

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ŞİZOFRENİDE ELEKTROFİZYOLOJİK  
DEĞİŞİMLER VE COMT VAL158MET  
POLİMORFİZMİ İLE İLİŞKİLERİ**

SERHAT TAŞLICA

BİYOFİZİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2011

Tez Kodu: DEÜ.HSI.MSc-2007970012

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ŞİZOFRENİDE ELEKTROFİZYOLOJİK  
DEĞİŞİMLER VE COMT VAL158MET  
POLİMORFİZMİ İLE İLİŞKİLERİ**

**BİYOFİZİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SERHAT TAŞLICA**

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Adile ÖNİZ

(Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından  
2006.KB.SAG.038 sayılı proje ile desteklenmektedir )

**Tez Kodu:** DEÜ.HSI.MSc-2007970012

**Tez Kodu:** DEÜ.HSI.MSc-2007970012

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı,  
Yüksek Lisans programı öğrencisi Serhat Taşlıca “**Şizofrenide Elektrofizyolojik  
Değişimler ve Comt Val158met Polimorfizmi ile İlişkileri**” konulu Yüksek  
Lisans tezini 05.08.2011 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Doç. Dr. Adile ÖNİZ  
(DEÜ Tıp F. Biyofizik AD.)

Başkan

Prof. Dr. Murat ÖZGÖREN  
(DEÜ Tıp F. Biyofizik AD.)  
ÜYE

Prof. Dr. Cem Şeref BEDİZ  
(DEÜ Tıp F. Fizyoloji AD.)  
ÜYE

Prof. Dr. Köksal ALPTEKİN  
(DEÜ Tıp F. Psikiyatri AD.)  
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU  
(DEÜ Tıp F. Tıbbi Biyoloji AD.)  
ÜYE

Prof. Dr. Ahmet Ömer İKİZ  
(DEÜ Tıp F. KBB AD.)  
YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Mustafa GÜVENÇER  
(DEÜ Tıp F. Anatomi AD.)  
YEDEK ÜYE

## **İÇİNDEKİLER**

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Beyin Dinamiği ve Ölçüm.....	4
2.1.1.EEG ve EEG Sinyallerinin Kaynakları.....	4
2.1.2.İşitsel Uyarılmış Potansiyeller, Olay İlişkili Potansiyeller ve Uyumsuzluk Negatifliği.....	6
2.2.Şizofreni.....	7
2.2.1.Şizofrenide Anatomik ve Bilişsel Bozulmalar.....	7
2.2.2.Şizofreninin Temellerine Dair Hipotezler.....	8
2.2.3.Dopamin, COMT Geni ve Şizofreni.....	9
2.2.4.Şizofrenide EEG Sinyalleri.....	10
2.2.5.Şizofreni Genetiği ve Endofenotip Yaklaşımı.....	11
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1.Elektrofizyolojik Veri Elde Edilmesi.....	14
3.1.1.İşitsel Uyarılmış Potansiyeller (İUP).....	15
3.1.2.İşitsel Olay İlişkili Potansiyeller (İOİP).....	15
3.1.3.İşitsel Uyumsuzluk Negatifliği (MMN).....	16
3.2.Genetik Veri Elde Edilmesi.....	18
3.2.1.DNA İzolasyonu.....	18
3.2.2.Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR).....	19
3.2.3.Agaroz Jel Elektroforezi.....	20
3.2.4.Dizi Analizi.....	21
4.BULGULAR.....	22
4.1.Elektrofizyolojik Ölçümler.....	22
4.1.1.İşitsel Uyarılmış Potansiyeller (İUP).....	22
4.1.2.İşitsel Olay İlişkili Potansiyeller (İOİP).....	24

4.1.3.Uyumsuzluk Negatifliği (MMN).....	26
4.2.Genetik Değerlendirme.....	26
4.2.1.Genetik ve İOİP'ler.....	28
4.2.2.Genetik ve EEG sinyal kalite ölçümleri.....	30
5.TARTIŞMA.....	31
5.1.Elektrofizyolojik Bulgulara Ait Tartışma.....	31
5.1.1.İşitsel Uyarılmış Potansiyeller (İUP).....	31
5.1.2.İşitsel Olay İlişkili Potansiyel (İOİP).....	33
5.1.3.Uyumsuzluk Negatifliği (MMN).....	33
5.2.Genetik Bulgulara Ait Tartışma.....	34
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
7.KAYNAKLAR.....	36
8.EKLER.....	41

## **TABLO LİSTESİ**

Tablo 1: MMN paradigmasındaki uyaranların ses özellikleri.....	17
Tablo 2: Primer bağlanma bölgeleri ve polimorfik nokta.....	20
Tablo 3: PCR parametreleri.....	21
Tablo 4: Farklı Genotiplerde İOİP Bileşenleri.....	28
Tablo 5: Farklı Genotiplerde MMN Genliği.....	29
Tablo 6: Genotipe göre güçlenme faktörü değerleri.....	30

## **ŞEKİL LİSTESİ**

Şekil 1: Örnek EEG, UP ve OİP'ler.....	5
Şekil 2: EEG kayıt laboratuvarının tasarımı.....	15
Şekil 3: MMN paradigmasında uyarın deseni.....	16
Şekil 4: Hasta ve kontrollere ait İUP'lerin kafa üzerinde dağılımı.....	23
Şekil 5: Hedef olmayan uyarana ait yanıtlar.....	24
Şekil 6: Hedef uyarana ait İOİP'ler.....	25
Şekil 7: CPz elektrodundan ölçülen MMN yanıtları.....	26
Şekil 8: Agaroz jelde yürütölmüş PCR ürünleri.....	27
Şekil 9: Örnek bir dizi analizi sonucu.....	27
Şekil 10: COMT genotip gruplarına göre İOİP'lerin zaman-frekans gösterimi.....	30

## **KISALTMALAR**

**dB:** desibel

**COMT:** katekol-O-metiltransferaz enzimi ve onu kodlayan gen

**ECOG:** elektrokortikografi

**EEG:** elektroensefalografi/elektroensefalogram

**EF:** güçlenme faktörü (*enhancement factor*)

**EOG:** elektrookulografi

**fMRG:** fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme

**fNIRS:** fonksiyonel yakın kızılaltı spektroskopisi

**Hz:** hertz

**İUP:** işitsel uyarılmış potansiyeller

**İOİP:** işitsel olay ilişkili potansiyeller

**MEG:** magnetoensefalografi

**Met:** metionin

**MMN:** uyumsuzluk negatifliği (*mismatch negativity*)

**MR:** manyetik rezonans

**ms:** milisaniye (1/1.000 saniye)

**µV:** mikrovolt (1/1.000.000 volt)

**PCR:** polimeraz zincir tepkimesi (*polymerase chain reaction*)

**PET:** pozitron emisyon tomografisi

**SPECT:** tek foton emisyon bilgisayarlı tomografisi

**Val:** valin



## **TEŞEKKÜR**

Akademik gelişimime katkı sağlayann danışmanım Doç Dr. Adile ÖNİZ'e,

Çalışmalarım sırasında Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarlarından zaman ve imkan kısıtlaması olmadan faydalanmamı sağlayan ve proje sürecinde ikinci bir danışman gibi destek olan Prof. Dr. Murat Özgören'e,

Şizofreni çalışma alanını bana sevdiren ve motivasyonumu arttıran Prof. Dr. Köksal ALPTEKİN'e,

Genetik araştırmalarımı laboratuvarında yürütebilme imkanını veren ve bu alandaki araştırmalarımnda bilimsel desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN-YAZICIOĞLU'na,

Tezin araştırma, analiz ve yazım süreçlerinde destek veren Uzm. Dr. Ahmet Y. AKTENER, Öğr. Gör. Dr. T. Onur BAYAZIT, Ö. Tuğçe BEZİRCİOĞLU, Çağdaş GÜDÜCÜ ve Emre GÜLSU'ya,

Yüksek lisans eğitimim süresince destek olan çalışma arkadaşlarım İpek ERDOĞAN, R. Uğraş ERDOĞAN, Dr. Sibel KOCAASLAN ATLI, Gonca İNANÇ, Dua ÖZSOYLU, Merve TETİK'e,

Biyofizik bölümü çalışanları Sezayir CAN, Mehmet ORAL, Canan YEĞİN'e,

Araştırma görevlisi kadromu sağlamış olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne, her daim gülen yüzleriyle destek olan Enstitü Öğrenci İşleri Birimi çalışanlarına ve diğer enstitü çalışanlarına,

Zor şartlarda dahi zorunsuz bir şekilde eğitimimi rahatça devam ettirebilmem için her desteği veren annem Sabriye TAŞLICA, babam Timur TAŞLICA, ağabeyim Burak TAŞLICA'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca hep yanımda olan, yoğun çalışma dönemlerimde güler yüzüyle bana güç veren eşim Melike DEMİRCİ TAŞLICA'ya teşekkür ederim.

Serhat TAŞLICA

İZMİR, 2011

# ŞİZOFRENİDE ELEKTROFİZYOLOJİK DEĞİŞİMLER VE COMT VAL158MET POLİMORFİZMİ İLE İLİŞKİLERİ

**Serhat Taşlıca**

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

*Mithatpaşa Cad. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi  
Biyofizik Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı – İzmir*

## ÖZET

**Amaç:** Bu tezin amacı beynin bazı elektrofizyolojik yanıtlarının şizofreni hastalığında görülen değişimlerini ve bu değişimlerin *COMT* geninde görülen Val158Met polimorfizmiyle ilişkilerini incelemektir.

**Hipotezler:** Şizofreni hastalarına ait işitsel uyarılmış potansiyellerin kontrol grubundan farklılık göstermemesi; işitsel olay ilişkili potansiyellerin ve uyumsuzluk negatifliğinin hasta grubunda azalmış genliklere sahip olması beklenmektedir. Val/Val genotipini taşıyan hastaların sinyal/gürültü oranlarının Met/Met genotipli hastalardan düşük olması beklenmektedir.

**Yöntem:** 17 şizofreni hastası ve 17 sağlıklı katılımcıya işitsel uyaranlar dinletilirken EEG kaydı alınmıştır. Elde edilen uyarılmış ve olay ilişkili potansiyeller ile uyumsuzluk negatifliği yanıtlarının 6 elektrotta (F3, F4, FCz, P3, P4, CPz) genlik ve latans ölçümleri yapılmıştır. 14 hastadan alınan kanlardan elde edilen DNA ile hastaların *COMT* Val158Met genotipi incelenmiştir. Bu hastalar genotiplerine göre gruplandırılarak olay ilişkili potansiyellerde sinyal/gürültü oranları incelenmiştir.

**Bulgular:** Uyarılmış potansiyellerin P60 bileşenlerinin latansı hasta grubunda kısalmış görünmektedir (FCz, P4). İşitsel olay ilişkili potansiyellere ait P300 bileşenlerinde gruplar arası anlamlı fark yokken hastalarda geç negatif yanıtın genliğinin artmış (FCz, P3, CPz), FCz'de N100 bileşeninin genliğinin azalmış olduğu görülmektedir ( $p < .05$ ). Farklı ses sapma tiplerinin farklı seviyelerinde şizofreni hastalarının düşük genlikli uyumsuzluk negatifliğine sahip oldukları görülmektedir ( $p < .05$ ). *COMT* Val/Val(158) genotipli hastaların olay ilişkili potansiyellerinin sinyal/gürültü oranlarının Met/Met genotipli hastalardan yüksek olduğu gözlenmiştir (istatistiksel anlamlılık incelenmemiştir).

**Sonuç:** Hasta ve kontrol grupları arasında işitsel uyarılmış potansiyellerde görece az sayıda bileşende fark varken işitsel olay ilişkili potansiyel ve uyumsuzluk negatifliğinde daha fazla bileşende ve elektrotta gruplar arası fark gözlenmiştir. Düşük aktiviteli *COMT* enzimi üreten Met allelinin şizofreni hastalarında sinyal/gürültü oranını düşürdüğü gözlenmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Şizofreni, İUP, İOİP, MMN, *COMT*, sinyal/gürültü oranı.

# ELEKTROPHYSIOLOGICAL ALTERATIONS IN SCHIZOPHRENIA AND RELATION OF THEM TO COMT VAL158MET POLYMORPHISM

**Serhat Taşlıca**

Dokuz Eylül University  
Health Sciences Institute

*Mithatpaşa Cad. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi  
Biyofizik Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı – İzmir*

## **ABSTRACT**

**Aim:** This thesis aims to investigate the alterations in electrophysiological responses of the brain in schizophrenia and the relation of these alterations with Val158Met polymorphism in *COMT* gene.

**Hypothesis:** It is hypothesized that auditory evoked potential of schizophrenia patients does not differ from healthy subjects while auditory event related potentials and mismatch negativity has lower amplitudes in schizophrenia patients. Patients with Val/Val genotype in *COMT* gene are expected to have lower signal-to-noise ratio than patients with Met/Met genotype.

**Methods:** 17 schizophrenia patients and 17 healthy subjects underwent EEG recording during presentation of auditory stimuli. Latency and amplitudes of auditory evoked and event related potentials and mismatch negativity responses at 6 electrode sites (F3, F4, FCz, P3, P4, CPz) was measured. *COMT* Val158Met genotyping of 14 patients was performed via venous blood. These patients were grouped in terms of their genotypes and signal-to-noise ratios of event related potentials of these groups are investigated.

**Results:** Latency of P60 component of evoked potentials is shorter in patients (FCz, P4). While P300 component of auditory event related potentials does not show significant difference between groups, patients have smaller late negativity (FCz, P3, CPz) and larger N100 amplitudes ( $p < .05$ ). Schizophrenia patients have smaller mismatch negativity responses against different types and levels of sound deviations ( $p < .05$ ). Patients with Val/Val genotype have larger signal-to-noise ratios in event related potentials than patients with Met/Met genotype.

**Conclusion:** While there is a small difference between auditory evoked potentials of schizophrenia patients and healthy subjects, significant difference is observed in more components and at more electrode sites of auditory event related potentials and mismatch negativity. Smaller signal-to-noise ratio is observed in the patients with Met allele which produces less active *COMT* enzyme.

**Keywords:** Schizophrenia, AEP, AERP, MMN, *COMT*, signal-to-noise ratio.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Şizofreni hastaların ve hasta yakınlarının yaşam kalitesini azaltan ve bilişsel işlev bozukluğu oluşturan bir bozukluktur. Şizofreni hastalarının sadece % 10-20'sinde tamamen düzelme meydana gelirken, % 30 hastada kısmi düzelme olmaktadır. Hastaların en az yarısında ise belirtiler değişmemekte veya kötüleşmektedir (21) bu yüzden çoğu hasta ve yakını ömür boyu bu hastalıkla mücadele etmek zorundadır. Hastalığın sosyal ve ekonomik etkisi çok büyüktür. Hasta ve ailesi üzerinde etkileri yıkıcı olabilen ve oldukça sık görülen (yaşam boyu görülme sıklığı % 0.12-1.6'dır (19)) bu hastalığın temellerinin araştırılması, uygun tanı, korunma ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır. Şizofreninin genetik ve biyolojik temelleri olduğu kabul edilmektedir (38, 45). Ancak hastalığın heterojen alt tipleri ve Mendel kalıtımını takip etmemesi gibi sebeplerle henüz hastalığın genetik altyapısı ile ilgili çalışmalar yeterince ilerleyememiştir. Kompleks hastalıklarla ilgili genetik çalışmalarda klinik durumun varlığı ya da yokluğunun kullanılması yerine endofenotiplerin kullanılması bu sorunun aşılmasında kullanılmaya aday bir yöntemdir. Şizofreni genetiğinde kullanılmaya aday endofenotiplerin arasında ise elektrofizyolojik endofenotipler önemli bir yer tutar (50). Uygun endofenotipler ilerleyen dönemlerde hastalığın nesnel tanısında ve alt tiplerin net olarak belirlenmesinde etkili olabilir. Ancak bu çalışma klinik hedefler taşımamaktadır. Bu çalışmanın sonuçları, hastalıkla ilişkili genlerin ve elektrofizyolojik parametrelerin bulunmasını, bunun sonucunda hastalıktaki biyolojik mekanizmaların ve süreçlerin aydınlatılmasında rol oynayabilir.

Literatürde bir işitsel olay ilişkili potansiyel olan uyumsuzluk negatifliğinin (MMN) ve katekol-O-metiltransferaz enzimini kodlayan COMT genindeki Val158Met polimorfizminin şizofreni ile ilişkisini ayrı ayrı inceleyen yayınlar bulunmaktadır. Ancak MMN'i endofenotip olarak şizofreni genetiğinde kullanan araştırma bulunmamaktadır. Sağlıklı bireylerde de MMN ve COMT Val158Met polimorfizmi ilişkisini irdeleyen yayın bulunmamaktadır.

