 12 kontrol yeni doğan fare ile 29 gebeliklerinde manyetik alana maruz kalmış farelerden yeni doğan fareler kullanılmıştır. Tüm hayvanlar her birinde 8 fare (6 dişi, 2 erkek) olacak şekilde parmaklıklı kafeslere yerleştirilip, oda sıcaklığı 23-24°C'de tutularak hayvanların normotermik olmaları sağlanmıştır. RF/mikrodalga etkisini oluşturmak için bir mikrodalga kaynağı kullanılmıştır. Mikrodalga kaynağının ışıma genişliği 6 cm ve örnek üzerine olan maruziyet 0,84 mW/cm² olarak belirlenmiştir. Ortalama SAR değeri 0,725 W/kg'dır. Elektromanyetik radyasyonun SAR değeri, semcad-x bilgisayar programı ile hesaplanmıştır. Sistem günde 12 saat açık kalacak şekilde farelerin gebelikleri boyunca çalıştırılmıştır. Doğumdan sonraki 24-48 saat içinde, her iki grupta yenidoğan albino fare yavrularına intraperitoneal ketamin (50mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) anestezisi altında dekapitasyon yapıldıktan sonra beyin dokuları çıkartılmıştır. Elde edilen fare beyin dokusundan total RNA elde edilerek miktar ve kalite kontrolü yapılmıştır (Tablo 4). Elde edilen total RNA'lar ortalama 588,8 ng/ml değerindeydi.

Tablo 4: Çalışma ve kontrol gruplarında RNA derişimleri ve saflık oranları

ÇALIŞMA GRUBU		
Olgu No	RNA ng/ml	A260/280
Ç1	282	2,00
C2	330	1,93
C3	394	1,97
C4	590	1,83
C5	402	1,86
C6	265	2,00
Ç7	597	1,81
C8	415	1,79
C9	450	1,81
C10	614	1,82
C11	588	1,87
C12	765	1,80
C13	553	1,88
C14	765	1,67
C15	553	1,86
C16	722	1,73
C17	890	1,62
C18	687	2,00
C19	813	1,93
C20	800	1,90
C21	772	1,83
C22	868	1,81
C23	65	2,00
C24	247	2,00
C25	658	1,68
C26	311	1,86
C27	228	2,00
C28	550	1,82
C29	184	1,83

Tablo 4: Çalışma ve kontrol gruplarında RNA derişimleri ve saflık oranları (Devam)

KONTROL GRUBU		
Olgu No	RNA ng/ml	A260/280
K1	825	1,88
K2	951	1,82
K3	928	1,83
K4	712	1,83
K5	804	1,86
K6	542	1,83
K7	805	1,81
K8	230	1,73
K9	430	1,77
K10	1043	1,72
K11	386	1,87
K12	722	1,91

Yukarıda belirtilen istatistiksel analizlerin uygulanması sonucunda analizi yapılan 7 genin 5'inde ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Bu genler ARX, DCX, LARGE, RELN ve YWHAЕ genleri idi (Tablo 5).

Tablo 5. Gen ekspresyonlarında artış, Log₂ transformasyon ve p değerleri

GEN	2-(DCt)		KAT DEĞİŞİMİ	Log₂*	P
	Çalışma grubu	Kontrol grubu			
ARX	0,040834	0,001947	20,9695	4,390221*	0,000003
DCX	0,371139	0,026305	14,1092	3,818564*	0,000016
FLNA	0,045839	0,012228	3,7486	1,906352	0,000049
LARGE	0,014608	0,000944	15,4705	3,951448*	0,000001
RELN	0,049636	0,003006	16,5127	4,045504*	0,000053
TUBA	4,664296	1,894193	2,4624	1,300065	0,00005
YWHAЕ	0,133256	0,019325	6,8956	2,785676*	0,000047

* Log₂ transformasyonu sonucunda ± 2 kat değişim anlamlı kabul edildi.

V. BÖLÜM

5. TARTIŞMA

Teknoloji alanında ortaya çıkan yenilikler, insan yaşamını son derece kolaylaştırmakla birlikte; bu yeniliklerin sebep olduğu bazı etkiler insanın biyolojik yapısını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Özellikle elektrikli alet kullanımının insan yaşamının vazgeçilmez bir parçası haline gelmesi, bu aletlerin yaydığı manyetik alanın etkilerinin de araştırılması gereğini ortaya koymuştur. Başta cep telefonları olmak üzere kablosuz araçlar, yediden yetmiş herkesin kullanım alanına girmiştir. Bu nedenle bu cihazların biyolojik etkileri ile ilgili çok geniş bir alanda çalışmalar yapılmıştır. Radyofrekans dalgalarının malignite üzerine olan etkileri (83,91-97,102-107), hücre proliferasyonu üzerine olan etkileri (84-85), melatonin ve benzeri hormon salınımı üzerine olan etkileri (87-88), DNA zincir kırıklarıyla olan ilişkisi (90), apoptoz üzerine etkisi (99-101), erkek fertilitesi üzerine olan etkileri (120) ve davranış üzerine olan etkileri ile ilgili (121,122,127) ile ilgili daha önce de bahsedilen çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu cihazların baş-boyun bölgesine yakın kullanılması nedeniyle, yaydığı radyofrekans dalgalarının sinir sistemi üzerine olan etkilerini ortaya koymayı amaçlayan çalışmalar da bunlar arasındadır. Ancak bu çalışma, radyofrekans dalgalarının nöronal migrasyon anomalilerine yol açan genler üzerine olan etkilerini ortaya koyan literatürdeki ilk çalışmadır.