Projenin amacı farklı deneysel düzeneklerde beynin farklı işitsel uyarılara elektrofizyolojik yanıtlarının genlik, süre, sıklık, yanıt gecikmesi gibi farklı parametrelerinin şizofrenik bireylerde gösterdiği olası değişikliklerin ve bu değişikliklerin COMT Val158Met polimorfizmi ile ilişkisinin gösterilmesidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. **Beyin Dinamiği ve Ölçüm**

Beyin mikro düzeydeki yapısal karmaşıklığının yanı sıra işlevsel olarak da karmaşık bir özellik göstermektedir ve bu karmaşıklığın ana sebeplerinden biri de beyin dinamik bir sistem olmasıdır. Beynin dinamiklerin araştırılması temel, klinik ve cerrahi tıp bilimleri dışında yaşam bilimleri, fiziksel, formal, uygulamalı ve sosyal bilimlerden pek çok dalın alanına girmektedir. Bu sebeple beyin işlevselliğinin ölçülmesinde de farklı yöntemler görülmektedir.

Örneğin hayvan beynindeki hüresel ve moleküler süreçler, immunokimyasal, immunoflorasan ve genetik mühendisliği yöntemlerinin farklı mikroskopi yöntemleri ile birleştirilmesiyle takip edilebilir. Beynin daha karmaşık işlevlerin incelenmesinde özellikle insanda uygulanabilecek, girişimsel olmayan yöntemler yardımcı olmaktadır. Örneğin psikoloji alanında sıkça kullanılan nöropsikolojik testler beyin işlevlerinin davranışsal seviyedeki sonuçlarının ölçülmesini sağlarken pozitron emisyon tomografisi (PET), fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRG), yakın kızılaltı spektroskopisi (fNIRS), tek foton emisyon bilgisayarlı tomografisi (SPECT) gibi görüntüleme yöntemleri de insanda beyin işlevlerine eşlik eden hemodinamik ve metabolik süreçlerin takip edilmesinde etkilidir.

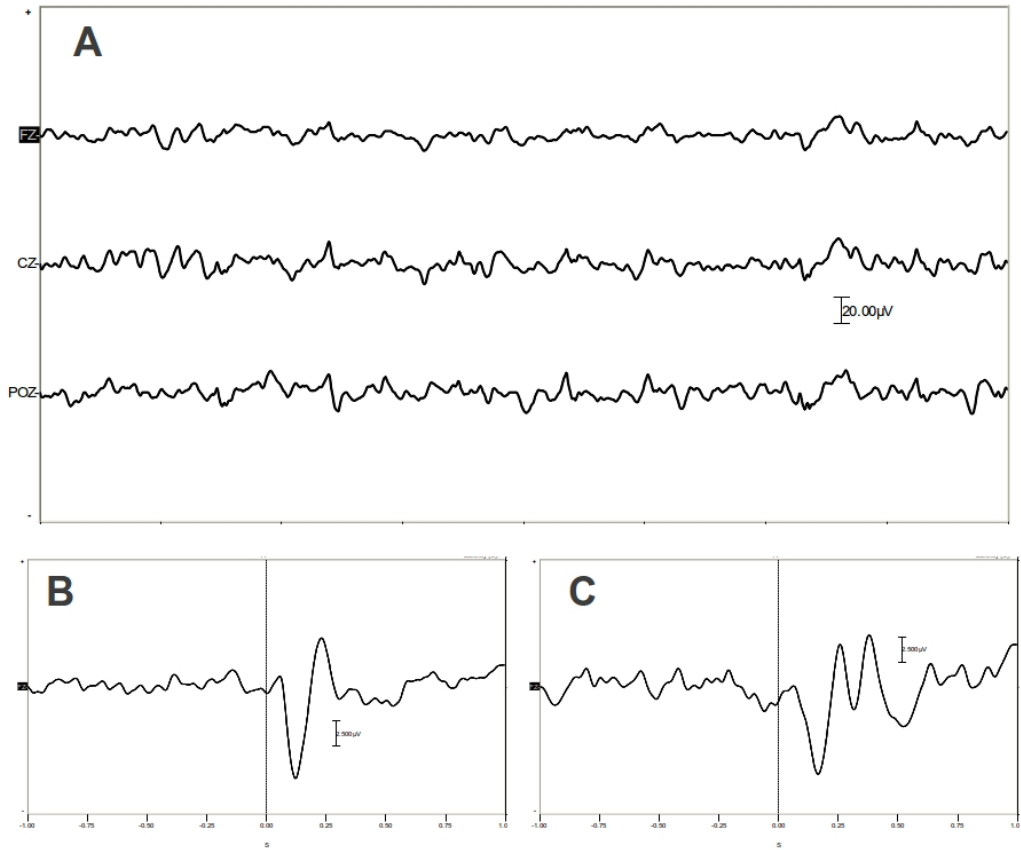
Beyin işlevlerinin araştırılmasında sinir hücrelerinin elektriksel etkinliği de önemli bir ölçüm zemini hazırlar. Hücre kültürlerindeki ya da insan dışı canlılardaki *in vivo* hücre elektrik kayıtları özellikle moleküler seviyede bilgiler verirken derin elektrot kayıtları ve elektrokortikografi (ECOG) ile organizma düzeyinde inceleme yapmak mümkündür. Ancak son derece girişimsel olan bu yöntemlerin yerine girişimsel olmayan elektroensefalografi (EEG) ve magnetoensefalografi (MEG) yöntemleri ile de beyin elektriksel etkinliğini incelemek mümkündür.

#### 2.1.1. *EEG ve EEG Sinyallerinin Kaynakları*

Uyanıklık, uyku, koma, anestezi, meditasyon durumları gibi farklı bilinç seviyelerinde beyin kendiliğinden (spontan) gelişen elektriksel etkinlikleri EEG ile takip edilebilir. Bu spontan EEG (Şekil 1) incelemesinin dışında, verilen bir bilişsel görev ya da yine farklı bilinç durumlarında uygulanan uyaranlar nedeniyle oluşan beyin elektriksel etkinliği de uygun EEG kayıtları ve farklı çözümlene yöntemleri uygulanarak ortaya çıkarılabilmektedir.

Bilişsel herhangi bir yük ya da görev içermeyen bir dış uyarana verilen elektriksel yanıtlar olan uyarılmış potansiyeller (UP) (Şekil 1), uyarının tipine göre işitel, görsel, dokunsal ya da kemodusal uyarılmış potansiyeller olarak adlandırılır.

Uyaranla ilgili kişiye bilişsel bir görev verilen ya da uyarıların içeriği, uygulanma yöntemine bağlı olarak bilişsel işlevleri tetikleyen durumlarda olay ilişkili potansiyeller (OİP) ölçülür (Şekil 1). UP'lerin özel bir türü olarak da değerlendirilen olay ilişkili potansiyeller uyarının duysal modalitesine (görsel, işitsel, vs.), içeriğine ya da uygulama desenine bağlı olarak farklı isimler alabilir. Seyrek/şaşırtmalı uyarın paradigması (*oddball paradigm*), uyumsuzluk negatifliği paradigması, atlanan uyarın paradigması, beklentisel negatif değişim (*contingent negative variation*) paradigması gibi uygulamalar farklı olay ilişkili potansiyellerin elde edilmesinde kullanılabilir (41).



**Şekil 1: Örnek EEG, UP ve OİP'ler**

Üç kanalı gösterilen bir EEG (A) ve tek kanalı gösterilen uyarılmış potansiyel (B) ile olay ilişkili potansiyel (C). B ve C'de "0" anındaki düşey çizgi uyarının kişiye uygulandığı anı belirtmektedir.

Beyindeki nöronların elektriksel etkinliği farklı iletkenliğe sahip dokulardan bir akım geçmesine sebep olur. Hacim iletimi (volume conduction) sayesinde bu akım saçlı deriye kadar zayıflayarak da olsa ulaşır ve EEG ile ölçülebilir (40).

Seçici geçirgen hücre zarının kısmen yalıtkan olması nedeniyle hücre dışı elektriksel akım EEG'nin ana kaynağını oluşturmaktadır. Ayrıca bu hücre dışı akımın ölçüm yapılan elektroda uzaklığı ve yönü önemlidir. Ölçüm yapılan yüzeye dik olan hücre dışı akım büyük elektriksel potansiyel değişimlerine sebep olurken paralel olan akım dış yüzeyden ölçülemez. Beynin elektriksel etkinliğinin deriden ölçülebilirliğini etkileyen diğer bir etken de hücrelerin eş zamanlılığıdır (senkronizasyon). Eş zamanlı olarak etkinlik gösteren, paralel dizilmiş nöron topluluğunun oluşturduğu ortalama elektriksel potansiyel nöron sayısı ile doğru orantılı olarak bu nöron topluluğu senkronizasyon göstermediğinde oluşan ortalama elektriksel potansiyel nöron sayısının karekökü ile orantılı hale gelir.

Bahsedilen bu özellikleri sağlayabilen, korteksin III, V ve VI. tabakalarında yer alan, korteksin yüzeyine dik olarak uzanan piramidal nöronların eşzamanlı postsinaptik potansiyellerinin yarattığı hücre dışı akımlar EEG sinyallerinin en önemli kaynaklarıdır (40). Hızlı aksiyon potansiyeller EEG sinyali oluşturmak için fazla kısıtlıdır ancak bunların senkron olduğu epileptik etkinlik ya da uyku gibi durumlarda EEG sinyali oluşabilir. Aksiyon potansiyellerinin refraktör döneminde ortaya çıkan hiperpolarizasyonlar uykudaki delta salınımlarının oluşmasına sebep olurlar.

Ölçülebilir EEG sinyali oluşturmak için yaklaşık 6 cm<sup>2</sup>'lik korteks yüzeyinin gerekli olduğu tahmin edilmektedir (42). Bir kortikal makrokolonun yaklaşık 0.008 cm<sup>2</sup>'lik kesit alanı olduğu ve her makrokolonda yaklaşık 100.000 nöron bulunduğu göz önüne alındığında ölçülebilir EEG sinyali için yaklaşık 10<sup>8</sup> nöronun etkinlik göstermesi gerektiği görülmektedir. Bu nöronların sadece %1'inin senkron olarak çalışması ölçülebilir EEG sinyallerinin oluşması için yeterli olur.

### 2.1.2. İşitsel Uyarılmış Potansiyeller, Olay İlişkili Potansiyeller ve Uyumsuzluk Negatifliği

Uyumsuzluk negatifliği (MMN: Mismatch Negativity) bir dizi standart uyarının arasında seyrek olarak farklı bir uyarının gelmesiyle oluşan bir olay ilişkili potansiyeldir. Farklı duyuşsal uyarımlarla oluşturulabilen bu yanıt, özellikle işitsel sistemde çalışılmıştır. Dikkat öncesi bellek ve karşılaştırma ile ilişkisi olduğu düşünülen MMN'in sesleri ayırt edebilme eğitimi verildiğinde daha da artıyor olması ve seyrek sesin farklılığının artmasıyla

hem MMN genliğinin hem de sesler arasında ayırım yapma yeteneğinin artması nedeniyle MMN ayırt etme başarısının bir göstergesi olarak görülmektedir (43).

## 2.2. Şizofreni

Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası hastalık sınıflandırma rehberi ICD-10'a (2007 versiyonu) göre şizofrenik bozukluklar karakteristik düşünce ve algı bozuklukları, duygulanımda uygunsuzluk ya da küntlük ile nitelenmektedir. Amerikan Psikiyatri Birliği'nin Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı'na (DSM-IV-TR) göre şizofreni tanısı koyabilmek için aşağıdaki tipik belirtilerden en az ikisinin bir aylık sürenin önemli kısmında görülmesi gerekir.

1. Sanrılar (Delüzyonlar)
2. Varsanılar (Halüsinasyonlar)
3. Dağınık (dezorganize) konuşma
4. Çok dağınık (gros dezorganize) ya da katatonik davranış
5. Negatif belirtiler. Örneğin künt duygulanım, konuşma fakirleşmesi (aloji), irade kaybı (avolisyon)

İş ve toplum ilişkileri ve kişisel bakımın bir veya daha fazlasında bozulmalar, belirtilerin en az 6 ay sürmesi, belirtilerin madde kullanımı ya da genel tıbbi duruma bağlı olamaması gibi kriterler de mevcuttur.

### 2.2.1. Şizofrenide Anatomik ve Bilişsel Bozulmalar

Şizofreni hastalarında kortekste azalma, gri maddede artış, hipokampuste değişiklik, lateral ventriküllerde genişleme, prefrontal bölgede alterasyonlar görülmektedir (4). Gri maddede, hipokampal formasyonda ve parahipokampal girusta azalmanın nöroleptik kullanımından önce de var olduğu çeşitli manyetik rezonans çalışmaları ile gösterilmiştir (39). Fakat prefrontal korteks, singulat girus, parietal lob, talamus, basal ganglia, serebellar vermis ve olfaktör bulblarda saptanan hacim değişiklikleri tam tutarlı sonuç vermemiştir (26, 32).

Şizofrenide görülen genel bilişsel zayıflamada özellikle dikkat, işleyen bellek, yürütücü işlevler ve episodik hafızada bozukluk gözlenmektedir (18). Dikkati işleyen yolak komplekstir ve prefrontal korteks ve onunla direk ilişkide olan bölgelerden özellikle posterior parietel korteks, anterior singulat girus, hipokampal formasyon ve striatumu içerir (14).



İşleyen ve episodik bellekteki bozukluk prefrontal korteks ve onun posterior cingulat korteks, anterior cingulat korteks, temporal ve parahipokampal korteksler ve striatum ile olan bağlantılarını içerir (2).

Şizofreninin patofizyolojisinin anlaşılmasında dinlenme durumunda, varsanılar esnasında ya da bilişsel görevlerin yapılması eşliğinde gerçekleştirilen fonksiyonel nörogörüntülemenin yardımı olmuştur. PET, SPECT ve fonksiyonel MR çalışmaları dorsolateral-prefrontal korteks, inferior prefrontal korteks, sağ ventrolateral/insular korteks, anterior singulat korteks, varsanıların bulunduğu duyuşsal modalitenin (işitsel ya da görsel) birincil ve ikincil duyuşsal korteksleri, sol peririnal ve entorinal korteksler gibi beyin bölgelerinde anormal etkinlik olduğunu göstermiştir (7).

### 2.2.2. Şizofreninin Temellerine Dair Hipotezler

Şizofreninin biyolojik temellerini açıklamaya yönelik hipotezlerden biri dopamin hipotezidir. Klasik dopamin hipotezi hastalığın pozitif semptomlarının kaynağının subkortikal dopamin seviyesindeki artış olduğunu belirtir. D2 dopamin reseptörü agonistlerinin sağlıklı bireylerde psikozlara sebep olurken, şizofrenlerde pozitif semptomları arttırması; antipsikotik ilaçların ise D2 dopamin reseptörlerini bloklama etkisinin olması bu hipotezi desteklemektedir (1). Prefrontal korteksin (PFC) bilişsel (kognitif) süreçlerdeki rolü, dopaminin bu bölgedeki görevleri ve hayvanlarda PFC'deki dopaminerjik iletimin azaltılmasıyla oluşan değişimler ışığında düzenlenen yeni dopamin hipotezi subkortikal dopamin fazlalığının yanında PFC'deki düşük dopamin seviyesinin önemini vurgular. Bu düşük prefrontal dopaminin şizofrenide görülen negatif semptomların ve bilişsel bozuklukların kaynağı olduğu düşünölmektedir (10).

Ketamin ve phencyclidine (PCP) gibi NMDA glutamat reseptörü agonistlerinin şizofreni benzeri psikotik ve bilişsel anomaliler oluşturabilmesi ve şizofrenlerin bu ilaçların olumsuz etkilerine karşı daha hassas olmaları, glutamatın hastalıkta bir rolü olabileceğini işaret etmektedir (45). NMDA reseptörünün modulatörü olan D-serin, glisin ve sarkozin kullanımının özellikle negatif semptomlardaki terapötik etkisi glutamat hipotezini desteklemektedir.

Şizofreninin organik temelleri üzerine kurulan hipotezlerden bir diğeri de nörogelişimsel bozukluk hipotezidir (3, 4). Nörogelişimsel bozukluk hipotezine göre gelişimin erken evrelerinde yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Nörogelişimsel değişiklikler,

nöronal öncüller, glia proliferasyon ve migrasyonunda, aksonal ve dendritik proliferasyonda, aksonların miyelinlenmesinde, apoptozda ve sinaptik budanmada ortaya çıkmaktadır (27). Genel olarak kabul gören düşünceye göre nörogelişimsel hasar morfolojide ve hücrel yerleşimde değişikliklere neden olmakta ve böylece özellikle nöronal plastisitede ortaya çıkan bozukluklar nöral sistemlerin çevresel uyaranlara karşı adaptif kapasitesini bozmaktadır. Ergenlik ve erken erişkinlik döneminde bu hasar, birey stres gibi çevresel sorunlarla karşılaştığı zaman gözlenebilen belirtileri ortaya çıkarmaktadır. Bu durumun daha önce hasarı kompanse edebilen nöronların eliminasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (12). Obstetrik komplikasyonlar, düşük doğum ağırlığı (8) ve perinatal enfeksiyonlar (33) şizofreni görülmesi ile pozitif korelasyon göstermektedir. Ayrıca hastalığın başlangıcında da bu yapısal anomalilerin varolduğu gösterilmiştir (11, 52). Şizofreninin nörogelişimsel hasar hipotezini destekleyen çalışmalardan birisi de neonatal dönemde ventral hippocampus lezyonu oluşturulan farelerde prefrontal korteksin gelişiminde ve plastisitesinde değişiklikler oluşması, farelerin şizofrenide görülen davranışsal ve hücrel birçok farklılığı sergilemesidir (28).

### 2.2.3. Dopamin, COMT Geni ve Şizofreni

Katekol-O-metiltransferaz (COMT), dopaminin yıkım yolağında yer alan enzimlerden biridir. Zara bağlı [MB-] ve çözünmüş [S-] iki farklı izoformu bulunan COMT enzimi, metil grubunun S-adenozilmetioninden katekolöstrojenlere, katekol grubu içeren ilaçlara ve dopamin, epinefrin ve norepinefrin gibi katekolaminlere transferini katalizler. Bu reaksiyon PFC'de dopamin yıkımı yolağının ilk basamağıdır. In situ hibridizasyon çalışmalarında *COMT* mRNA'sının insanda özellikle PFC'de yoğunlaştığı gösterilirken, sıçan beyinlerinde de benzer bir dağılım gösterilmiştir (29). *COMT* knock-out farelerle yapılan çalışmada erkeklerde PFC bazal dopamin seviyesinde (diğer beyin bölgelerinde ya da noradrenalin seviyelerinde bir değişiklik olmadan) 2-3 katlık bir artış gözlenmiştir (17).

*COMT* genindeki tek nükleotid polimorfizmlerinden (SNP) biri (rs4680) proteinin amino asit dizisinde de etkisini göstererek MB-COMT'un 158. amino asidinde valin yerine metionin bulunmasına sebep olur. Bu değişiklik proteinin termal dayanıklılığını etkileyerek enzim aktivitesini ~%70 oranında düşürür. Böylece düşük aktiviteli Met158 allelini taşıyan homozigot bireylerde dopamin, yüksek aktiviteli Val158 allelini taşıyan homozigot bireylere göre daha yavaş yıkılırken PFC'de sinaptik dopamin miktarının daha yüksek kaldığı tahmin edilmektedir; çünkü COMT'un talcapone ile inhibisyonunun dopamin miktarını arttırdığı

gözlenmiştir (48). Heterozigot bireylerde ise diğer ikisinin arasında bir dopamin seviyesi beklenir.

Val158Met polimorfizminin yanında COMT geni üzerindeki diğer polimorfik noktaların da incelendiği bir çalışmada belli haplotipler arasında protein translasyonu seviyesinde farklar olduğu gösterilmiştir (36). Val158Met COMT polimorfizminin getirdiği prefrontal dopamin seviyesi farklılıklarının organizma düzeyindeki etkileri de incelenmiştir. Egan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (13) Val158 homozigot bireyler yürütücü işlevlerin ölçüldüğü Wisconsin Card Sorting Test'te (WCST) Met158 bireylerden daha başarısız sonuçlar elde etmiştir; ancak gruplar arasında ölçülmüş genel akademik yeteneklerde fark bulunmamıştır. Ayrıca yine aynı çalışmada, fonksiyonel MR ölçümleri göstermiştir ki, belirli bir performans düzeyine erişmek için Val158 bireylerin dorsolateral PFClerinde daha fazla aktivasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da Val158 bireylerin PFC'sinin daha "verimsiz" çalıştığını göstermektedir. Fakat Solis-Ortiz ve arkadaşlarının çalışmasında orta yaşta kadınlar (48-65 yaş) Val/Val genotipi WCST'de ve seçici dikkati ölçen stroop testinde yüksek performans gösterirken sürdürülebilir dikkat ve sözel akıcılık testi performansı ile COMT Val158Met genotipi arasında ilişki bulunamamıştır (46).

Linkaj çalışmalarının meta-analiz sonuçları (5, 25) ve 22. kromozomda COMT geninin de bulunduğu bir bölgedeki (22q11) delesyonun sebep olduğu velocardiofacial sendrom'lu (VCFS) bireylerde şizofreninin görülme sıklığının ~%25 olması (34) COMT'un şizofreninin biyolojik temelinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan asosiyasyon çalışmalarında Val158 alleli şizofreniyle ilişkilendirilmiştir (13, 57) ancak negatif sonuçlu çalışmalar da bulunmaktadır (37, 47). Matsumoto ve arkadaşları (30) yaptıkları post-mortem çalışmada şizofreni hastalarının dorsolateral prefrontal kortekslerindeki ortalama MB-COMT mRNA miktarının sağlıklı bireylerle aynı olduğunu ancak sağlıklı bireylerde homojen dağılım gösteren mRNA'nın hastalarda yüzeysel kortikal tabakalarda daha az, derin tabakalarda daha çok miktarda bulunduğunu göstermiştir. Ancak grup bu dağılım farklılığıyla Val158Met polimorfizmi arasında ilişki bulunamamıştır.

#### 2.2.4. Şizofrenide EEG Sinyalleri

Şizofreni hastalarının İOİP bileşenlerinden özellikle N100 ve P300 yanıtlarının genliğinin azaldığı, ve bu azalmaların hastalığın bazı belirtileri ile ilişkili olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (24, 49, 53, 56). Aynı çalışmalarda yine özellikle N100 ve P300

latanslarında uzama bulunmuştur.

Pek çok çalışmada şizofreni hastalarında MMN yanıtının genliğinin düştüğü gözlenmiştir ve farklı dopamin antagonisti antipsikotikler bu bozulmayı düzeltememektedir (35).

#### 2.2.5. Şizofreni Genetiği ve Endofenotip Yaklaşımı

Şizofreninin genetik ve biyolojik temelleri olan bir beyin hastalığı olduğu kabul edilmektedir. Yapılan aile çalışmaları hasta yakınlarında şizofreni görülme riskinin kontrollerin akrabalarına oranla yaklaşık 10 kat fazla olduğunu göstermiştir (22). İkiz çalışmalarıyla şizofreniye yatkınlığın kalıtsallığının yaklaşık %80 olduğu hesaplanmıştır (9). Ancak hastalığın heterojen alt tipleri ve Mendel kalıtımını takip etmemesi gibi sebeplerle şizofreniye yatkınlık genlerinin incelenmesi zorlaşmaktadır. Çok genin etkili olduğu, çevresel etkenlerin de hastalık riskini değiştirdiği çalışmalarda genetik temelleri araştırmadaki zorluklar “endofenotip” yaklaşımıyla aşılmaya çalışılmaktadır. Endofenotip kavramı, ilk olarak bir biyokimyasal test ya da mikroskopik incelemeler ile saptanabilecek iç fenotipler olarak tanımlanmışken (20), günümüz genetik çalışmalarında hastalık genleri ile ilişkili olan ancak açık klinik görünüme yol açmayan, nesnel olarak ölçülebilen ara özellikleri tanımlamada kullanılmaktadır.

Şizofreni genetiği çalışmalarında elektrofizyolojik endofenotiplerin kullanılmasıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Son yıllarda çalışılan bu endofenotiplerden biri prefrontal P300 değerleri ve prefrontal “gürültü”dür (elektrofizyolojik yanıt değişkenliği). Gallinat ve arkadaşları (16) *COMT* geninin Met158 allelini taşıyan homozigot bireylerin (özellikle şizofrenik bireylerin) seyrek uyaran paradigmasında daha düşük genlikte frontal P300 yanıtları oluşturduğunu göstermiştir. Winterer ve arkadaşları (54) prefrontal gürültünün işleyen bellek performansı ile negatif korelasyon gösterdiğini, şizofren bireylerde prefrontal gürültünün sağlık bireylerden daha fazla olduğunu, şizofrenlerin şizofren olmayan kardeşlerinde ise bu değerlerin iki grubun arasında olduğunu bulmuştur. Winterer ve arkadaşları prefrontal gürültünün ve *COMT* genotipinin incelendiği başka bir çalışmada (55) da aynı şekilde “gürültü” değerinin kontrol bireylerinde şizofrenlerin şizofren olmayan kardeşlerine göre daha az olduğunu ve şizofren bireylerde en yüksek olduğunu gösterirken Val158 homozigot bireylerin “gürültü” seviyesinin anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemiştir.

Egan ve arkadaşları (13) yürütücü işlevler ile *COMT* Val158Met polimorfizmi arasında

ilişki bulduğu ve hastalarda Val158 allelinin daha sık görüldüğünü belirttiği çalışmada aynı zamanda şizofreni hastalarının yine şizofreni olan çocuklarına COMT Val158 allelini diğer çocuklarından daha sık aktardıkları da belirtilmiştir.

Literatürde 22q11 kromozom delesyonu olan bireylerde COMT Val158Met genotipinin MMN'e etkileri incelenmiş ancak kontrol grubu olarak belirlenen idyopatik şizofreni riski yüksek bireylerde sayı yetersizliğinden dolayı aynı analiz yapılamamıştır (6). MMN yanıtı ve COMT polimorfizmi ilişkisini inceleyen bu tek yayında 22q11 delesyonlu bireylerin frontal elektrotlarda kontrol bireyelerine göre daha düşük genlikli MMN yanıtlarına sahip oldukları ve bu azalmanın, sağlam kromozomunda Met158 alleli taşıyan bireylerde Val158 taşıyan bireylere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir.

### 3. **GEREÇ VE YÖNTEM**

Araştırmanın Tipi: Deneysel tanımlayıcı bir araştırma yapılmıştır.

Araştırmanın Yeri ve Zamanı: Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik AD Laboratuvarlarında, 2006-2011 yılları arasında Psikiyatri AD ile birlikte yapılmıştır. Genetik çalışmalar Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Bu tez Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'nca desteklenen 2006.KB.SAG.038 numaralı projenin bir kısmını içermektedir.

Çalışma Evreni ve Örneklemi: Çalışmada kontrol grubu ve hasta grubu kullanılmıştır. Hasta grubu Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne başvurmuş ve şizofreni tanısı almış bireylerden seçilmiştir. Kontrol grubu "sağlıklı toplumdan" seçilen, daha önce psikiyatri tedavisi görmemiş ve halen herhangi ruhsal bir hastalığı olmayan kişilerden oluşturulmuştur.

*Çalışmaya dahil edilme kriterleri;*

1. Olgu grubundakilerin DSM-IV Şizofreni Tanı ölçütlerini karşılaması
2. Yazılı bilgilendirilmiş olur verebilme
3. 18-55 yaş arası
4. Okur yazar olmak

*Dışlama kriterleri;*

1. Kontrol grubundaki kişilerde herhangi psikiyatrik hastalık geçmişi olması
2. Olgu grubundaki bireylerin son 6 ay içinde EKT uygulaması almış olması
3. Kontrol ve olgu grubundaki kişilerde nörolojik hastalık bulunması
4. 55 yaşın üzerinde olmak

2006.KB.SAG.038 numaralı projedeki 37 hasta ve 18 sağlıklı gönüllü katılımcıdan işitme sorunu bulunmayan (SibelMed odyometri cihazı ile yapılan ölçümde 2000 Hz ve altındaki frekanslarda iki kulak işitme eşiği değerleri arasında 10 dB'den fazla fark bulunmayan), İUP, İOİP ve MMN verileri bulunan 17 şizofreni hastası ve 17 sağlıklı katılımcı çalışmaya alınmıştır.

Çalışma Materyali: Katılımcıların saçlı deriden ölçülen EEG sinyalleri ve venöz kandan elde edilen DNA örnekleri üzerinde çalışılmıştır.

Araştırmanın Değişkenleri: Çalışmadaki bağımsız değişkenler 6 elektrot bölgesinde ölçülen, farklı paradigmalarda elde edilmiş işitsel uyarılmış ve olay ilişkili potansiyellerin latans ve genlik değerleri, hastaların *COMT* Val158Met genotipi ve olay ilişkili potansiyellerden elde edilmiş grup ortalamasının sinyal/gürültü oranıdır. Bu bağımsız değişkenler ileryen bölümlerde ayrıntılı olarak anlatılmaktadır. Kontrol değişkeni ise yaş ve cinsiyettir.

Verilerin Toplama Araçları: EEG verilerinin toplanmasında 64 kanallı Synamps amplifikatör, Scan yazılımı, EMISU uyarın ünitesi ve kayıt bilgisayarı, genotiplendirme işlemlerinde yatay elektroforez sistemi, UV jel görüntüleme sistemi, programlanabilir termal döngü cihazı kullanılmıştır.

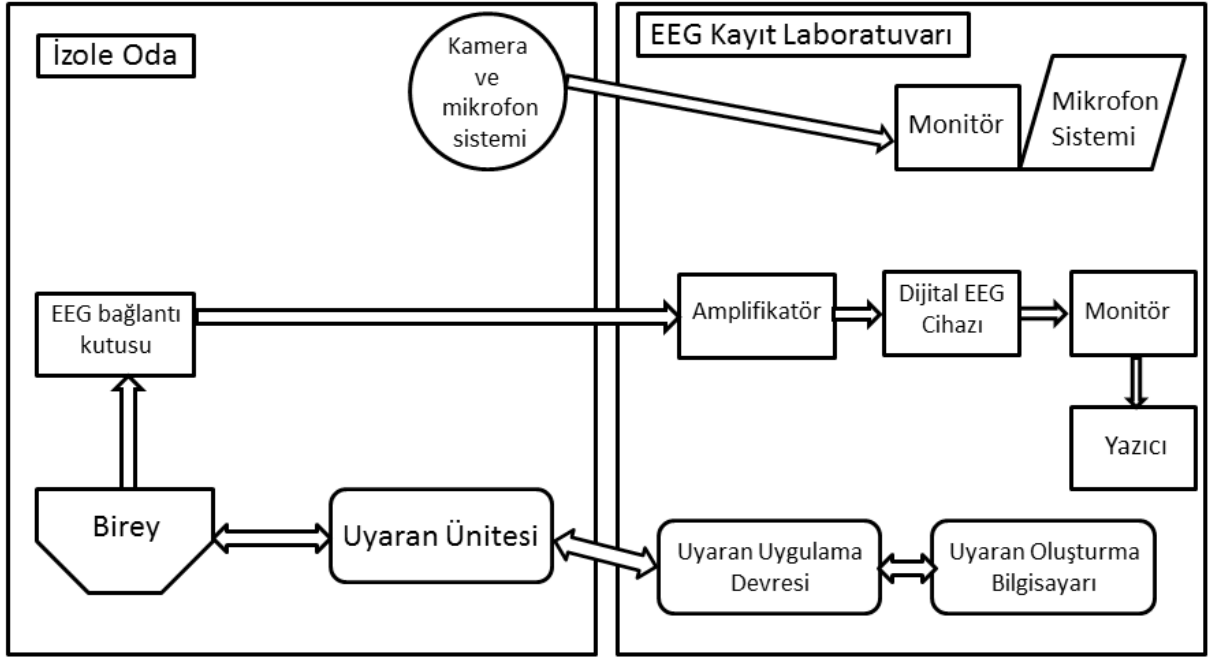
Araştırmanın Sınırlılıkları: Genetik çalışmaya katılan katılımcı sayısı genetik etkilerin istatistiksel anlamlılığını göstermek için yetersizdir. Bu çalışma deseni hastalarda görülen elektrofizyolojik değişimlerin tedaviden etkilenip etkilenmediğini göstermek için uygun değildir.

Etik Kurul Onayı: Çalışmanın etik kurul onayı Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 24 Nisan 2008 tarih ve 05/09/2008 numaralı toplantıda 34/2008 protokol numarasıyla alınmıştır. Etik kurul onayının bir kopyası ekte bulunmaktadır.

### **3.1. Elektrofizyolojik Veri Elde Edilmesi**

Bireylerin EEG kaydı elektromanyetik ve akustik yalıtımlı, hafifçe aydınlatılmış odada (Şekil 2), Synamps marka 64 kanallı amfide yükseltgenerek Scan (sürüm 4.2 ve 4.3) yazılımıyla alınmıştır.

Ses uyarılarının dinletilmesi ve eş zamanlı olarak EEG verisi üzerine işlenmesi MatLab 7.0.1 programı ve EMISU isimli gömülü işlemci ünitesi aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. EEG kulak memelerine ortak referans elektrotları yerleştirilerek alınmıştır. Kayıt örnekleme hızı 1000 Hz'tir. Şebeke elektriği gürültüsünden kurtulmak üzere çevrim içi olarak 50 Hz'lik çentik (notch) filtre uygulanmıştır. Çevrim dışı analizler için Scan (sürüm 4.5) yazılımı kullanılmıştır. Ölçümler F3, F4, FCz, P3, P4, CPz elektrotlarında gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 2: EEG kayıt laboratuvarının tasarımı**

### 3.1.1. İşitsel Uyarılmış Potansiyeller (İUP)

İşitsel uyarılmış potansiyellerin elde edilebilmesi için tek tip ses uyarımı (500 ms süreli, 80 dB SPL şiddetinde, 1500 Hz sinusoidal) toplam 60 kez, uyarılar arası süre 2,5 ile 5,0 saniye arasında değişecek şekilde kişiye kulaklıklar yardımıyla, iki kulaktan birden dinletilmiştir.

Sürekli EEG verileri uyarının verildiği anın 1000 ms öncesi ve 1000 ms sonrasını kapsayacak şekilde bölümlenmiştir. İlk uyarana ait bölüm atılıp göz kırpması ve hareket benzeri artefaktların bulunduğu bölümlerin ayıklanmasından sonra kalan verilerin uyarın öncesi bölgeye göre "baseline" düzeltilmesi yapılmış, verilere 0.5-48 Hz bant geçiren filtre uygulandıktan sonra sonra verilerin ortalaması alınarak olay ilişkili potansiyeller elde edilmiştir.