Santral sinir sisteminin gelişimi oldukça kompleks bir süreçtir ve bu organizasyon içinde nöronal migrasyon da önemli bir yer tutar. Nöronal migrasyon, sinir hücrelerinin köken aldığı bölgeden son yerleşim bölgeleri olan ventriküler ve subventriküler zonlara göç etmesi olarak tanımlanır. Bu süreçte zamanlama ve yönelim çok iyi programlanmıştır. Kalıtsal genetik hatalar ya da dış faktörler, bu programı bozarak nöronal migrasyon problemlerine yol açabilir (130). Bu çalışmada günlük hayatta cep telefonu ya da diğer elektromanyetik alan oluşturan cihazlar nedeniyle maruz kalınan dozlarda radyofrekans maruziyetinin, daha önce literatürde nöronal migrasyon ile ilişkisi gösterilmiş genler üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

ARX geni (aristaless related homeobox gene) X kromozomunun kısa kolunda 21.3 pozisyonunda yer alır (Xp21.3). *ARX* geni homeobox ailesine ait bir gendir ve birçok organın embriyolojik dönemde oluşumunu kontrol eder. Bu organlar arasında testis, pankreas, iskelet kası ve beyin yer alır (27). Mutant sıçanda, kortikogenez sırasında ortaya çıkan patolojilerden sorumlu tutulmuştur (26). Friocourt ve ark. *ARX* geninin kortikal progenitor hücrelerin hücre

döngüsü regülasyonunda; piramidal nöronların radial migrasyonu ve morfolojisinde ayrıca ara nöronların ventral telensefalondan teğetsel migrasyonunda rol oynadığını göstermişlerdir (131). ARX proteini bir transkripsiyon faktörüdür ve bu çalışmada, radyofrekans dalgalarına maruz kalan embriyoların beyinlerinde maruz kalmayan embriyolara göre, ARX ekspresyonlarının anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir.

DCX (doublecortin) geni, X kromozomunun uzun kolunda, 22.3-23 pozisyonları arasında (Xq22.3-23) yer alır. Bu gen doublecortin proteini üzerinden etki eder. Doublecortin proteini sitozoldeki mikrotübüllere bağlanır ve bunların stabilizasyonunu sağlar. Mikrotübüller, hücre için iskelet oluşturur ve bu hücreleri belli bir yönde ilerlemesini sağlarlar (132). Matsumoto ve ark. *DCX* genindeki mutasyonların, kortikal gelişimde lissensefali ve subkortikal band heterotopisi gibi nöronal migrasyon anomalilerine yol açtığını göstermişlerdir (133). Jang ve arkadaşları nöronal migrasyon anomalilerinde *DCX* gen mutasyonunu “whole exome sequencing” yöntemiyle de göstermişlerdir (134). Mevcut çalışmada, *DCX* gen ekspresyonu manyetik alana maruz kalan sıçanların embriyolarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır.

FLNA (filamin A, alpha) geni, Xq28 üzerinde yerleşmiştir. *FLNA* geni, filamin A proteini üzerinden işlev görür. Bu protein hücre iskeleti için protein filamanları oluşturarak hücrenin şeklinin oluşmasına ve hareketine yardımcı olur. Aktin proteini üzerine bağlanarak, ayrıca bu protein üzerine başka moleküllerin de bağlanmasını sağlayarak, iskelet sistemi ve beyin gelişimini regüle eder. Kan damarı ve pıhtı oluşumunda görev alır (135). X-linked bilateral periventriküler nodüler heterotopi olgularının %100’ünde, sporadik olguların ise %26’sında *FLNA* gen mutasyonu tespit edilmiştir (24,136). Carabalona ve ark, embriyonik dönemde var olan *FLNA* defektinin üst intermediate zonda radial glia organizasyonunu etkileyerek radial migrasyonu ve nöronal oryantasyonu bozduğunu göstermişlerdir (137). Mevcut çalışmada *FLNA* gen ekspresyonu, manyetik alana maruz kalan sıçanların fetuslarında daha yüksek saptanmıştır ancak bu anlamlılık \log_2 transformasyonunda istenen düzeye ulaşmamıştır.

LARGE (like-glycosyltransferase) geni, 22q12.3 üzerinde yerleşmiştir. Bu gen α -dystroglikan proteinine xylose ve glukoronik asid moleküllerinin eklenmesinde görev alır. α -dystroglikan proteini, hücre iskeletinde ve ekstraselüler matrikste yer alır. İskelet kasında, kas liflerinin stabilizasyonunu ve korunmasını sağlar. Beyinde ise erken gelişim döneminde nöronların migrasyonunda görev alır (138). Qu ve Smith, *LARGE* genindeki defektin korteks

ve serebellumdaki radial migrasyon yolağını etkilediğini göstermişlerdir (139). Daha sonra yapılan bir çalışmada ise yine Qu, *LARGE* gen mutasyonu taşıyan sıçanlarda, özellikle anterior ektramural sistem için kullanılan preserebellar nukleus oluşumunda teğetsel migrasyonda da defekt oluştuğunu saptamıştır (140). Bu çalışmada da manyetik alana maruz kalan embriyolarda, *LARGE* gen ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

RELN geni reelin proteinini kodlar ve nöronal migrasyonu kontrol eden yolları aktive eder. 7. kromozomun uzun kolunda 22. pozisyonda bulunur. Reelin proteini Cajal-Retzius hücrelerinden salgınır ve erken kortikal gelişim safhasında kritik öneme sahiptir. Serebellar hipoplazi ile birlikte olan lissensefali (LCH)'nin otozomal resesif formu *RELN* gen mutasyonu ile ilişkili bulunmuştur (141). LCH hastalarında klinik olarak gelişme geriliği, hipotoni, ağır ataksi, epileptik nöbetler, diffuz pakigiri, hippokampal displazi ve hipoplastik serebellum ve beyin sapı bulunur. Chang ve ark. benzer bir hasta grubunda reelin serum ekspresyonunun olmadığını göstermişlerdir (142). Mevcut çalışmada, *RELN* gen ekspresyonu, manyetik alana maruz kalan sıçan embriyolarında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.

TUBA1A geni (tubulin, alpha 1a) α -tubulin proteinini kodlar, 12q13.12 üzerinde bulunur. α -tubulin proteini, mikrotübülleri oluşturan tubulin protein ailesine aittir. Bu protein, en çok gelişmekte olan beyinde bulunur. Mikrotübül içerisinde, bir uçtan diğer uca göç ederek nöronun bu doğrultuda hareket etmesini sağlar ve böylece nöronal migrasyonda görev alır (143). *TUBA1A* gen mutasyonuna sahip hastaların fenotipik özellikleri tam olarak karakterize edilmiş değildir. Bu hastalar genelde mikrosefalik, dismorfik görünümde, strabismus ve fasial diplejileri olan hastalardır (144). Sohal ve ark.'nın hazırladığı bir derlemede, *TUBA1A* mutasyonu bulunan hastalarda, beyin anterior bölgesinde, nöronal migrasyon anomalilerinin daha ağır seyrettiği belirtilmiştir (144). Mevcut çalışmada *TUBA1A* gen ekspresyonu, manyetik alana maruz kalan sıçanların fetuslarında istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır ancak bu anlamlılık \log_2 transformasyonunda istenen düzeye ulaşmamıştır.

YWHAE geninin diğer adı "tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide" genidir. 14-3-3 epsilon (ϵ) proteinini kodlar ve 17p13.3 lokusu üzerinde bulunur. Bu proteinin insülin duyarlılığında ve hücre bölünmesinde rolü vardır. Ayrıca normal beyin gelişimi ve nöronal migrasyon üzerine etkilidir (145). Miller-Dieker sendromu, *YWHAE* gen bölgesini de içine alan 17. kromozomun kısa kolunun uca yakın bölgesinde meydana gelen delesyon sonucu ortaya çıkar. Buna bağlı 14-3-3 epsilon

(ε) protein miktarındaki azalma, lissensefaliye sebep olur (146). Mignon-Ravix ve ark. çalışmasında da, YWHAE gen delesyonunda periventriküler heterotopi ve korpus kallozum hipoplazisi olduğu gösterilmiştir (147). Bizim çalışmamızda, YWHAE gen ekspresyonunun, manyetik alana maruz kalan sıçan embriyolarında istatikselsel olarak anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir.

VI. BÖLÜM

6. SONUÇ

Manyetik alan maruziyeti, günlük hayatın kaçınılmaz bir sonucudur. Günlük kullanıma girmiş tüm elektrikli aletler, çevrelerinde belirli oranlarda elektromanyetik alan oluşturmaktadır. Bu durumun insan üzerine, hatta anne karnındaki fetüs üzerine etkileri herkes için merak konusudur. Mevcut çalışma, günlük hayatta maruz kalınan dozlarda manyetik alanın, anne karnındaki fetusun nöronal migrasyonu üzerine etkisini deneysel olarak gösteren literatürdeki ilk çalışmadır. Prospektif randomize kontrollü çalışma olması nedeniyle son derece kıymetli bir çalışmadır. Nöronal migrasyon anomalisine yol açtığı bilinen genlerin ekspresyonlarındaki artışın saptandığı bu çalışma, düşük dozda manyetik alanın bile gebe sıçanların fetuslarında etkilenme olduğunu göstermiştir. Gen ekspresyonlarındaki bu artış, vücudun bu anomalinin ortaya çıkmasını engellemek amacıyla geliştirdiği bir savunma mekanizması olarak yorumlanmalıdır. Nöronal migrasyon anomalisine yol açan radyofrekans dozu ve maruziyet süresini belirlemek için yeni ve daha geniş olgu içeren randomize prospektif kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca bu çalışma, manyetik alanın anne karnındaki fetuslar için de etkilenme yaratabileceğini, bu nedenle gebelik sırasında maruziyeti azaltmak için korunma önlemleri alınmasının gerekliliğini ortaya koymuştur.

VII. BÖLÜM

7. ÖZET

Amaç: Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte, manyetik alan maruziyeti canlılar için kaçınılmaz bir sonuç olmuştur. Bu çalışmada, günlük hayatta maruz kalınan dozlarda radyofrekansa tabi tutulan gebe sıçanların fetuslarında, nöronal migrasyona etki ettiği bilinen genlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler incelenmiştir.

Yöntem ve Gereçler: Her birinde 6 dişi, 2 erkek fare olan iki grup 150-200 gr arasında gebe Balb/c fareleri kullanılmıştır. Çalışma grubu, doğum yapan dek günde 12 saat, ortalama spesifik absorpsiyon hızı (specific absorption rate-SAR) değeri 0,725 W/kg olan radyofrekans alana maruz bırakılmıştır. Doğum sonrası fare yavrularından alınan beyin dokusundan total RNA elde edilmiştir; elde edilen total RNA'lar da cDNA'ya dönüştürülerek nöronal migrasyonda görevli olduğu bilinen 7 genin (DCX, TUBA1A, YWHAE, ARX, RELN, LARGE, FLNA) Real-time PCR ile ekspresyonları gösterilmiştir.

Bulgular: Analizi yapılan 7 genin 5'inde ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Bu genler ARX, DCX, LARGE, RELN ve YWHAE genleri idi

Sonuç: Nöronal migrasyon anomalisine yol açtığı bilinen genlerin ekspresyonlarındaki artışın saptandığı bu çalışma, düşük dozda manyetik alanın bile gebe sıçanların fetuslarında etkilenme olduğunu göstermiştir. Gen ekspresyonlarındaki bu artış, vücudun bu anomalinin ortaya çıkmasını engellemek amacıyla geliştirdiği bir savunma mekanizması olarak yorumlanmalıdır. Ayrıca bu çalışma, manyetik alanın anne karnındaki fetuslar için de etkilenme yaratabileceğini, bu nedenle gebelik sırasında maruziyeti azaltmak için korunma önlemleri alınmasının gerekliliğini ortaya koymuştur.