### 3.1.2. İşitsel Olay İlişkili Potansiyeller (İOİP)

İşitsel Olay ilişkili potansiyellerin oluşturulabilmesi için seyrek uyarın paradigması uygulanmıştır. 500 ms'lik, 80 dB SPL şiddetinde, sinusoidal (hedef ses:1600 Hz, hedef olmayan ses:1500 Hz) ses kulaklıklar yardımıyla iki kulaktan birden katılımcılara dinletilmiştir. Uyarınlar arası süre 2,5-5 sn'dir. Toplam 120-140 uyarın dinletilmiştir ve bu



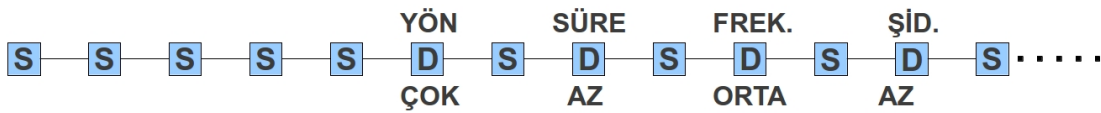
uyaranların yaklaşık %25'i hedef uyarandır.

Sürekli EEG verileri, uyaranın verildiği anın 1000 ms öncesi ve 1000 ms sonrasını kapsayacak şekilde bölümlenmiştir. İlk uyarana ait bölüm atılıp göz kırpma ve hareket benzeri artefaktların bulunduğu bölümlerin ayıklanmasından sonra kalan verilerin uyarın öncesi bölgeye göre "baseline" düzeltilmesi yapılmış, verilere 0.5-48 Hz bant geçiren filtre uygulandıktan sonra sonra verilerin ortalaması alınarak olay ilişkili potansiyeller elde edilmiştir.

Sinyal gürültü oranını gösterebilmek üzere hasta grubundaki genotip gruplarına ait hedef ve hedef olmayan uyarılara verilen ortalama yanıtların tepeden tepeye N1-P2 genliği, uyarın öncesindeki 700-200 milisaniye arasına ait genlik değerlerinin quadratik ortalaması ölçülmüştür.

### 3.1.3. İşitsel Uyumsuzluk Negatifliği (MMN)

Naatanen ve arkadaşlarının (35) geliştirmiş oldukları optimum-1 MMN paradigmasının düzenlenmiş bir hali kullanılmıştır. Kayıt esnasında kişiye kulaklıklar yoluyla tonlar dinletilirken bilgisayar ekranı aracılığıyla da alt yazılı bir film sesi kapatılmış olarak izletilmiştir. Sesler, her bir standart tondan sonra değiştirilmiş ton gelecek şekilde dinletilmiştir. Tonlarda süre, şiddet, sıklık (frekans) ve yön olmak üzere dört farklı değişme tipi ve her değişme tipinin üç farklı büyüklük derecesi vardır. Oturum art arda dört standart tonun ardından bir standart bir değiştirilmiş ton arka arkaya gelecek şekilde toplam 964 (484 standart, 480 değiştirilmiş) ton içermektedir. Her bir değiştirilmiş ton tipinin her seviyesi 40 kez dinletilmiştir. 4 standart ve 4 değiştirilmiş tonun bulunduğu sekizli dizilerde her bir değişme tipi bir kez bulunmaktadır (Şekil 3).



### Şekil 3: MMN paradigmasında uyarın deseni

Arka arkaya 4 standart sesin dinletilmesiyle başlayan uygulama bir standart (S) ses bir değiştirilmiş (D) ses dinletilerek devam etmektedir. Her sekiz uyarandan 4'ü değiştirilmiş sestir ve bu her sekizli pakette bir yön, bir şiddet, bir süre, bir frekans değişimi yapılmış ses dinletilmektedir.

Kullanılan standart ton üç sinüsoidal bileşenden (523, 1046 ve 1569 Hz) oluşan, 80 dB'lik, 75 ms süreli sestir. Ses kulaklıkla, sağ ve sol kulaklıktan aynı anda, aynı şiddette dinletilmiştir. Bu yüzden kişi sesi tam karşısından geliyormuş gibi algılamıştır. Süresi değiştirilmiş seslerin süreleri 59, 43 ve 27 ms'dir. Şiddeti değişmiş seslerin şiddetleri 75, 70 ve 65 dB'dir. Sesin frekansındaki sapma azalma ya da artma şeklinde yapılmıştır. Frekansı değiştirilmiş seslerin temel frekansları artan frekans için 535, 562 ve 609 Hz, azalan frekans için 512, 487 ve 450 Hz'dir. Sesin algılanan yönü, kulaklar arası uyaran başlangıç zaman farkı oluşturulmasıyla elde edilmiştir. Oluşturulan kulaklıklar arası uyaran başlangıç zamanı farkları 100, 400 ve 700 µs, bu gecikmelere denk gelen açılal sapmalar sırasıyla 10, 40 ve 90°'dir (Tablo 1).

Sürekli veri, çevrim dışı olarak 600 ms'lik (100 ms uyaran öncesi) süpürümlere ayrılmıştır. Göz kırpmal bulaşlarından kurtulmak üzere her bireye ait veri incelendikten sonra veriye uygun olarak seçilen EOG ve/veya frontal EEG elektrotlarında ±50 (bazı bireylerde ±75) µV aralığının dışında değerlere sahip olan süpürümler otomatik olarak silinmiştir. Yüksek posterior alfa aktivitesi gösteren bireylerde artefakt belirleme elektrodu olarak PZ ya da OZ elektrodu seçilmiştir. "Baseline" düzeltmesi uyaran öncesi bölgeye göre yapılmış, 0,5-48 Hz bant geçiren filter uygulanmıştır. Farklı uyaran tiplerine ait süpürümler kendi içinde gruplanıp ortalamaları alınmıştır. 100-300 ms aralığındaki minimum tepe noktasının genlik ve latansı olarak ölçülmüştür. Ayrıca her bireyin süre ve şiddet değişkenlerinde 120-240 ms, frekans ve yön değişimlerine ait yanıtlarda ise 100-220 ms arasındaki ortalama genlik değerleri ölçülmüştür.

**Tablo 1: MMN paradigmasındaki uyanların ses özellikleri**

Dört farklı özellikte, üç farklı seviyede farklılık gösteren toplam 12 değişmiş ses ve 1 standart sesin özellikleri. KAZF: Kulaklar arası uyaran başlama zaman farkı

		Süre (ms)	Şiddet (dB)	Frekans (Hz)	Yön(°) / KAZF(µs)
<b>Standart</b>		75	80	523	0°
<b>Değişmiş Ses</b>	<b>Az</b>	<b>59</b>	<b>75</b>	<b>535/512</b>	<b>10°/100</b>
	<b>Orta</b>	<b>43</b>	<b>70</b>	<b>562/487</b>	<b>40°/400</b>
	<b>Çok</b>	<b>27</b>	<b>65</b>	<b>609/450</b>	<b>90°/700</b>

### 3.2. Genetik Veri Elde Edilmesi

Genetik veriler sadece 14 hastada incelenmiştir. Genetik incelemeler için deneyimli sağlık personeli tarafından katılımcılardan K<sub>2</sub>EDTA içeren 2 ml'lik vakumlu tüplere periferik kan alınmıştır. Kanlar DNA izolasyonu yapılana kadar -20°C'de bekletilmiştir. Kandan DNA izolasyonu işlemi Roche DNA izolasyon kiti ile gerçekleştirilmiştir ancak yeterli DNA elde edilemeyen örneklerde fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanolle çöktürme metodu modifiye edilip uygulanmıştır. İki yöntemden biriyle elde edilen genomik DNA örnekleri çalışmalarda kullanılmak üzere tekrar -20°C'de saklanmıştır. Genomik DNA'dan polimeraz zincir tepkimesi (PCR: polymerase chain reaction) ile çoğaltılan uygun bölgeler dizi analizi ile incelenip Val158Met polimorfik noktasına göre genotiplendirme yapılmıştır.

#### 3.2.1. DNA İzolasyonu

“Roche DNA izolasyon kiti” ile yapılan DNA elde etme işleminde 200 µl'lik kan örneği ürünün kendi kılavuzunda belirtilen işlemlere (EK 2) maruz tutulmuştur. Örnekler %0,8'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra yeterli miktarda DNA gözlenebiliyorsa örnekler kullanılmaya kadar -20°C'ye kaldırıldı. Yeterli DNA elde edilemeyen kişilere ait kan örneğinden fenol-kloroform ile DNA elde etme işlemi başlatıldı.

Fenol-kloroform ekstraksiyonu/etanolle çöktürme yönteminin basamakları şu şekilde uygulanmıştır:

1. -20°C'de dondurulmuş kanın oda sıcaklığında çözülmesi beklendi.
2. 500 µl çözülmüş kan steril 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 400 µl 1x SSC tampon çözeltisi ilave edildi. Yavaşça vortekslendi. 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi.
3. 500 µl süpernatant pipet ile alınıp atıldı. Üzerine 500 µl 1x SSC tampon çözeltisi ilave edildi. Yavaşça vortekslendi. 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi.
4. 3. basamaktaki işlem 2 kez daha tekrarlandı.
5. Dipteki pelletin kalkmamasına dikkat edilerek süpernatantın tamamı pipet yardımıyla atıldı.
6. Her bir pellete 200 µl 0,2 M NaOAc (sodyum asetat) ilave edildi. Kısa süre yavaşça vortekslendi. 18 µl %10'luk SDS (sodyum dodesil sülfat) ilave edildi. Kısa süre yavaşça vortekslendi. 7,5 µl proteinaz K (20 mg/ml) ilave edildi. Kısa süre yavaşça

- vortekslendi.
7. Çözelti su banyosunda 55°C'de 1 saat 30 dakika inkübe edildi. Her 15 dakikada bir tüpler yavaşça vortekslendi.
  8. Çeker ocakta her bir tüpe 20 µl fenol/kloroform/isoamil alkol (25:24:1) ilave edildi. 30 saniye yavaşça vortekslendi. 3 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi.
  9. Üst sıvı faz 1.5 ml'lik yeni steril eppendorf tüpüne aktarıldı. 500 µl mutlak etanol ilave edildi. Yavaşça vortekslendi. -20°C'de 4 saat ya da 1 gece inkübe edildi.
  10. Tüpler 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Pelleti düşürmemeye dikkat ederek süpernatant atıldı. Tüpleri ağızları parafilm ile kapatıldı. Parafilmde küçük delikler açılıp tüpler yaklaşık bir saat kurumaya bırakıldı.
  11. 90 µl TE (tris-EDTA) tampon çözeltisi ilave edildi. Kısa süre yavaşça vortekslendi. Su banyosunda 55°C'de 15 dakika inkübe edildi.
  12. 10 µl 2 M NaOAc ilave edildi. Tüpler yavaşça vortekslendi. 250 µl soğuk mutlak etanol ilave edildi. Yavaşça vortekslendi. 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi.
  13. Pelleti düşürmemeye dikkat ederek süpernatant atıldı. Pellete 500 µl %80 soğuk etanol ilave edildi. 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi.
  14. Pelleti düşürmemeye dikkat ederek süpernatant atıldı. Tüpleri ağızları parafilm ile kapatıldı. Parafilmde küçük delikler açılıp tüpler yaklaşık bir saat 30 dakika kurumaya bırakıldı.
  15. 100 µl 10:1 TE tampon çözeltisi ile pellet yeniden süspansiyon edildi. Su banyosunda 55°C'de gece boyunca inkübe edildi.
  16. Tüpler su banyosundan alındı, %0,8'lik agaroz jelde yürütüldü ve yeterli DNA gözlenen örnekler -20°C'ye kaldırıldı.

### 3.2.2. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR)

Çalışılacak olan COMT Val158Met (rs4680) polimorfizmine uygun primerler dizayn edildi. Seçilen primerlerin, polimorfik noktanın ve enzimle kesilen diğer bölgelerin COMT geni üzerindeki yerleşimleri Tablo 2'de yer almaktadır. Oluşan ürünün uzunluğu 169 bp (baz çifti)'dir. Kit ile elde edilen DNA'lar 1:5, fenol-kloroform ile elde edilen DNA'lar ise 1:10 oranında seyreltilerek kullanıldı.

**Tablo 2: Primer bağlanma bölgeleri ve polimorfik nokta**

Primer bağlanma bölgeleri sarı, rs4680 polimorfik noktası kırmızı gösterilmiştir. Sol sütundaki sayılar aynı satırdaki ilk nükleotidin gen üzerindeki konumunu belirtmektedir.

<b>26881</b>	tgggggct <b>a</b> ctgtggctac tcagctgtgc gcatggcccg cctgctgtca ccaggggcca
<b>26941</b>	ggctcatcac catcgagatc aaccccgact gtgccgccat caccagcgg atggtggatt
<b>27001</b>	tcgctggc <b>t</b> gaaggacaag gtgtgcatgc ctgaccg <b>tt</b> gtcagacctg gaaaaaggc

Toplam hacmi 50 µl olacak şekilde hazırlanan PCR karışımının içeriği şu şekildedir:

Mastermix 2X (TaqPol+Tampon çözelti+dNTP) – Fermentas	25 µl
İleri Yönlü Primer (10 µM)	2 µl
Geri Yönlü Primer (10 µM)	2 µl
Distile Su (Apirojen, Enjeksiyonluk Su)	11 µl
Genomik DNA (1:10 ya da 1:5 seyreltilmiş)	10 µl

Techne TC-3000G termal döngü cihazında gerçekleştirilen tepkimenin parametreleri ise Tablo 3'de yer almaktadır.

### 3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez uygulamaları “Easycast Yatay Sistem” (Owl Separation Systems) elektroforez tanklarında gerçekleştirildi. %2'lik agaroz jel hazırlamak üzere erlen içinde 40 ml 0.5 X'lik TBE (Tris-borat-EDTA) tampon çözeltisine 0.80 gram agaroz (Prona) eklendi (genomik DNA örneklerinin yürütüldüğü %0,8'lik jel için 0,32 gram agaroz kullanıldı). Karışım yaklaşık 90 saniye mikrodalga fırında ısıtıldı. Jeli homojen olarak polimerleştirmek ve aşırı tampon çözelti buharlaşmasını önlemek için çözelti kaynamaya başladığında mikrodalga fırın durduruldu, çözelti karıştırıldı, ardından tekrar fırın çalıştırıldı. Bu işlem gerekirse bir kaç kez tekrarlandı. Ardından erlen çeşme suyu altında, tabanı elle tutulabilecek hale gelene kadar soğutuldu ve 2,5 µl Etidyum bromür (EtBr) eklendi ve erlen yavaşça çalkalandı. Elektroforez tankında taraklar yerleştirildi ve çözelti jel yatağına döküldü. Yaklaşık yarım saat jelin polimerleşmesi beklendikten sonra jel tank içinde 0.5 X'lik TBE tampon çözeltisine bırakıldı, taraklar çıkarıldı, kuyulara 5 µl PCR örneği (ya da genomik DNA) ve 1 µl yükleme boyası (6X'lik, Fermentas) eklendi. Yürütülen PCR örneklerinin doğru

uzunlukta olduklarının tayini için bir kuyuya 100 baz çiftlik basamaklar halinde artan boylarda çift iplikli DNA içeren 1 µl DNA işaretleyici (RBC marka), 1 µl yükleme boyası ile birlikte eklendi. PCR örnekleri 50 dakika, genomik DNA 60 dakika 90 V altında yürütüldükten sonra jel görüntüleme sisteminde (Vilber, Lourmat) UV altında görüntülenerek dijital görüntüler alındı.

**Tablo 3: PCR parametreleri**

COMT genine ait polimorfik Val158Met noktasını içeren diziyi üretmek için uygulanan PCR'ın basamaklarının sıcaklık ve süre bilgileri

İşlem		Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
İlk Denatürasyon		95	4
35 Döngü	Denatürasyon	95	30 sn
	Bağlanma	55	30 sn
	Uzama	72	1
Son Uzama		72	10

**3.2.4. Dizi Analizi**

Dizi analizi için yaklaşık 40 µl'lik PCR örnekleri ve ileri yönlü COMT primeri Macrogen (Seul, KORE) firmasına gönderilmiştir. Dizi analizinden gelen sayısal formattaki dosyalar Unipro UGENE yazılımı aracılığıyla incelenip Val158Met polimorfik bölgesindeki nükleotid verisi okunarak kişilerin genotiplendirmesi yapılmıştır.

#### 4. **BULGULAR**

Çalışmaya alınan ve analizlerde kullanılan hasta ve sağlıklı gönüllülere ait demografik veriler şöyledir.

Kontrol grubu: 17 kişi: 9 kadın, 8 erkek yaş aralığı: 21-50, yaş ort: 37,64±9,25; 11'i üniversite mezunu (eğitim yılı ort. 14.11± 3,77).