VIII. BÖLÜM

8. KAYNAKLAR

1. Kandel E. Principles of Neural Science. 4th edition. USA: McGraw Hill Companies; 2000: pp 1192-1197
2. Kara S, Jissendi-Tchofo P, Barkovich AJ. Developmental differences of the major forebrain commissures in lissencephalies. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010 Oct; 31(9):1602–7.
3. Liu JS. Molecular Genetics of Neuronal Migration Disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* (2011) 11:171–178
4. Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RAM, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, immediate progenitor cells and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* 2005;25, 247–251.
5. Nakata T, Hirokawa N. Neuronal polarity and the kinesin superfamily proteins. *Sci STKE* 2007;2007: pe6
6. McKenney RJ, Vershinin M, Kunwar A, et al.: LIS1 and NudE induce a persistent dynein force-producing state. *Cell* 2010 Apr 16; 141(2): 304–14. This study describes the molecular role of LIS1, the first causative gene identified for lissencephaly.
7. Lo Nigro C, Chong CS, Smith AC, et al. Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 1997;6: 157–64
8. Chong SS, Pack SD, Roschke AV, et al. A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Hum Mol Genet* 1997;6: 147–55.
9. Deuel TA, Liu JS, Corbo JC, et al. Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron* 2006;49: 41–53.
10. Moores CA, Perderiset M, Kappeler C, et al. Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton. *EMBO J* 2006; 25: 4448–57.
11. Moores CA, Perderiset M, Francis F, et al. Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol Cell* 2004; 14: 833–9.
12. Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat. Neurosci* 2003;6, 1277–1283.

13. Guerrini R, Parrini E. Neuronal migration disorders. *Neurobiology of Disease* 2010; 38;154–166
14. Saillour Y, Carion N, Quelin C, et al. LIS1-related isolated lissencephaly: spectrum of mutations and relationships with malformation severity. *Arch Neurol* 2009;66: 1007–15.
15. Niethammer M, Smith DS, Ayala R, et al. NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron* 2000;28: 697–711.
16. Tanaka T, Serneo FF, Tseng HC, et al. Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* 2004;41: 215–27.
17. Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 1999: 24, 481–489.
18. Assadi, A.H., Zhang, G., Beffert, U., McNeil, R.S., Renfro, A.L., Niu, S., Quattrocchi, C.C., Antalffy, B.A., Sheldon, M., Armstrong, D.D., Wynshaw-Boris, A., Herz, J., D'Arcangelo, G., Clark, G.D. Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat. Genet.* 2003: 35, 270–276.
19. Keays DA, Tian G, Poirier K, et al.: Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell* 2007;128: 45–57. This is the first description of a tubulin mutation as a causative gene for lissencephaly.
20. Bahi-Buisson N, Poirier K, Boddaert N, et al.: Refinement of cortical dysgenesis spectrum associated with TUBA1A mutations. *J Med Genet* 2008;45: 647–53. This study expands the phenotype of the new tubulin isoform mutations causing lissencephaly.
21. Sheen VL, Jansen A, Chen MH, et al.: Filamin A mutations cause periventricular heterotopia with Ehlers-Danlos syndrome. *Neurology* 2005;64: 254–62
22. Barkovich, A.J., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D., Guerrini, R., Dobyns, W.B. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology* 2005: 65, 1873–1887.
23. Hannan, A.J., Servotte, S., Katsnelson, A., Sisodiya, S., Blakemore, C., Squier, M., Molnár, Z. Characterization of nodular neuronal heterotopia in children. *Brain* 1999: 122, 219–238.
24. Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns WB, et al. Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain* 2006;129: 1892–906.
25. Guerrini R, Mei D, Sisodiya S, et al.: Germline and mosaic mutations of FLN1 in men with periventricular heterotopia. *Neurology* 2004;63: 51–6.

26. Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, et al. Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet* 2002;32: 359–69.
27. Shoubridge C, Fullston T, Gecz J. ARX spectrum disorders: making inroads into the molecular pathology. *Hum Mutat* 2010;31: 889–900.
28. Guerrini R, Moro F, Kato M, et al.: Expansion of the first PolyA tract of ARX causes infantile spasms and status dystonicus. *Neurology* 2007;69: 427–33.
29. Marsh E, Fulp C, Gomez E, et al.: Targeted loss of Arx results in a developmental epilepsy mouse model and recapitulates the human phenotype in heterozygous females. *Brain* 2009;132: 1563–76. The animal model of ARX mutations shows defects in interneuron migration.
30. Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sorensen J, et al.: Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* 2003;17: 2591–603.
31. Peyrard, M., Seroussi, E., Sandberg-Nordqvist, A., Xie, Y., Han, F., Fransson, I., Collins, J., Dunham, I., Kost-Alimova, M., Imreh, S. et al. The human LARGE gene from 22q12.3-13.1 is a new distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999: 96, 598–603
32. Longman C, Brockington M, Torelli S, et al. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. *Human Molecular Genetics*, 2003; 12(21): 2853-61.
33. Dobyns WB, Reiner O, Carrozzo R et al. Lissencephaly: a human brain malformation associated with deletion of the LIS 1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA* 1993; 270: 2838-42.
34. Dobyns WB, Truwit CL. Lissencephaly and other malformations of cortical development: 1995 Update. *Neuropediatrics* 1995; 26: 132-47.
35. Barkovich AJ. Anomalies of Neuronal Migration and Organization. Barkovich AJ editor. *Pediatric Neuroimaging icinde*. 3. baskı. Philadelphia: Maple Press (Lippincott Williams & Wilkins); 2000; s. 251-381.
36. Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 2011; 146: 18–36.
37. Sahara S, O’Leary DD. FGF10 regulated transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron* 2009; 63: 48–62.
38. Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 704–9.