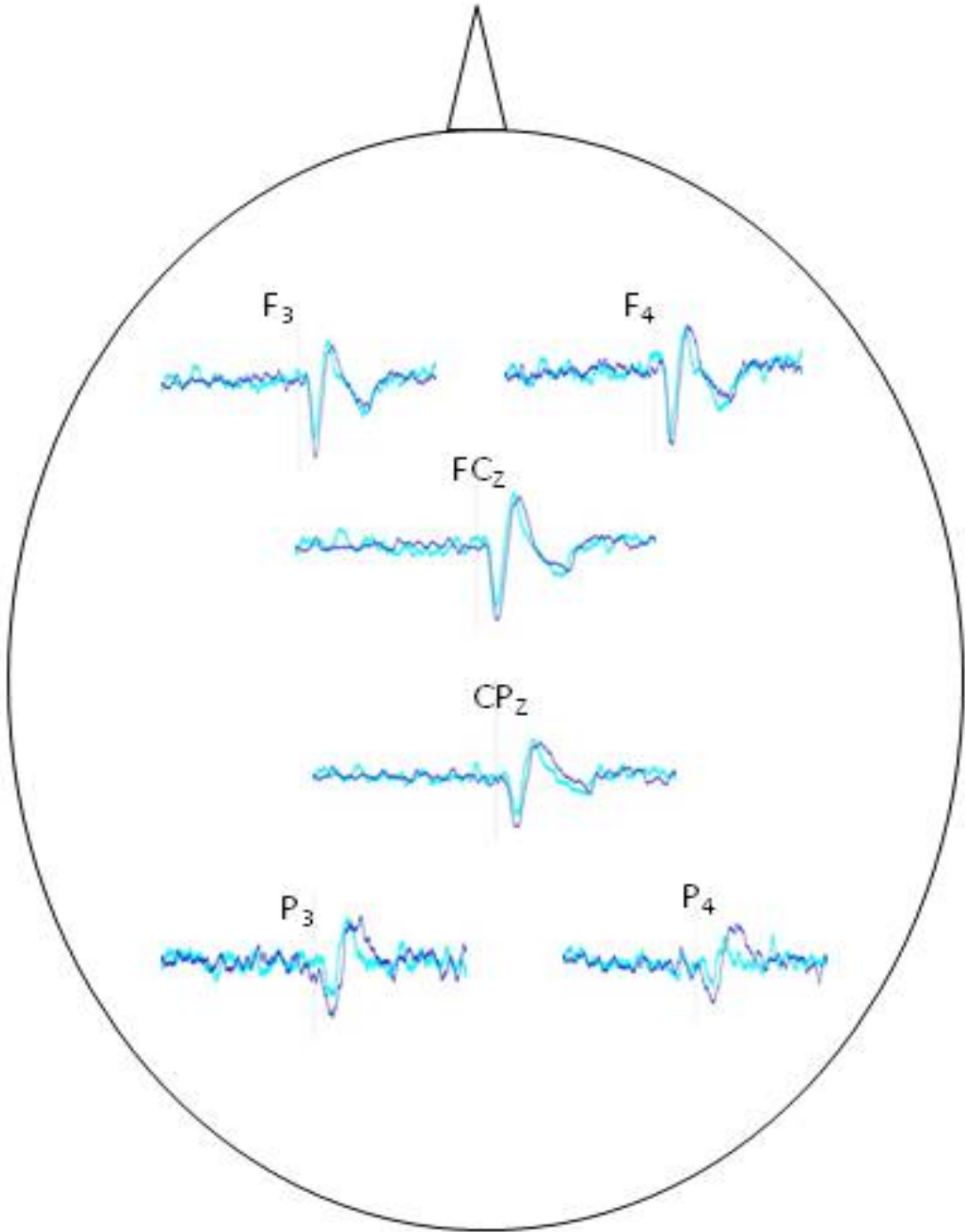
Hasta grubu: 17 kişi, 10 Erkek, 7 kadın, yaş aralığı: 23-54, yaş ort: 37±8,44; 3' ü üniversite, 9'u lise mezunu (eğitim yılı ort: 10,88± 3,42).

Tüm kontrol ve hastalardan elde edilen genetik ve elektrofizyolojik veriler aşağıda sunulmaktadır. Elektrofizyolojik verilerin incelenmesinde bilişsel uyarılmış potansiyellerden İUP, İOİP ve MMN üzerinde ayrı ayrı ve bütünsel olarak bulgular sunulmaktadır. Bütünselliğin gösterilmesinde frekans zaman grafikleri kullanılmaktadır.

##### 4.1. **Elektrofizyolojik Ölçümler**

###### 4.1.1. *İşitsel Uyarılmış Potansiyeller (İUP)*

İki grup sonuçları karşılaştırıldığında, 6 elektrotta işitsel uyarılmış potansiyellerin N100 ve P200 genlik ve latanslarının ölçümü sonucunda FCZ ve P4 elektrotlarındaki P200 latansının istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4).



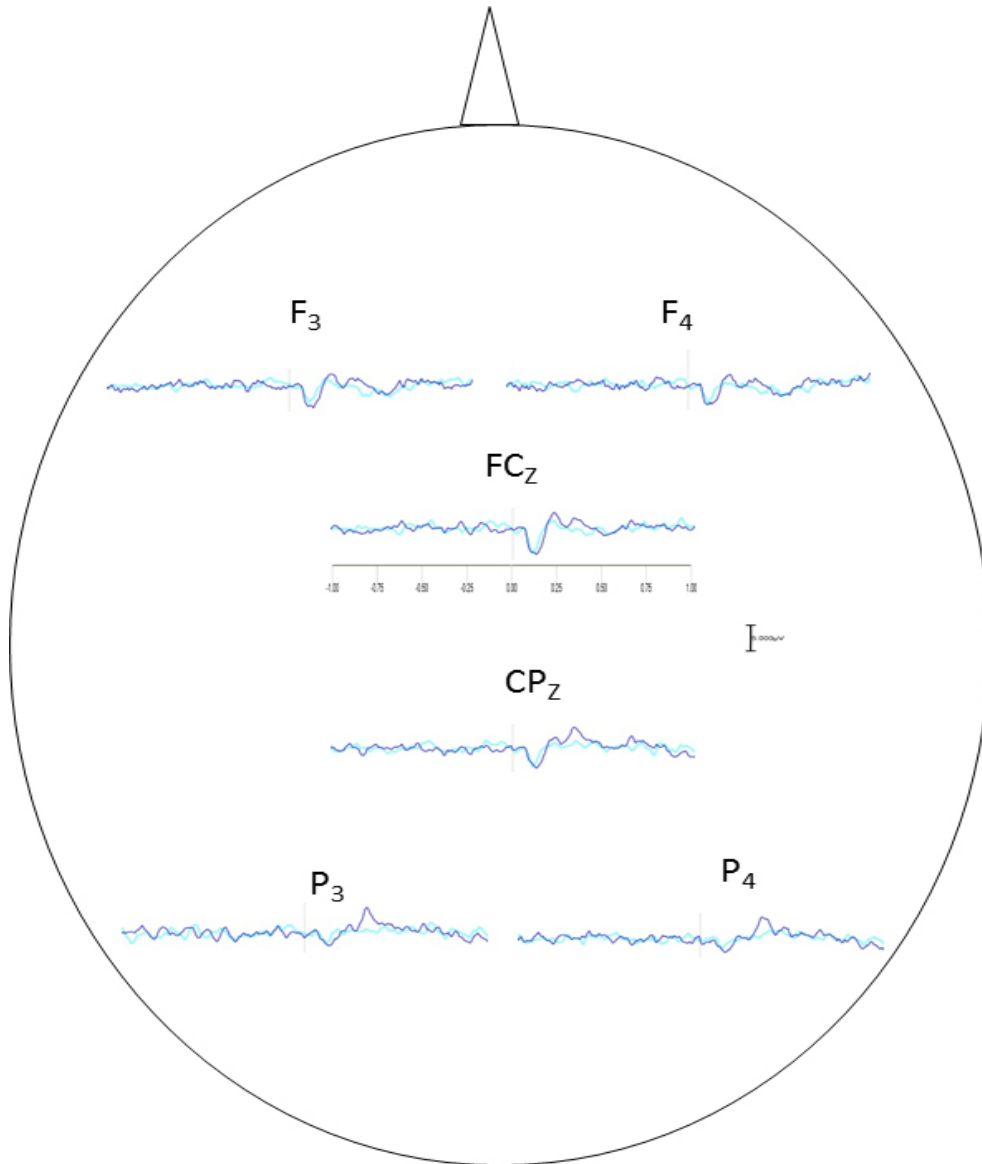
**Şekil 4: Hasta ve kontrollere ait İUP'lerin kafa üzerinde dağılımı.**

Hasta grubuna ait yanıt genel ortalaması açık mavi, kontrol grubuna ait yanıt genel ortalaması koyu mavi ile gösterilmiştir.



#### 4.1.2. İşitsel Olay İlişkili Potansiyeller (İÖİP)

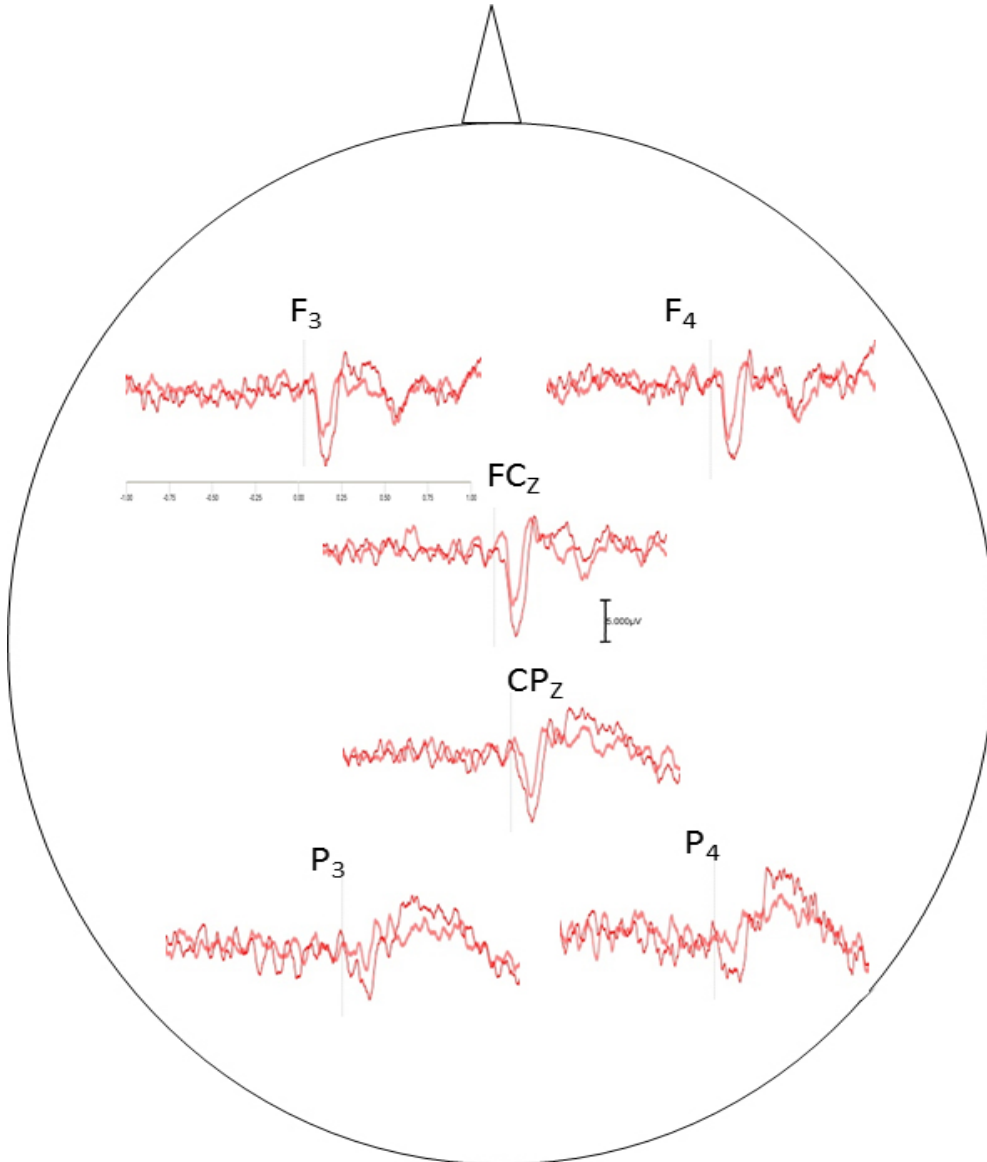
Seyrek uyarın paradigmasında **hedef olmayan** uyarana verilen yanıtlar incelendiğinde (Şekil 5) F3 elektrodunda N100 ve geç negatiflik latansının , F4 elektrodunda P200 ve P300 latansının, CPZ elektrodunda ise sadece N100 latansının hasta grubunda kontrol grubuna göre daha kısa olduğu görülmektedir ( $p<0.05$ ). Hedef olmayan uyarının elektrofizyolojik yanıtlarında gruplar arası herhangi bir genlik farkı bulunamamıştır.



**Şekil 5: Hedef olmayan uyarana ait yanıtlar**

Hasta grubuna ait yanıt genel ortalaması açık mavi, kontrol grubuna ait yanıt genel ortalaması koyu mavi ile gösterilmiştir.

Seyrek uyaran paradigmasında **hedef uyarana** ait işitsel olay ilişkili potansiyeller incelendiğinde (Şekil 6) hasta grubunun P200 latansı F3, F4 ve FCZ elektrotlarında, N200 latansı F3 elektrodunda ve geç negatiflik latansı FCZ elektrodunda kontrol grubundan kısa bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Hedef uyarana karşı oluşan olay ilişkili potansiyellerin genliklerinin gruplar arası karşılaştırması yapıldığında FCZ elektrodunda hastaların N100 genliğinin; FCZ, CPZ ve P3 elektrotlarında ise sağlıklı gönüllülerin geç negatiflik genliklerinin daha düşük olduğu görülmektedir ( $p<0.05$ ).



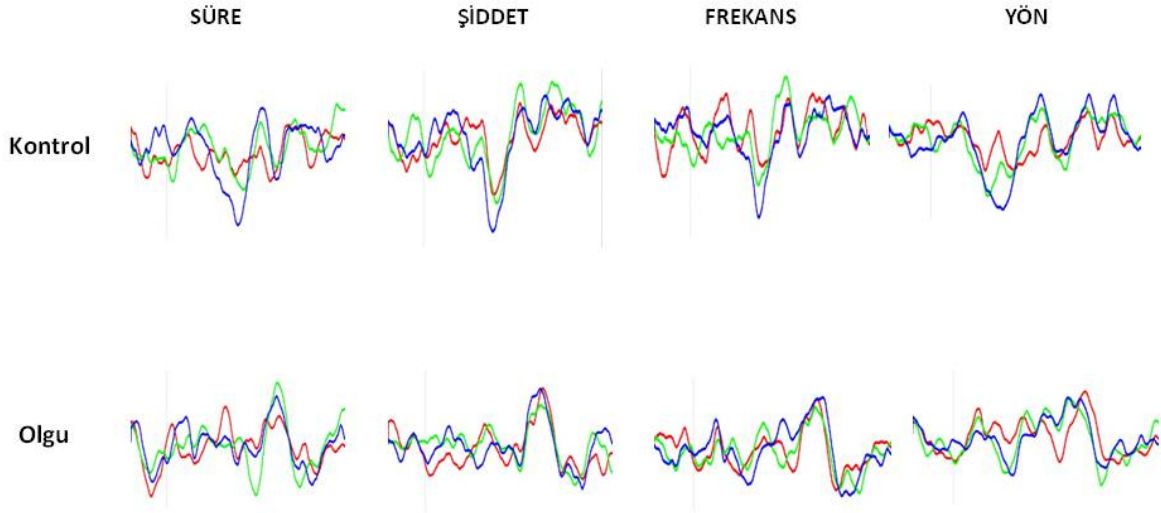
**Şekil 6: Hedef uyarana ait İÖİP'ler**

Hasta grubuna ait yanıt genel ortalaması açık kırmızı, kontrol grubuna ait genel ortalaması koyu kırmızı ile gösterilmiştir.

#### 4.1.3. Uyumsuzluk Negatifliği (MMN)

Analizler yapıldığında, MMN tepe noktası latans ölçümleri incelendiğinde 2. dereceden frekans sapması olan seste P4 elektrodunda hastaların MMN latansı gecikmiştir. 1. dereceden yön sapması olan seste FCZ, 3. dereceden yön sapması olan seste ise P4 elektrodunda hastaların MMN yanıtının gecikmiş olduğu görülmektedir ( $p<0.05$ ). MMN tepe noktası genlikleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Kişilerin 120 ms'lik zaman kesitindeki ortalama MMN genlikleri ölçüldüğünde ise 3. dereceden süre sapması olan seste CPz ve P4; 2. dereceden şiddet sapması olan seste P4; 3. dereceden şiddet sapması olan seste P3, P4 ve CPz; 2. dereceden frekans sapması olan seste P4; 2. dereceden yön sapması olan seste CPz elektrodunda hasta grubunun MMN yanıtlarının daha küçük olduğu gözlenmektedir ( $p<0.05$ ). Grupların ortalama MMN yanıtları Şekil 7'de verilmektedir.



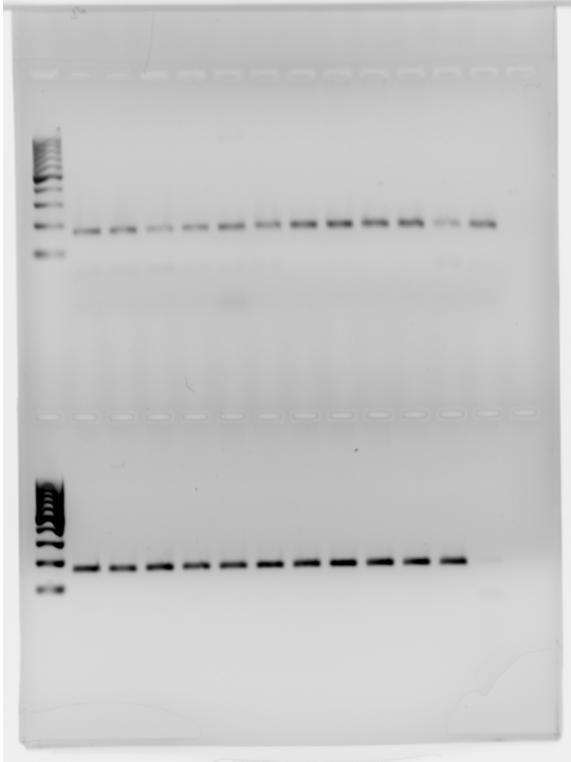
**Şekil 7: CPz elektrodundan ölçülen MMN yanıtları.**

Üst satırda kontrol, ikinci satırda hasta grubunun farklı tipte ve derecede ses değişmelerine verilen MMN yanıtları görülmektedir. En yüksek dereceden sapma olan uyarılar mavi, orta derecede sapma olanlar kırmızı, en az sapma olanlar yeşil ile gösterilmiştir.

#### 4.2. Genetik Değerlendirme

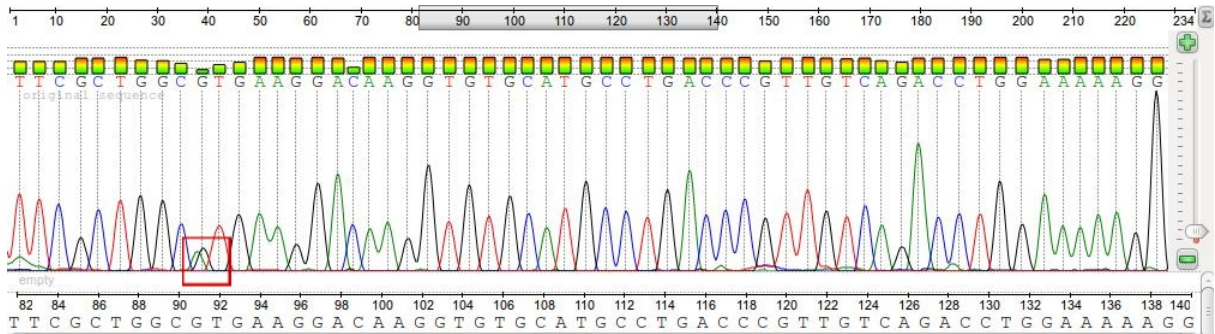
Tasarlanan primer çifti ve PCR parametreleri, özgün olarak sadece 169 baz çiftlik DNA dizisini üretmiştir (Şekil 8). DNA dizi analizi sonuçları da PCR ile çoğaltılan bölgenin, çoğaltılması istenen bölgeyle aynı olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 9).

Genotiplendirmesi yapılan 14 hastadan 7'si Val/Met heterozigot, 4'ü Val/Val homozigot, 3'ü Met/Met homozigottur. Bu dağılım Hardy-Weinberg kuralına uygundur ( $\chi^2=0,0004$ ). Val ve Met allel frekansları sırasıyla 0,54 ve 0,46'dır.



**Şekil 8: Agaroz jelde yürütülmüş PCR ürünleri**

PCR ürünlerinin yaklaşık 169 baz çiftlik olduğu görülebilmektedir. Hiçbir örnekte özgün olmayan DNA bölgesi çoğaltılmamıştır.



**Şekil 9: Örnek bir dizi analizi sonucu**

Dizi analizi sonucu elde edilen florasan tepe takibi kromatogramının incelenmesi sonu Val158Met genotiplendirmesi yapılmaktadır. Bu örnekte kırmızı kare içinde gösterilen 91. konum için yaklaşık aynı değerde iki tepe oluşmuştur. Bu durum, o kişinin Val/Met heterozigot bir birey olduğunu göstermektedir.

#### 4.2.1. Genetik ve İOİP'ler

Genotip gruplarının sayısı küçük olduğu için elektrofizyolojik yanıtlar ve genotip ilişkisini incelemek üzere istatistiksel karşılaştırma yapılamamaktadır. Ancak işitsel olay ilişkili potansiyel verilerinin hastalarda farklı genotip gruplarındaki tanımsal istatistik verilerine Tablo 4 ve Tablo 5'ten ulaşılabilir. Yer kısıtlılığı nedeniyle sadece CPz elektroduna ait bilgiler verilmiştir.

**Tablo 4: Farklı Genotiplerde İOİP Bileşenleri**

Seyrek uyaran paradigması hedef uyarısında CPz elektrodunda elde edilen İOİP'lerin tepe noktaları genlik ve latanslarının farklı genotiplerdeki hastalarda (N: genotip grubundaki hasta sayısı) ortalama ( $\bar{x}$ ), standart sapma (SS), minimum (min) ve maksimum değerleri (maks).

	Genotip	N	$\bar{x}$	SS	Min	Maks
N100 Latansı	Met/Met	3	105	10,54	95	116
	Val/Met	7	102,86	35,15	51	143
	Val/Val	4	119	15,30	104	140
N100 Genliği	Met/Met	3	-8,87	3,04	-11,1	-5,4
	Val/Met	7	-5,64	3,46	-12,3	-1,4
	Val/Val	4	-7,62	4,23	-12,3	-2,5
P200 Latansı	Met/Met	3	213,67	61,34	159	280
	Val/Met	7	217,57	43,32	153	284
	Val/Val	4	180,50	7,94	173	190
P200 Genliği	Met/Met	3	3,97	3,91	-0,5	6,8
	Val/Met	7	5,37	4,22	0,2	11,6
	Val/Val	4	6,82	4,80	0,4	10,6
N200 Latansı	Met/Met	3	307,33	68,16	242	378
	Val/Met	7	314,71	49,71	231	382
	Val/Val	4	236,50	20,37	211	257
N200 Genliği	Met/Met	3	-1,20	2,21	-3,5	0,9
	Val/Met	7	-2,36	1,95	-3,9	1,2
	Val/Val	4	-2,94	2,91	-7,1	-0,4
P300 Latansı	Met/Met	3	342,67	73,12	280	423
	Val/Met	7	417,71	50,92	317	455
	Val/Val	4	380	51,39	351	457
P300 Genliği	Met/Met	3	4,40	1,00	3,4	5,4
	Val/Met	7	4,94	2,13	2,6	8,9
	Val/Val	4	3,42	0,72	2,5	4,0
Geç Negatiflik Latansı	Met/Met	3	451,67	107,22	331	536
	Val/Met	7	513,43	75,61	366	616
	Val/Val	4	468,50	62,68	410	546
Geç Negatiflik Genliği	Met/Met	3	-4,40	1,13	-5,7	-3,7
	Val/Met	7	-3,21	2,74	-8,1	-0,3
	Val/Val	4	-3,05	2,30	-5,4	-0,4

**Tablo 5: Farklı Genotiplerde MMN Genliği**

MMN paradigmasında CPz elektrodunda elde edilen MMN ortalama genliklerinin farklı genotiplerdeki hastalardaki ortalama ( $\bar{x}$ ), standart sapma (SS), minimum (min) ve maksimum değerleri (maks). N, her genotip grubundaki hasta sayısıdır.

	Genotip	N	$\bar{x}$	SS	Min	Maks
Süresi Az Sapmış Uyarın	Met/Met	3	-0,36	1,29	-1,675	0,913
	Val/Met	7	0,81	2,14	-2,326	4,066
	Val/Val	4	-0,11	0,59	-0,798	0,602
Süresi Orta Derecede Sapmış Uyarın	Met/Met	3	-0,28	0,69	-1,021	0,335
	Val/Met	7	0,21	1,80	-2,021	2,837
	Val/Val	4	-1,35	1,29	-2,571	0,449
Süresi Çok Sapmış Uyarın	Met/Met	3	-1,03	0,84	-1,522	-0,063
	Val/Met	7	0,30	1,15	-1,163	2,112
	Val/Val	4	1,06	1,39	-2,039	0,996
Şiddeti Az Sapmış Uyarın	Met/Met	3	0,31	0,80	-0,607	0,868
	Val/Met	7	-0,01	1,31	-2,114	2,011
	Val/Val	4	-0,97	0,82	-1,465	0,247
Şiddeti Orta Derecede Sapmış Uyarın	Met/Met	3	0,02	1,12	-1,173	1,062
	Val/Met	7	-0,31	1,87	-4,132	1,540
	Val/Val	4	-0,29	0,93	-1,046	1,018
Şiddeti Çok Sapmış Uyarın	Met/Met	3	-0,55	0,68	-3,667	0,084
	Val/Met	7	0,08	2,05	-1,247	2,948
	Val/Val	4	-1,14	1,33	-2,548	0,548
Frekansız Az Sapmış Uyarın	Met/Met	3	0,65	0,70	-0,81	1,321
	Val/Met	7	-0,02	0,94	-1,323	1,168
	Val/Val	4	-0,14	0,66	-1,032	0,544
Frekansız Orta Derecede Sapmış Uyarın	Met/Met	3	-0,80	0,72	-1,355	0,013
	Val/Met	7	0,36	1,45	-2,177	2,401
	Val/Val	4	0,71	0,84	-1,915	-0,017
Frekansız Çok Sapmış Uyarın	Met/Met	3	0,90	0,43	-1,339	-0,479
	Val/Met	7	-0,10	2,31	-4,689	2,508
	Val/Val	4	-0,46	0,14	-0,625	-0,286
Yönü Az Sapmış Uyarın	Met/Met	3	-0,53	0,72	-1,147	0,255
	Val/Met	7	0,48	1,34	-0,974	2,417
	Val/Val	4	-0,01	0,53	-0,595	0,514
Yönü Orta Derecede Sapmış Uyarın	Met/Met	3	-0,27	0,35	-0,596	0,108
	Val/Met	7	0,06	1,02	-1,164	1,578
	Val/Val	4	-0,69	0,75	-1,494	0,277
Yönü Çok Sapmış Uyarın	Met/Met	3	-1,11	0,46	-1,501	-0,598
	Val/Met	7	0,11	1,67	-1,961	2,746
	Val/Val	4	-0,76	1,62	-2,558	1,363

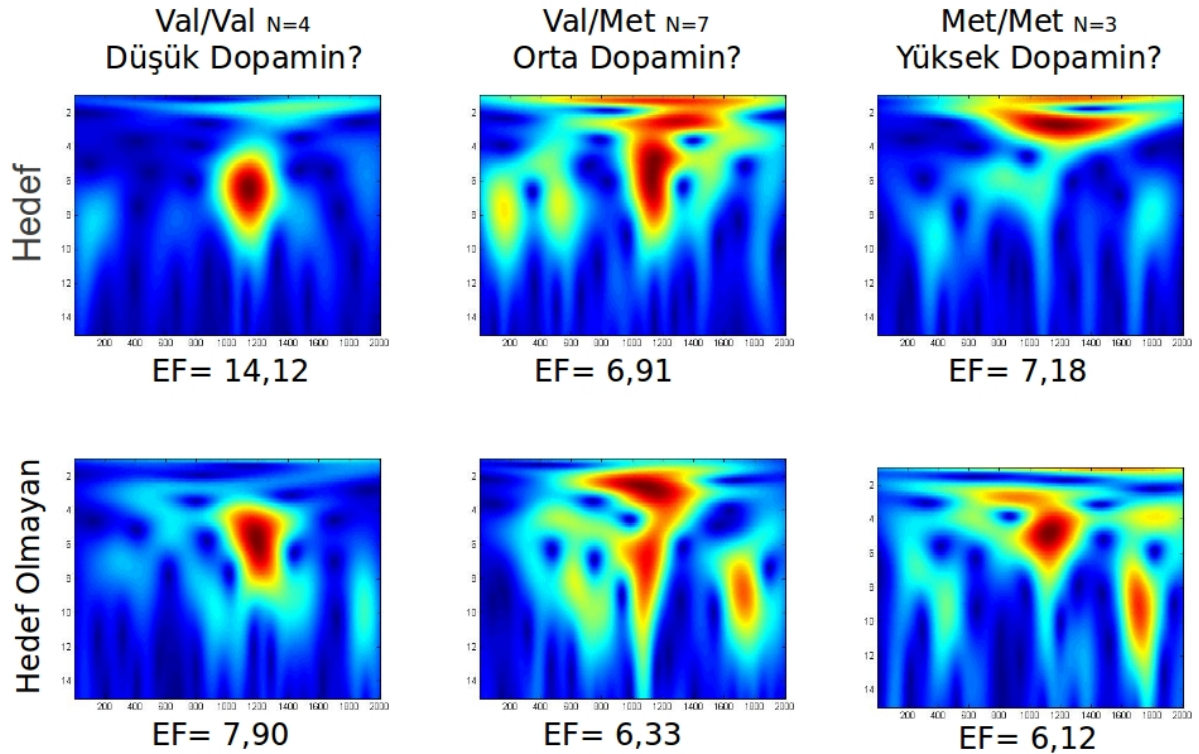
#### 4.2.2. Genetik ve EEG sinyal kalite ölçümleri

İÖİP'lerde sinyal gürültü oranı için dolaylı ölçüm yaklaşımı olarak yapılan güçlenme faktörü (Enhancement Faktör) ölçüm sonuçları Tablo 6'de yer almaktadır. Tabloya göre şizofreni hastalarında hedef uyarana verilen yanıtlarda Val/Val grubu en yüksek güçlenme faktörüne (sinyal gürültü oranına) sahiptir. Bunu Val/Met ve Met/Met grupları izlemektedir. Gruplara ait İÖİP'lerin sürekli dalgacık dönüşümü ile elde edilen zaman frekans gösterimleri ise Şekil 10 'de gösterilmektedir.

**Tablo 6: Genotipe göre güçlenme faktörü değerleri**

Seyrek uyarın paradigması oturumunda hedef ve hedef olmayan uyarılara karşı oluşan elektrofizyolojik yanıtların uyarın öncesi 700-200 ms dönemindeki genliklerinin kuadratik ortalaması (RMS), tepeden tepeye maksimum genlik değeri (PP Max) ve Bunların oranı olan güçlenme faktörü (EF)

	Val/Val		Val/Met		Met/Met	
	Hedef	Hedef olmayan	Hedef	Hedef olmayan	Hedef	Hedef olmayan
RMS	0,93	1,24	1,38	1,13	1,44	1,27
PP Max	13,13	9,76	9,52	7,14	10,35	7,80
EF	14,13	7,90	6,91	6,33	7,18	6,12



**Şekil 10: COMT genotip gruplarına göre İÖİP'lerin zaman-frekans gösterimi**

Hedef ve hedef olmayan uyarılara verilen yanıtlar hasta grubundaki farklı COMT genotiplerine göre gösterilmiştir. Sıcak renkler artmış gücü ifade etmektedir.



## 5. TARTIŞMA

Bu tez, ilaç kullanan 17 şizofreni hastası ve 17 kişiden oluşan kontrol grubunun elektrofizyolojik incelemesini içermektedir. Ayrıca 14 kişilik hasta alt grubunun elektrofizyolojik incelemesinin yanı sıra COMT Val158Met genetik polimorfizm bilgisi eklenmiştir.

Elektrofizyolojik sonuçlar ışığında genel olarak şizofreni hastalarında

- i. Genlik azalması eğilimi
- ii. Latans değişimleri
- iii. Frekans değişimleri
- iv. Sinyal gürültü oranı değişimleri

göze çarpmaktadır. Bulguların ön veri olarak bize sunduğu yukarıdaki değişimler İOİP'lerde latans ve frekans açısından daha belirgindir. Zaman frekans dağılımlarını gösteren dalgacık dönüşümleri bize genel hatlarıyla kalitatif yön göstermektedir. Bu gösterimi genel olarak destekleyen sinyal-gürültü oranı (güçlenme faktörü) incelemesi zaman-frekans incelemeleriyle paralellik göstermektedir ve bu paralellik ilk defa kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlar alt başlıklar halinde tartışılacaktır.

### 5.1. **Elektrofizyolojik Bulgulara Ait Tartışma**

#### 5.1.1. *İşitsel Uyarılmış Potansiyeller (İUP)*

İşitsel uyarılmış potansiyelleri ölçüğümüz basit uyaran paradigmamızda N100 ya da P200 yanıtlarının genliklerinde bir değişiklik görülmemiştir. Literatürde yer alan, şizofreni hastaları ve yakınlarıyla yapılan işitsel uyarılmış potansiyel çalışmalarında ise genellikle azalmış N100 genliği bulunmaktadır. Bu durum çalışmanın katılımcı sayısının kısmen düşük olması dışında uyaran tipimiz ve uygulama yöntemlerimizle açıklanıyor olabilir.