39. Kang W, Wong LC, Shi S-H, Hebert JM. The transition from radial glial to intermediate progenitor cell is inhibited by FGF signaling during corticogenesis. *J Neurosci* 2009; 29: 14571–80.
40. Kriegstein A, Noctor S, Martinez-Cerden˜ o V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 883–90.
41. Kalay E, Yigit G, Aslan Y, Brown KE, Pohl E, Bicknell LS, et al. CEP152 is a genome maintenance protein disrupted in Seckel syndrome. *Nat Genet* 2011; 43: 23–6.
42. Wynshaw-Boris A. Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clin Genet* 2007; 72: 296–304.
43. Ferland RJ, Batiz LF, Neal J, Lian G, Bundock E, Lu J, et al. Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 497–516.
44. Pramparo T, Youn YH, Yingling J, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A. Novel embryonic neuronal migration and proliferation defects in *Dcx* mutant mice are exacerbated by *Lis1* reduction. *J Neurosci* 2010; 30: 3002–12.
45. Poirier K, Keays DA, Francis F, Saillour Y, Bahi N, Manouvrier S, et al. Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). *Hum Mutat* 2007; 28: 1055–64.
46. Abdollahi MR, Morrison E, Sirey T, Molnar Z, Hayward BE, Carr IM, et al. Mutation of the variant [alpha]-tubulin TUBA8 results in polymicrogyria with optic nerve hypoplasia. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 737–44.
47. Jaglin XH, Chelly J. Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet* 2009; 25: 555–66.
48. Kumar A, Girimaji SC, Duvvari MR, Blanton SH. Mutations in *STIL*, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 286–90.
49. Poirier K, Saillour Y, Bahi-Buisson N, Jaglin XH, Fallet-Bianco C, Nabbout R, et al. Mutations in the neuronal beta-tubulin subunit *TUBB3* result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 4462–73.
50. Barkovich A., Guerrini R., Kuzniecky I., Jackson G., Dobyns W. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain* 2012; 135: 1348–1369.
51. Barkovich AJ. *Congenital Malformation of the Brain and Skull*. Barkovich AJ editor. *Pediatric Neuroimaging icinde*. 4. Baskı. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005; s. 291-439.

52. Packard AM, Miller VS, Delgado MR. Schizencephaly: Correlations of clinical and radiologic features. *Neurology* 1997; 48: 1427-34.
53. Yapıcı Z, Canbay-Kabay S, Gursoy G ve ark. Serebral kortikal gelişim malformasyonları. 37. Ulusal Noroloji Kongresi, 31 Ekim-4 Kasım 2001, Kemer, Antalya.
54. Sener RN. Septo-optic dysplasia associated with cerebral cortical dysplasia. *J Neuroradiol* 1996; 23: 245-7.
55. Granata T, Battaglia G, D'Incerti L et al. Schizencephaly: Neuroradiologic and epileptologic findings. *Epilepsia* 1996; 37: 1185-93.
56. Guerrini R, Carrozzo R. Epilepsy and genetic malformations of the cerebral cortex. *Am J Med Genet* 2001; 106: 160-73.
57. Denis D, Chateil JF, Brun M et al. Schizencephaly: Clinical and imaging features in 30 infantile cases. *Brain Dev* 2000; 22: 475-83.
58. Richardson MP, Koepp MJ, Brooks DJ et al. Cerebral activation in malformations of cortical development. *Brain* 1998; 121: 1295-304.
59. Jay V, Becker LE, Otsubo H et al. Pathology of temporal lobectomy for refractory seizures in children. Review 20 cases including some unique malformative lesions. *J Neurosurgery* 1993; 79: 53-61.
60. Janota I. Cortical Dysplasia in Surgical Specimens. Guerrini R, Andermann E, Canapicci R, Roger J, Zifkin B, Pfanner P editörler, *Dysplasia of Cerebral Cortex and Epilepsy* içinde. 1.baskı. Philadelphia: Lippincott- Raven; 1996; s. 53-5.
61. Maehara T, Schimizu H, Yagishita A et al. Interictal hyperperfusion observed in infants with cortical dysgenesis. *Brain Dev* 1999; 21: 407-12.
62. Cardoso C, Leventer RJ, Matsumoto N et al. The location and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the LIS1 gene. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 3019-28.
63. Dobyns WB, Elias ER, Newlin AC et al. Causal heterogeneity in isolated lissencephaly. *Neurology* 1992; 42: 1375-88.
64. Dobyns WB, Truwit CL, Ross ME et al. Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17 linked and X-linked lissencephaly. *Neurology* 1999; 53: 270-7.
65. Pfund Z, Cugani HT, Juhasz C et al. Lissencephaly. *Neurology* 2000; 55: 1683-8.
66. Pilz DT, Quarrell QWJ. Syndromes with lissencephaly. *J Med Genet* 1996; 33: 319-23.
67. Falconer J, Wada J, Martin W et al. PET, CD and MRI imaging of neuronal migration anomalies in epileptic patients. *Can J Neurol Sci* 1990; 17: 35-39.