Foxe ve arkadaşları (35) hem kronik hem ilk episod şizofreni hastalarında, hem de hasta yakınlarında işitsel uyarılmış potansiyele ait N100 yanıtında genlik azalması bulmuştur (15). Ancak bu çalışmada tek tip uyaran paradigması yerine seyrek uyaran paradigması uygulanmış ve hedef olmayan uyarana verilen yanıtlar işitsel uyarılmış potansiyel olarak ölçülmüştür. Ayrıca hedef uyararlarda bizim çalışmamızdaki gibi içten sayma görevi değil, tuşa basma görevi verilmiştir. Ayrıca uyarılar arası süre 1.5 saniye olarak sabit tutulmuştur. Bu



uygulama düzeni beklenti, motor hazırlık, uyarılar arası fark algılama gibi durumlar yaratarak basit işitsel uyarılma ötesinde de süreçlerin etkinleşmesi ve buna bağlı olarak hasta ve kontrol grupları arasında fark oluşmasına yol açmış olabilir. Çalışmamızda işitsel uyarılmış potansiyelleri elde etmek için 60 uyarı kullanırken, bu çalışmada İUP elde etmek için 600 uyarı kullanılmıştır. Buna bağlı olarak artmış olan sinyal/gürültü oranı da çalışmamızda görülemeyen farkın ortaya çıkarılmasında yardımcı olmuş olabilir. Rosburg ve arkadaşları, derleme yayınlarında özellikle dikkat gerektiren paradigmalarda şizofreni hastalarında N100 genliğinin düşmüş olduğunu belirtmiştir (44). Yazarlar ayrıca uyarılar arası sürenin şizofreni hastaları ve kontroller arasında fark çıkmasına neden olabileceğini belirtmektedirler. Ancak gruplar arası N100 genliği farkının oluşması için 1 saniyeden fazla uyarılar arası süre gerektiği belirtilmektedir ve bu tezde de 2,5-5,0 saniye uyarılar arası süre kullanıldığı için, bu bilgi gruplar arası N100 genliği farkı bulunamamış olmasını açıklamayacaktır.

Turetsky ve arkadaşlarının çalışmasında (51) hastalarda ve hafif kafa travması, A tipi kişilik bozukluğu, madde kullanımı gibi özellikler gösteren, şizofren olmayan hasta yakınlarında ikili ardışık uyarı paradigmasında ilk uyarıya ait N100 genliği sağlıklı bireylere göre azalmış bulunmuştur. Uyarı çiftlerinin ikinci uyarısına ait N100 yanıtında ya da bu iki N100 yanıtının oranlarında hastalarda ve hasta yakınlarında bir fark bulunamamıştır. İki ardışık uyarı arası ve uyarı çiftleri arası zamanın değişken olmadığı bu çalışma deseni de bu tezde yer alan basit uyarı paradigmasından daha farklı nitelikte N100 yanıtlarının elde edilmesine ve dolayısıyla bu tezde bulunmamış bir gruplar arası farka ulaşılmasına neden olmuş olabilir. Turetsky ve arkadaşlarının çalışmasının katılımcı sayısının yüksekliği (142 hasta, 373 birinci dereceden hasta yakını, 221 kontrol) de gruplar arasında fark bulunabilmesini sağlamış olabilir.

Mazhari ve arkadaşlarının çalışmasında (31) da yine çift klik sesi kullanmış ve yaygın kognitif bozukluğu olan şizofrenlerde N100 genliği küçük bulunurken hafif kognitif bozukluğu olan şizofreni hastalarında fark bulunamamıştır. Yine daha fazla katılımcı ve uyarı sayısının bulunması bu çalışmanın gücünü arttırmış olabileceği gibi bu tezde olan farkta ardışık çift uyarı paradigmasının etkileri de görülüyor olabilir. Bu çalışmanın ışığında getirilebilecek bir diğer açıklama da bu tezde yer alan hasta grubunun genellikle hafif bilişsel bozukluğu olan hastalardan oluşuyor olabileceği ve bu nedenle N100 genliğinde gruplar arası farka rastlanmadığıdır.

### 5.1.2. İşitsel Olay İlişkili Potansiyel (İOİP)

Bu tezde olay ilişkili potansiyellerin en çok çalışılmış bileşeni olan P300'e ait genlik ya da latans değerlerinin gruplar arasında farklılık gösterdiği bulunamamıştır. Literatürde ise pek çok çalışma şizofren hastalarında ve yakınlarında p300 genliğinin düşmekte olduğunu göstermektedir.

Winterer ve arkadaşları (56), şizofreni ve kontrol gruplarının İOİP bileşenlerini (P50, N100, P200, P300) karşılaştırdıkları çalışmada sadece parietemporalde P300 genliğinde düşüş bulmuşlardır. Hastaların sağlıklı kardeşlerinin yanıtlarıyla kontrol grubu arasında ise herhangi bir fark bulunamamışlardır. Yazarlar hastaların N100 yanıtı genliğinde küçülme çıkmamasının uyarılar arası sürenin kısa olması (1.0-1.5 saniye) ve motor görev yerine sadece sayma görevi olmasına bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Bu tezde de düğmeye basma yerine sayma görevi verilmiş olmasına rağmen hedef uyaranda hastaların N100 (FCZ elektrodunda) genliği düşmüş fakat P300 genliğinde bir fark bulunamamıştır.

Williams ve arkadaşları (53), düğmeye basma motor görevini içeren seyrek uyarın paradigması uyguladıkları çalışmalarında şizofreni hastalarında hedef uyarana ait N100, N200 ve P300 genliklerinde azalma, P200 genliğinde ise artma bulmuşlardır. Bunun dışında bu tezde bulunan kısalmış N100 latansının tersi bir bulguya ulaşarak hastalarda hedef uyarana ait N100 latansının artmakta olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada ayrıca hastalarda artan P300 genliğinin düşünce bozukluğu ve grandiyöz ile, artmış N100 latansının ise psikomotor fakirlik ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu elektrofizyolojik verilerin farklı belirtilerle korelasyon gösteriyor olması, bu tezdeki farklı sonuçların, hasta gruplarının belirtileri arasındaki fark olmasına dayanabiliyor olacağını akla getirmektedir.

### 5.1.3. Uyumsuzluk Negatifliği (MMN)

Sesin süresinde ve şiddetinde en çok sapmanın olduğu uyarılarda parietal elektrotlardaki ortalama MMN genliği şizofreni hastalarında kontrollere göre daha düşük çıkmıştır. Yine şizofreni grubundaki bireylerde sesin frekansı ve yönünün 2. dereceden saptığı uyarılarda ise sırasıyla P4 ve CPz elektrotlarında ortalama MMN genliğinin düştüğü gözlemlenmiştir. MMN genliklerindeki azalma literatürle uyumludur; ancak bu çalışmalarda genellikle frontal elektrotlar kullanılmıştır. Tezin incelediği verilerde frontal elektrotlarda gruplar arası fark çıkmazken parietal elektrotlardafark bulunması, MMN ölçümlerinde sadece frontal değil posterior elektrotların da incelenmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Kullanılan

referans elektrodu da ölçüm yapılacak elektrodun seçilmesinde önemli bir etkidir.

## 5.2. Genetik Bulgulara Ait Tartışma

Hasta grubundaki katılımcılarda gerçekleştirilen COMT Val158Met genotiplendirmesi örneklemimizin grup polimorfizm karşılaştırmaları yapmak için yetersiz olmakla birlikte, Türk populasyonunda yapılmış bir allel frekans araştırmasında (23) bulunan allel frekanslarıyla uyumlu görünmektedir (Tezde Val: 0,54, Araştırmada Val: 0,55).

Hasta grubu içinde genotip gruplarının daha da küçülmesiyle (gruplardaki birey sayıları 4, 7 ve 3'tür) genotip ve elektrofizyolojik parametreleri karşılaştırmak daha da güçtür. İÖİP'lerde tepe genlik ve latanslarının genotip ile ilişkisine dair belirgin bir sonuç yoktur. MMN genliklerinde ise özellikle değişiminde Met/Met grubundaki hastaların genlikleri ısrarlı olarak Val/Val grubundan düşük çıkmaktadır. Düşük katılımcı sayısı bulgu hakkında dikkatli yorum yapılmasını gerektirmişle birlikte bu sonuç 22q11 kromozom delesyonu olan bireylerden sağlam 22 kromozom üzerinde Met alleli taşıyanların Val alleli taşıyanlara göre daha düşük MMN genliği bulan çalışma ile uyumluluk göstermektedir.

Hastalarda genotipin elektrofizyolojik sinyal/gürültü oranıyla ilişkisi İÖİP'nin güçlenme faktörü kullanılarak incelendiğinde Val/Val genotipli hastaların Met/Met genotiplilerden daha yüksek sinyal/gürültü oranına sahip olduğu, heterozigot bireylerin ise arada bir değer taşıdığı görülmektedir. Bu yüksek sinyal/gürültü oranının yüksek sinyalden mi yoksa düşük gürültüden mi kaynaklandığını anlamak için zaman-frekans analizi yapıldığında Val/Val genotipli hastaların hem özellikle N100-P200 bileşenlerinin olduğu zaman aralığında ve yaklaşık 7 Hz frekansında yüksek sinyali, hem de uyarın öncesi dönemde diğer gruplardan daha az gürültü taşıdığı görülmektedir. Bu analizde dikkat çeken diğer nokta ise Val/Val grubunun hedef uyarana yanıtlarında P300 bileşenine denk gelen yaklaşık 300. ms'de delta frekans aralığındaki sinyalin çok zayıf olmasıdır. Bu durum, Val/Val grubunda P300 genliğinin diğer gruplara göre daha düşük ölçülmüş olmasını açıklayabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma genetik ve elektrofizyolojik/bilişsel çalışmaların arasında bir köprü niteliğindedir ve ileriki çalışmaların başlangıcında çalışma parametrelerine ışık tutabilecek niteliktedir.

Elektrofizyolojik veriler yalnız nöral popülasyonların bir çıktısı değil aynı zamanda bilişsel bileşenler olarak veri sağlamaktadır. Bu veriler şizofreni hastalarında görülen bilişsel bozulmaların sürecinin anlaşılmasında, ayrıca hastalık ve tedavi sürecinin takibinde yol gösterici olabilirler.

Çalışmamızda şizofreni hastalarında işitsel uyarılmış potansiyeller, işitsel olay ilişkili potansiyeller ve uyumsuzluk negatifliği parametrelerinde değişimler olduğu gösterilmiştir. Hasta grubunda frontal korteks dopamin etkinliğini etkileyebilecek bir genetik varyasyonun (COMT Val158Met) elektrofizyolojik yanıtlara etkileri incelenmiş ve çalışılması olası incelemelerin ön değerlendirilmesi sunulmuştur.

Çalışmanın özellikle genetik çalışmaya alınan katılımcı sayısının artırılması ve farklı genotip gruplarının ayrıntılı elektrofizyolojik incelemelerinin yapılması uygun olacaktır. Yine uygulanan paradigmanın sürelerinin artırılmasıyla daha gürültüsüz elektrofizyolojik yanıtlar elde edilmesi ölçüm kaynaklı olası sorunların önüne geçerek veri bozulma ve kayıplarının önüne geçebilir, ihtiyaç duyulan katılımcı sayısını azaltabilir. Çalışmaya alınan hastaların kullanmakta oldukları ilaçların etkilerinin de incelenmesi ve gerekirse yeni çalışmalarda ilk episod hastalarının ya da ilaç kullanmamış hastaların kullanılması, hastalığın ve ilaç kullanımının elektrofizyolojik yanıtlara etkilerinin ayrıştırılmasını sağlayabilir. Çalışmanın istatistiksel gücünün artırılması için hasta sayısının özellikle çok merkezli çalışmalarla artırılması, genetik etkilerin incelenebilmesi için hasta yakınlarının da çalışmaya katılması ileriki çalışmalara katkı sağlayacaktır.

## **7. KAYNAKLAR**

1. Abi-Dargham A. Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol* 2004; 7 Suppl 1: S1-5.
2. Andrés P. Frontal cortex as the central executive of working memory: time to revise our view. *Cortex* 2003; 39: 871-95.
3. Arnold SE, Rioux L. Challenges, status, and opportunities for studying developmental neuropathology in adult schizophrenia. *Schizophr Bull* 2001; 27: 395-416.
4. Ashe PC, Berry MD, Boulton AA. Schizophrenia, a neurodegenerative disorder with neurodevelopmental antecedents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001; 25: 691-707.
5. Badner JA, Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 405-11.
6. Baker K, Baldeweg T, Sivagnanasundaram S, Scambler P ve ark. COMT Val108/158 Met modifies mismatch negativity and cognitive function in 22q11 deletion syndrome. *Biol Psychiatry* 2005; 58: 23-31.
7. Brown GG, Thompson WK. Functional brain imaging in schizophrenia: selected results and methods. *Curr Top Behav Neurosci* 2010; 4: 181-214.
8. Cannon TD, Mednick SA, Parnas J. Genetic and perinatal determinants of structural brain deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1989; 46: 883-9.
9. Cardno AG, Gottesman II. Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. *Am J Med Genet* 2000; 97: 12-7.
10. Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 1991; 148: 1474-86.
11. DeLisi LE, Hoff AL, Schwartz JE, Shields GW ve ark. Brain morphology in first-episode schizophrenic-like psychotic patients: a quantitative magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry* 1991; 29: 159-75.
12. Duncan GE, Sheitman BB, Lieberman JA. An integrated view of pathophysiological models of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 29: 250-64.
13. Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH ve ark. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*

2001; 98: 6917-22.

14. Faw B. Pre-frontal executive committee for perception, working memory, attention, long-term memory, motor control, and thinking: a tutorial review. *Conscious Cogn* 2003; 12: 83-139.
15. Foxxe JJ, Yeap S, Snyder AC, Kelly SP ve ark. The N1 auditory evoked potential component as an endophenotype for schizophrenia: high-density electrical mapping in clinically unaffected first-degree relatives, first-episode, and chronic schizophrenia patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2010; : .
16. Gallinat J, Bajbouj M, Sander T, Schlattmann P ve ark. Association of the G1947A COMT (Val(108/158)Met) gene polymorphism with prefrontal P300 during information processing. *Biol Psychiatry* 2003; 54: 40-8.
17. Gogos JA, Morgan M, Luine V, Santha M ve ark. Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9991-6.
18. Goldberg T, David A, Gold J. Neurocognitive deficits in schizophrenia. In: Hirsch SR, Weinberger DR, editors. *Schizophrenia*. 2nd ed. Malden, MA: Wiley-Blackwell; 2003. p. 168-84.
19. Goldner EM, Hsu L, Waraich P, Somers JM. Prevalence and incidence studies of schizophrenic disorders: a systematic review of the literature. *Can J Psychiatry* 2002; 47: 833-43.
20. Gottesman II, Shields J. Genetic theorizing and schizophrenia. *Br J Psychiatry* 1973; 122: 15-30.
21. Kelly J, Murray R, Van Os J. The outcome of psychotic illness. In: Murray RM, Lieberman JA, editors. *Comprehensive care of schizophrenia: a textbook of clinical management*. 2nd ed. London: Martin Dunitz; 2001. p. 37-58.
22. Kendler KS, Diehl SR. The genetics of schizophrenia: a current, genetic-epidemiologic perspective. *Schizophr Bull* 1993; 19: 261-85.
23. Kocabaş NA, Karakaya AE, Cholerton S, Sardaş S. Catechol-O-methyltransferase (COMT) genetic polymorphism in a Turkish population. *Arch Toxicol* 2001; 75: 407-9.
24. Laurent A, Garcia-Larréa L, d'Amato T, Bosson JL ve ark. Auditory event-related potentials and clinical scores in unmedicated schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 1999; 86:

229-38.

25. Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE ve ark. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 34-48.
26. Liddle P, Pantelis C. Brain imaging in schizophrenia. In: Hirsch SR, Weinberger DR, editors. *Schizophrenia*. 2nd ed. Malden, MA: Wiley-Blackwell; 2003. p. 403-17.
27. Lieberman JA. Is schizophrenia a neurodegenerative disorder? A clinical and neurobiological perspective. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 729-39.
28. Lipska BK. Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci* 2004; 29: 282-6.
29. Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK ve ark. Catechol O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience* 2003; 116: 127-37.
30. Matsumoto M, Weickert CS, Beltaifa S, Kolachana B ve ark. Catechol O-methyltransferase (COMT) mRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 1521-30.
31. Mazhari S, Price G, Waters F, Dragović M ve ark. Evidence of abnormalities in mid-latency auditory evoked responses (MLAER) in cognitive subtypes of patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 2011; 187: 317-23.
32. McCarley RW, Wible CG, Frumin M, Hirayasu Y ve ark. MRI anatomy of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1999; 45: 1099-119.
33. Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, Bonett D. Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Arch Gen Psychiatry* 1988; 45: 189-92.
34. Murphy KC, Jones LA, Owen MJ. High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56: 940-5.
35. Näätänen R, Kähkönen S. Central auditory dysfunction in schizophrenia as revealed by the mismatch negativity (MMN) and its magnetic equivalent MMNm: a review. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; 12: 125-35.
36. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K ve ark. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 2006; 314: 1930-3.