68. Yapıcı Z. Cerebral Cortical Developmental Malformations in Childhood: A General Approach. *Archives of Neuropsychiatry* 2008; 45: 135-41.
69. Raymond AA, Fish DR, Stevens JM et al. Subependymal heterotopia: A distinct neuronal migration disorder associated with epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 1195-202.
70. Barkovich AJ, Kuzniecky RI. Gray Matter Heterotopia. *Neurology* 2000; 55: 1603-8.
71. Barkovich AJ, Kjos BO. Gray Matter Heterotopias: MR Characteristics and Correlation with Developmental and Neurologic Manifestations. *Radiology* 1992; 182: 493-9.
72. Guerrini R, Dobyns WB. Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and frontonasal malformation. *Neurology* 1998; 51: 499-503.
73. Palminini A, Andermann F, Aicardi J et al. Diffuse cortical dysplasia, or the 'double cortex' syndrome: The clinical and epileptic spectrum in 10 patients. *Neurology* 1991; 41: 1656-62.
74. Aicardi, J, Lefebvre, J, Lerique-Koechlin A. A new syndrome: spasms in flexion, callosal agenesis, ocular abnormalities. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1965: 19, 609–610.
75. Krewski D., Glickman B., Habash R., Habbick B., W. Lotz G., Mandeville R., Prato F., Salem T., Weaver D. Recent advances in research on radiofrequency fields and health: 2001-2003. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 10:287–318, 2007.
76. Seker SS, Cerezci O. Elektromanyetik alanların biyolojik etkileri güvenlik standartları ve korunma yöntemleri. Istanbul, Turkey: Boğaziçi Üniversitesi Yayinlari, 1991: pp. 8–12.
77. Sanalan Y. Nükleer Olmayan Radyasyonda Var. Bilişim Toplumuna Giderken Elektromanyetik Kirlilik Etkileri Sempozyumu. Ankara, Turkey, 11 November 1999, pp. 1–4.
78. Yano, M., Wang, J., and Fujiwara, O. 2001. FDTD computation of the temperature rise in realistic head models simulating adult and infant for 1.5 GHz microwave exposure. *Electron. Comm. Jpn.* 84:57–66.
79. Gandhi, O. P., and Kang, G. Some present problems and a proposed experimental phantom for SAR compliance testing of cellular telephones at 835 MHz and 1900 MHz. *Phys. Med. Biol.* 2002: 47:1501–1518.
80. Schoenborn, M., Burkhardt, M., and Kuster, N. Differences in energy absorption between heads of adults and children in the near field of sources. *Health Phys.* 1998: 74:160–168.

81. Hondou, T. Rising level of public exposure to mobile phones: Accumulation through additivity and reflectivity. *J. Phys. Soc. Jpn.* 2002: 71:432–435
82. Toropainen, A. Human exposure by mobile phones in enclosed areas. *Bioelectromagnetics* 2003: 24:63–65.
83. The Interphone Study Group <http://www.rfcom.ca/programs/interphone.shtml>.
84. D'Ambrosio, G., Massa, R., Scarfi, M. R., and Zeni, O. Cytogenic damage in human lymphocytes following GSM modulated microwave exposure. *Bioelectromagnetics* 2002: 23:7–13.
85. Aldinucci, C., Garcia, J. B., Palmi, M., Sgaragli, G., Benocci, A., Meini, A., Pessina, F., Rossi, C., Bonechi, C., and Pessina, G. P. The effect of strong static magnetic field on lymphocytes. *Bioelectromagnetics* 2003: 24:109–117.
86. D'Andrea, J. A., Chou, C. K., Johnston, S. A., and Adair, E. R. Microwave effects on the nervous system. *Bioelectromagnetics* 2003: 24:107–147.
87. Griefahn, B., Kunemund, C., Blaszkewicz, M., Golka, K., Mehnert, P., and Degen, G. Experiments on the effects of continuous 16.7 Hz magnetic field on melatonin secretion core body temperature, and heart rates in humans. *Bioelectromagnetics* 2001: 22:581–588.
88. Black, D. R., and Heynick, L. N. Radiofrequency (RF) effects on blood cells, cardiac, endocrine, and immunological functions. *Bioelectromagnetics* 2003: 6:187–195.
89. Tice, R. R., Hook, G. G., Donner, M., McRee, D. I., and Guy, A. W. Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. *Bioelectromagnetics* 2002: 23:113–126.
90. Mashevich, M., Folkman, D., Kesar, A., Barbul, A., Korenstein, R., Jerby, E., and Avivi, L. Exposure of human peripheral blood lymphocytes to electromagnetic fields associated with cellular phones leads to chromosomal instability. *Bioelectromagnetics* 2003: 24:82–90.
91. Repacholi, M. H., Basten, A., Gebiski, V., Noonan, D., Finnie, J., and Harris, A. W. Lymphomas in E mu-Pim 1 transgenic mice exposed to pulsed MHz electromagnetic fields *Radiat. Res.* 1997: 147:631–640.
92. Trosic, I., Busljeta, I., Kasuba, V., and Rozgaj, R. Micronucleus induction after whole-body radiation of rats. *Mutat. Res.* 2002: 521:73–79.
93. Zhang, M. B., He J. L., Jin, L. F., and Lu, D. Q. Study of low-intensity 2450-MHz microwave exposure enhancing the genotoxic effects of mitomycin C using micronucleus test and comet assay in vitro. *Biomed. Environ. Sci.* 2002: 15:283–290.

94. Zook, B. C., and Simmens, S. J. The effects of 860 MHz radiofrequency radiation on the induction or promotion of brain tumors and other neoplasms in rats. *Radiat. Res.* 2001: 155:572–583.
95. Mason, P. A., Walters, T. J., DiGiovanni, J., Beason C. W., Jausehem, J. R., Dick, E. J., Mahajan, K., Dusch, S. J., Shields, B. A., Merritt, J. H., Murphy, M. R., and Ryan, K. L. Lack of effect of 94 GHz radio-frequency radiation exposure in an animal model of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2001: 22:1701–1708.
96. Jauchem, J. R., Ryan, K. L., Frei, M. R., Dusch, S. J., Lehnert, H. M., and Kovatch, R. M. Repeated exposure of C3H/HeJ mice to ultra-wideband electromagnetic pulses: Lack of effects on mammary tumors. *Radiat. Res.* 2001: 155:369–377.
97. La Regina, M., Moros, E. G., Pickard, W. F., Straube, W. L., Baty, J., and Roti Roti, J. L. The effect of chronic exposure to 835.62 MHz FDMA or 847.74 MHz CDMA radiofrequency radiation on the incidence of spontaneous tumors in rats *Radiat. Res.*2003: 160:143–151.
98. French, P. W., Penny, R., Laurence, J. A., and McKenzie, D. R. Mobile phones, heat shock proteins, and cancer. *Differentiation* 2001: 67:93–97.
99. Shallom, J. M., Di Carlo, A. L., Ko, D., Penafiel, L. M., Nakai, A., and Litovitz, T. A. Microwave exposure induces Hsp 70 and confers protection against hypoxia in chick embryos. *J. Cell. Biochem.*2002: 86:490–496.
100. Kwee, S., Raskmark, P., and Velizarov, S.. Changes in cellular proteins due to environmental non-ionizing radiation. I. Heat-shock proteins. *Electromagnetobiology* 2001: 20:141–152.
101. Karaca E, Durmaz B, Aktug H, Yildiz T, Guducu C, Irgi M, Koksall MG, Ozkinay F, Gunduz C, Cogulu O. The genotoxic effect of radiofrequency waves on mouse brain. *J Neurooncol.* 2012 Jan;106(1):53-8.
102. Muscat, J. E., Malkin, M. G., Thompson, S., Shore, R. E., Stellman, S. D., McRee, D. Neugut, A. I., and Wynder, E. L. Handheld cellular telephone use and risk of brain cancer. *J. Am. Med. Assoc.* 2000: 284:3001–3007.
103. Heynick, L. N., Johnston, S. A., and Mason, P. A. Radio frequency electromagnetic fields: Cancer, mutagenesis, and genotoxicity. *Bioelectromagnetics* 2003: 24:74–100.
104. Cooper, D., Hemmings, K., and Saunders, P. Cancer incidence near radio and television transmitters in Great Britain. I. Sutton Coldfield transmitter; II. All high power transmitters *Am. J. Epidemiol.*2001: 153:202–204.
105. Dolk, H., Shaddick, G., Walls, P., Grundy, C., Thakrar, B., Kleinschmidt, I., and Elliott, P. Cancer incidence near radio and television transmitters in Great Britain. I. Sutton Coldfield Transmitter. *Am. J. Epidemiol.*1997: 145:1–9.

106. Dolk, H. Elliott, P., Shaddick, G., Walls, P., and Thakrar, B. Cancer incidence near radio and television transmitters in Great Britain. II. All high power transmitters. *Am. J. Epidemiol.* 1997: 145:10–17.
107. De Roos, A., Teschke, K., Savitz, D. A., Poole, C. Grufferman, S., Pollock, B. H., and Olshan, A. F. Parental occupational exposures to electromagnetic fields and radiation and the incidence of neuroblastoma in offspring. *Epidemiology* 2001: 12:508–515.
108. Groves, F. D., Page, W. F., Gridley, G., Lisimaque, L., Stewart, P. A., Tarone, R. E., Gail, M. H., Boice, J. D., Jr., and Beebe, G. W. Cancer in Korean War navy technicians: Mortality survey after 40 years. *Am. J. Epidemiol.* 2002: 155:810–818.
109. Robinette, C. D., Silverman, C., and Jablon, S. Effects upon health of occupational exposure to microwave radiation (radar). *Am. J. Epidemiol.* 1980: 112:39–53.
110. Dreyer, N. A., Loughlin, J. E., and Rothman, K. J. Cause-specific mortality in cellular telephone users. *J. Am. Med. Assoc.* 1999: 282:1814–1816.
111. Inskip, P. D., Tarone, R. E., Hatch, E. E., Wilcosky, T. C., Shapiro, W. R., Selker, R. G., Fine, H. A., Black, P. M., Loeffler, J. S., and Linet, M. S. 2001. Cellular telephone use and brain tumors. *N. Engl. J. Med.* 2001: 344:79–86.
112. Muscat, J. E., Malkin, M. G., Shore, R. E., Thompson, S., Neugut, A. I., Stellman, S. D., and Bruce, J. Handheld cellular telephones and risk of acoustic neuroma. *Neurology* 2002: 58:1304–1306.
113. Hardell, L., Nasman, A., Pahlson, A., and Hallquist, A. Use of cellular telephones and the risk for brain tumors: A case-control study. *Int. J. Oncol.* 1999: 15:113–116.
114. Hardell, L., Hansson Mild, K., Pahlson, A., and Hallquist, A. Ionizing radiation, cellular telephones and the risk for brain tumors. *Eur. J. Cancer Prev.* 2001: 10:523–529.
115. Auvinen, A., Hietanen, M., Luukkonen, R., and Koskela, R. Brain tumors and salivary gland cancers among cellular telephone users. *Epidemiology* 2002: 13:356–359.
116. Johansen, C., Boice, J. D., Jr., McLaughlin, J. K., and Olsen, J. H. Cellular telephones and cancer—A nationwide cohort study in Denmark. *JNCI* 2001: 93:203–207.
117. Stang, A., Anastassiou, G., Ahrens, W., Browmen, K., Bornfeldt, N., and Jokel, K. H. The possible role of radiofrequency radiation in the development of uveal melanoma. *Epidemiology* 2001: 12:7–12.
118. Kundi, M., Mild, K., Hardell, L., and Mattsson, M. O. Mobile telephones and cancer—A review of the epidemiological evidence. *J. Toxicol. Environ. Health B* 2004: 7:351–384
119. Elbetieha, A., Al-Akras, M. A., and Darmani, H. Long-term exposure of male and female mice to 50 Hz magnetic field: Effects on fertility. *Bioelectromagnetics* 2002: 23:168–172.

120. Dasdag, S., Akdag, M. Z., Aksen, F., Yilmaz, F., Bashan, M., Dasdag, M. M., and Celik, M. S. Whole body exposure of rats to microwaves emitted from a cell phone does not affect the testes. *Bioelectromagnetics* 2003; 24:182–188.
121. Divan HA, Kheifets L, Obel C, et al. Prenatal and postnatal exposure to cell phone use and behavioral problems in children. *Epidemiology* 2008;19:523–9.
122. Divan HA, Kheifets L, Obel C, et al. Cell phone use and behavioural problems in young children. *J Epidemiol Community Health* 2012;66:524–9.
123. Hocking B. Maternal cell phone use and behavioral problems in children (letter). *Epidemiology* 2009;20:312.
124. Jarupat S, Kawabata A, Tokura H, et al. Effects of the 1900 MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on nocturnal melatonin secretion. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2003;22:61–3.
125. Wood AW, Loughran SP, Stough C. Does evening exposure to mobile phone radiation affect subsequent melatonin production? *Int J Radiat Biol* 2006;82:69–76.
126. Burch JB, Reif JS, Noonan CW, et al. Melatonin metabolite excretion among cellular telephone users. *Int J Radiat Biol* 2002;78:1029–36.
127. Guxens M, van Eijsden M, Vermeulen R, et al. *J Epidemiol Community Health* 2013;67:432–438.
128. Akleman F, Sevgi L. FDTD analysis of human head—mobile phone interaction in terms of specific absorption rate (SAR) calculations and antenna design. In: *Proceedings of the conference on antennas and propagation for wireless communication, Waltham, USA, 1998*: pp 85–88.
129. Paker S, Sevgi L. FDTD evaluation of the SAR distribution in a human head near a mobile cellular phone. *Turk J Electron Commun* 1998; 6:14–19.
130. Volpe J. *Neurology of the newborn*. 5th ed. Saunders, 2008; Unit 1: 53–4.
131. Friocourt G, Kanatani S, Tabata H, Yozu M, Takahashi T, Antypa M, Raguénès O, Chelly J, Férec C, Nakajima K, Parnavelas JG. Cell-autonomous roles of ARX in cell proliferation and neuronal migration during corticogenesis. *J Neurosci*. 2008 May 28; 28(22):5794-805.
132. Friocourt G, Marcorelles P, Saugier-Veber P, Quille ML, Marret S, Laquerrière A. Role of cytoskeletal abnormalities in the neuropathology and pathophysiology of type I lissencephaly. *Acta Neuropathol*. 2011 Feb;121(2):149-70.
133. Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA, et al. Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* 2001;9:5e12.

134. Jang MA, Woo HI, Kim JW, Lee J, Ki CS. Identification of DCX gene mutation in lissencephaly spectrum with subcortical band heterotopia using whole exome sequencing. *Pediatr Neurol*. 2013 May;48(5):411-4.
135. Moro F, Carozzo R, Veggiotti P, Tortorella G, Toniolo D, Volzone A, Guerrini R. Familial periventricular heterotopia: missense and distal truncating mutations of the FLN1 gene. *Neurology*. 2002 Mar 26;58(6):916-21.
136. Fox, J.W, Lamperti ED, Ekşioğlu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA et al. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 1998; 21, 1315–1325.
137. Carabalona A, Beguin S, Pallesi-Pocachard E, Buhler E, Pellegrino C, Arnaud K, Hubert P, Oualha M, Siffroi JP, Khantane S, Coupry I, Goizet C, Gelot AB, Represa A, Cardoso C. A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-A. *Hum Mol Genet*. 2012 Mar 1;21(5):1004-17.
138. Inamori K, Yoshida-Moriguchi T, Hara Y, Anderson ME, Yu L, Campbell KP. Dystroglycan function requires xylosyl- and glucuronyltransferase activities of LARGE. *Science*. 2012 Jan 6;335(6064):93-6.
139. Qu Q, Smith FI. Neuronal migration defects in cerebellum of the *Largemyd* Mouse are associated with disruptions in Bergmann glia organization and delayed migration of granule neurons. *Cerebellum*. 2005;4(4):261-70.
140. Qu Q, Crandall JE, Luo T, McCaffery PJ, Smith FI. Defects in tangential neuronal migration of pontine nuclei neurons in the *Largemyd* mouse are associated with stalled migration in the ventrolateral hindbrain. *Eur J Neurosci*. 2006 Jun;23(11):2877-86.
141. Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet*. 2000 Sep;26(1):93-6.
142. Chang BS, Duzcan F, Kim S, Cinbis M, Aggarwal A, Apse KA, Ozdel O, Atmaca M, Zencir S, Bagci H, Walsh CA. The role of RELN in lissencephaly and neuropsychiatric disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007 Jan 5;144B(1):58-63.
143. Jansen AC, Oostra A, Desprechins B, De Vlaeminck Y, Verhelst H, Régál L, Verloo P, Bockaert N, Keymolen K, Seneca S, De Meirleir L, Lissens W. TUBA1A mutations: from isolated lissencephaly to familial polymicrogyria. *Neurology*. 2011 Mar 15;76(11):988-92.
144. Sohal AP, Montgomery T, Mitra D, Ramesh V. TUBA1A mutation-associated lissencephaly: case report and review of the literature. *Pediatr Neurol*. 2012 Feb;46(2):127-31.

145. Jin DY, Lyu MS, Kozak CA, Jeang KT. Function of 14-3-3 proteins. *Nature*. 1996 Jul 25;382(6589):308.
146. Spalice A, Parisi P, Nicita F, Pizzardi G, Del Balzo F, Iannetti P. Neuronal migration disorders: clinical, neuroradiologic and genetics aspects. *Acta Paediatr*. 2009 Mar;98(3):421-33.
147. Mignon-Ravix C, Cacciagli P, El-Waly B, Moncla A, Milh M, Girard N, Chabrol B, Philip N, Villard L. Deletion of YWHAE in a patient with periventricular heterotopias and pronounced corpus callosum hypoplasia. *J Med Genet*. 2010 Feb;47(2):132-6.