37. Norton N, Kirov G, Zammit S, Jones G ve ark. Schizophrenia and functional polymorphisms in the MAOA and COMT genes: no evidence for association or epistasis. *Am J Med Genet* 2002; 114: 491-6.
38. Norton N, Williams HJ, Owen MJ. An update on the genetics of schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* 2006; 19: 158-64.
39. Ohnuma T, Kimura M, Takahashi T, Iwamoto N ve ark. A magnetic resonance imaging study in first-episode disorganized-type patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* 1997; 51: 9-15.
40. Olejniczak P. Neurophysiologic basis of EEG. *J Clin Neurophysiol* 2006; 23: 186-9.
41. Oniz A, Bayazit O, Kocaaslan S, Gokmen Nark.. Beyin Biyofiziği Uygulamalar. In: Ozgoren M, Oniz A, editors. The applied brain biophysics. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları; 2009. p. .
42. Ozgoren M. Beyin Biyofiziği Açısından Beyinde Bilgi İşleme. In: Ozgoren M, Oniz A, editors. The applied brain biophysics. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları; 2009. p. 69-95.
43. Pakarinen S, Takegata R, Rinne T, Huotilainen M ve ark. Measurement of extensive auditory discrimination profiles using the mismatch negativity (MMN) of the auditory event-related potential (ERP). *Clin Neurophysiol* 2007; 118: 177-85.
44. Rosburg T, Boutros NN, Ford JM. Reduced auditory evoked potential component N100 in schizophrenia--a critical review. *Psychiatry Res* 2008; 161: 259-74.
45. Ross CA, Margolis RL, Reading SAJ, Pletnikov M ve ark. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 2006; 52: 139-53.
46. Solís-Ortiz S, Pérez-Luque E, Morado-Crespo L, Gutiérrez-Muñoz M. Executive functions and selective attention are favored in middle-aged healthy women carriers of the Val/Val genotype of the catechol-o-methyltransferase gene: a behavioral genetic study. *Behav Brain Funct* 2010; 6: 67.
47. Strous RD, Lapidus R, Viglin D, Kotler M ve ark. Analysis of an association between the COMT polymorphism and clinical symptomatology in schizophrenia. *Neurosci Lett* 2006; 393: 170-3.
48. Tunbridge EM, Bannerman DM, Sharp T, Harrison PJ. Catechol-o-methyltransferase inhibition improves set-shifting performance and elevates stimulated dopamine release in the



rat prefrontal cortex. *J Neurosci* 2004; 24: 5331-5.

49. Turetsky BI, Bilker WB, Siegel SJ, Kohler CG ve ark. Profile of auditory information-processing deficits in schizophrenia. *Psychiatry Res* 2009; 165: 27-37.

50. Turetsky BI, Calkins ME, Light GA, Olincy A ve ark. Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: the viability of selected candidate measures. *Schizophr Bull* 2007; 33: 69-94.

51. Turetsky BI, Greenwood TA, Olincy A, Radant AD ve ark. Abnormal auditory N100 amplitude: a heritable endophenotype in first-degree relatives of schizophrenia probands. *Biol Psychiatry* 2008; 64: 1051-9.

52. Weinberger DR, DeLisi LE, Perman GP, Targum S ve ark. Computed tomography in schizophreniform disorder and other acute psychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 1982; 39: 778-83.

53. Williams LM, Gordon E, Wright J, Bahramali H. Late component ERPs are associated with three syndromes in schizophrenia. *Int J Neurosci* 2000; 105: 37-52.

54. Winterer G, Coppola R, Goldberg TE, Egan MF ve ark. Prefrontal broadband noise, working memory, and genetic risk for schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 490-500.

55. Winterer G, Egan MF, Kolachana BS, Goldberg TE ve ark. Prefrontal electrophysiologic "noise" and catechol-O-methyltransferase genotype in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006; 60: 578-84.

56. Winterer G, Egan MF, Rädler T, Coppola R ve ark. Event-related potentials and genetic risk for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2001; 50: 407-17.

57. Wonodi I, Mitchell BD, Stine OC, Hong LE ve ark. Lack of association between COMT gene and deficit/nondeficit schizophrenia. *Behav Brain Funct* 2006; 2: 42.

## 8. **EKLER**

Ek 1. Etik Kurul İzni

Ek 2. Roche DNA Isolation Kit Kullanım Kılavuzu

Ek 3. Tezle İlgili Bildiriler

a. Multiblock Auditory Approach in Schizophrenia Patients. 12th International Congress on Schizophrenia Research (2009, ABD). Poster Bildiri.

b. Modified MMN and Dichotic Listening Paradigm Applied in Schizophrenia Patients. 14th World Congress of Psychophysiology: The Olympics of the Brain (2008, Rusya). Poster Bildiri.

c. Optimal Mismatch Negativity applied in Schizophrenia Patients. 1st Schizophrenia International Research Society Conference (2008, İtalya). Poster Bildiri.

Ek 4. Akademik Özgeçmiş

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Tarih ve Sayı: 25.04.2008/ 143

**Etik Kurul Üyeleri**

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI  
Prof.Dr.Tunç ALKIN  
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL  
Prof.Dr.Ayça Arzu SAYINER  
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR  
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK  
Doç.Dr.Murat DUMAN  
Doç.Dr.Güven ASLAN  
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN  
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN  
Yunus KARSLI

**Etik Kurul Başkanı**

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,**

Etik Kurulumuzun 24 Nisan 2008 tarih ve 05/09/2008 no.lu toplantısında; 34/2008 Protokol numaralı Psikiyatri Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Köksal ALPTEKİN'in proje yöneticisi Dr.Serhat TAŞLICA'nın sorumlusu olduğu, "Şizofreniye yatkınlık genlerinin araştırılması ve endofenotip yaklaşımında elektrofizyolojik verilerin kullanılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr.Taner ÇAMSARI  
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları  
Etik Kurul Başkanı

**Etik Kurul Sekreteri**

Hatice İÇİ

## 2.2 Procedure for DNA Isolation from 10 ml Mammalian Whole Blood

⚠ All procedures are performed at +15 to +25°C unless otherwise noted.

### Procedure

- 1 For each blood sample to be processed, add 30 ml Red Blood Cell Lysis Buffer to a sterile 50 ml centrifuge tube.
  - Ⓢ Use a centrifuge tube that will withstand a minimum of  $900 \times g$  (preferable  $12,000 \times g$ ), and accommodate a total volume of 40 ml.
- 2 Add 10 ml mammalian blood to each tube. Cap the tube, and mix gently by inversion.
  - Ⓢ Do not vortex.
- 3 Place the centrifuge tube on a rocking platform or gyratory shaker for 10 min.
  - Ⓢ Alternatively, manually invert the sample periodically for 10 min.
- 4 Centrifuge the tube at  $875 \times g$  for 10 min (*e.g.*, 2,000 rpm in a RT6000B Sorvall Centrifuge).
  - Ⓢ Do not exceed centrifugation speed limit, as this will increase the difficulty of resuspending the white cell pellet (step 6).
- 5 Carefully pour off and properly dispose of the clear, red supernatant (indicative of complete red cell lysis). Some residual liquid should remain with the white cell pellet.
  - Ⓢ The Red Blood Cell Lysis Buffer selectively lyses the erythrocytes, leaving the leukocytes intact. Following centrifugation, if the sample appears as a cloudy upper layer (containing plasma/leukocytes) and a red lower layer (containing erythrocytes), no red cell lysis has occurred. If this happens, do one of the following:
    - Repeat steps 1-4 with fresh blood, using a 15-minute incubation in step 3.
    - Repeat steps 1-4 with fresh blood, inverting the sample more frequently if mixing by hand.
    - Ensure that fresh blood has been warmed to +15 to +25°C before repeating steps 1-4.
- 6 Thoroughly vortex the white pellet visible at the bottom of the tube in the residual supernatant.
  - Ⓢ Vortex thoroughly, making sure that the white cell pellet is fully resuspended in the residual supernatant. This step facilitates complete lysis of the white cell pellet during step 7.
  - Ⓢ Note that the white cell pellet will still be slightly red in color due to the presence of residual hemoglobin. The hemoglobin will be removed in subsequent steps.

- 
- 7 Add 5 ml White Cell Lysis Buffer, cap the tube, and mix thoroughly by vortexing.
    - Ⓢ Vortex thoroughly to ensure the white cells are completely lysed. Following successful lysis of the leukocytes, the solution should appear clear dark red/brown with no particulate material present. To ensure this, perform an optional incubation at 37°C for 15–30 min, which may facilitate lysis.
    - Ⓢ For heparin-treated blood, heat the white cell pellet in White Blood Cell Lysis Buffer for 10 min at 65°C to facilitate lysis.

---

  - 8 **Optional:** Add RNase\* to a final concentration of 0.02 mg/ml. Mix by inversion, and incubate at 37°C for 15 min.
    - Ⓢ RNase treatment completely removes RNA contaminants from the final DNA sample, yielding pure DNA with no RNA contamination. However, if subsequent applications do not require a RNA-free sample, this step can be eliminated.
    - Ⓢ The incubation time can be extended up to 1 h at 37°C.

---

  - 9 Transfer the sample to a sterile 17 × 100 mm tube.
    - Ⓢ The sample can remain in the 50 ml centrifugation tube if the 50 ml tube is capable of withstanding 12,000 × *g* centrifugal force

---

  - 10 Add 2.6 ml Protein Precipitation Solution to each sample.
    - Ⓢ Vortex thoroughly! (We recommend that you vortex continuously for approximately 25 sec.) This is necessary for effective removal of protein from the sample.
    - Ⓢ Upon vortexing, a brownish protein precipitate will be clearly visible.

---

  - 11 Centrifuge the sample at 12,000 × *g* (e.g., 10,000 rpm in a Sorvall RC5B centrifuge) for 10 min.
    - Ⓢ Samples must be centrifuged at 12,000 × *g* for a minimum of 10 min. Lower-speed spins will result in loose protein pellets, making it very difficult to effectively separate the proteinaceous material from the supernatant.

---

  - 12 Carefully pour the supernatant, which contains the DNA, into a new sterile 50 ml centrifuge tube. Properly dispose of the protein pellet.
    - Ⓢ The new centrifuge tube must accommodate approximately 30 ml and withstand a minimum of 900 × *g* (or 12,000 × *g* for isolation of <math><1.5 \times 10^7</math> cells).
-

- 13 Ethanol precipitate the DNA:
- Add 2 volumes of +15 to +25°C ethanol to the supernatant from step 12. Gently mix by inversion until DNA strands precipitate out of solution and the remaining liquid is no longer cloudy.
  - Centrifuge the sample at  $875 \times g$  for 10 min (e.g., 2,000 rpm in a Sorvall RT6000B centrifuge). Discard the supernatant. For  $<1.5 \times 10^7$  cells, centrifuge at  $12,000 \times g$  for 10 min following addition of glycogen carrier.
- Optional Method:** Instead of centrifugation, a sterile blunt-ended glass rod may be used to carefully remove the DNA strands from the 100% ethanol before transferring them to a new sterile tube containing cold 70% ethanol (see step 14). Swirl until DNA strands are released into 70% ethanol.
- Ⓢ If the number of leukocytes in the sample is less than  $1.5 \times 10^7$  cells, the yield may be insufficient to see visible DNA strands falling out of solution. If this occurs, add glycogen\* carrier prior to the ethanol precipitation, and increase the centrifugal to  $12,000 \times g$  to facilitate effective precipitation.
- 
- 14 Add 3 ml cold 70% ethanol to the DNA pellet in the tube, and carefully mix the sample several times by gentle inversion. Centrifuge the sample at  $875 \times g$  for 5 minutes (e.g., at 2,000 rpm in a Sorvall RT6000B centrifuge). Discard the supernatant.
- Ⓢ Do not vortex during this wash step. For samples containing  $<1.5 \times 10^7$  cells, centrifuge the DNA at  $12,000 \times g$  for 5 min after the 70% ethanol wash.
- 
- 15 Dry the DNA pellet by placing the sample under vacuum without heat for a few minutes or until the ethanol is no longer visible.
- OR** Allow the sample to air dry.
- Ⓢ Do not overdry the DNA pellet as this will make it much more difficult to fully resuspend the DNA.
- 
- 16 To resuspend the DNA pellet, add 1 ml TE Buffer, pH 8.0, or desired buffer. Vortex thoroughly. Place samples at 65°C for 30–60 min to aid in resuspension; periodically vortex the samples. .
- Ⓢ Vortex thoroughly to help resuspend the DNA pellet.
  - Ⓢ For human blood samples, a 30-min incubation at 65°C is sufficient to fully resuspend DNA samples. For samples from other mammalian species, place the samples at 65°C for 60 min.
- 
- 17 Store samples at +2 to +8°C until use.
- Ⓢ If desired, samples can be accurately quantified using spectrophotometry or fluorometry.

**Total time:**  $\leq 1.5$  h + resuspension (for 4 samples)

**Hands-on time:**  $\leq 15$  min

**2.2.1 Using the isolated DNA**

DNA prepared using the DNA Isolation Kit for Mammalian Blood can be effectively used in multiple applications, including Southern and PCR with either Taq DNA polymerase or Expand PCR System\* products. Once quantified, use the same amount of DNA per application as you would typically use of DNA prepared with an alternative purification method.

**2.2.2 Optional procedure for use with smaller quantities of blood**

By slightly adjusting the procedure detailed in the section titled "DNA isolation from 10 ml mammalian whole blood," blood samples from 1–10 ml can be processed. Follow the procedure described above with the following volume modifications.

Blood Volume (ml)	Red Blood Cell Lysis Buffer Volume: Blood Ratio* (Step 1)	White Blood Cell Lysis Buffer Volume (ml) (Step 7)	Protein Precipitation Solution volume (ml) (Step 10)	Recom. Resuspension Volumes (μl) (Step 16)
9 - <10	3:1	5.0	2.6	1000
8 - <9	3:1	5.0	2.6	800
7 - <8	3:1	5.0	2.6	800
6 - <7	3:1	5.0	2.6	600
>5 - 6	3:1	5.0	2.6	600
4 - 5	3:1	2.5	1.3	400
3 - <4	3:1	1.5	0.780	400
2 - <3	3:1	1.0	0.520	200
1 - <2	3:1	1.0	0.520	200

\* Add 3 ml Red Blood Cell Lysis Buffer for every 1 ml whole blood.

## 2.2 Procedure for DNA Isolation from 10 ml Mammalian Whole Blood

⚠ All procedures are performed at +15 to +25°C unless otherwise noted.

### Procedure

- 1 For each blood sample to be processed, add 30 ml Red Blood Cell Lysis Buffer to a sterile 50 ml centrifuge tube.
  - Ⓢ Use a centrifuge tube that will withstand a minimum of  $900 \times g$  (preferable  $12,000 \times g$ ), and accommodate a total volume of 40 ml.
- 2 Add 10 ml mammalian blood to each tube. Cap the tube, and mix gently by inversion.
  - Ⓢ Do not vortex.
- 3 Place the centrifuge tube on a rocking platform or gyratory shaker for 10 min.
  - Ⓢ Alternatively, manually invert the sample periodically for 10 min.
- 4 Centrifuge the tube at  $875 \times g$  for 10 min (*e.g.*, 2,000 rpm in a RT6000B Sorvall Centrifuge).
  - Ⓢ Do not exceed centrifugation speed limit, as this will increase the difficulty of resuspending the white cell pellet (step 6).
- 5 Carefully pour off and properly dispose of the clear, red supernatant (indicative of complete red cell lysis). Some residual liquid should remain with the white cell pellet.
  - Ⓢ The Red Blood Cell Lysis Buffer selectively lyses the erythrocytes, leaving the leukocytes intact. Following centrifugation, if the sample appears as a cloudy upper layer (containing plasma/leukocytes) and a red lower layer (containing erythrocytes), no red cell lysis has occurred. If this happens, do one of the following:
    - Repeat steps 1-4 with fresh blood, using a 15-minute incubation in step 3.
    - Repeat steps 1-4 with fresh blood, inverting the sample more frequently if mixing by hand.
    - Ensure that fresh blood has been warmed to +15 to +25°C before repeating steps 1-4.
- 6 Thoroughly vortex the white pellet visible at the bottom of the tube in the residual supernatant.
  - Ⓢ Vortex thoroughly, making sure that the white cell pellet is fully resuspended in the residual supernatant. This step facilitates complete lysis of the white cell pellet during step 7.
  - Ⓢ Note that the white cell pellet will still be slightly red in color due to the presence of residual hemoglobin. The hemoglobin will be removed in subsequent steps.



- 
- 7 Add 5 ml White Cell Lysis Buffer, cap the tube, and mix thoroughly by vortexing.
    - ⓐ Vortex thoroughly to ensure the white cells are completely lysed. Following successful lysis of the leukocytes, the solution should appear clear dark red/brown with no particulate material present. To ensure this, perform an optional incubation at 37°C for 15–30 min, which may facilitate lysis.
    - ⓑ For heparin-treated blood, heat the white cell pellet in White Blood Cell Lysis Buffer for 10 min at 65°C to facilitate lysis.

---

  - 8 **Optional:** Add RNase\* to a final concentration of 0.02 mg/ml. Mix by inversion, and incubate at 37°C for 15 min.
    - ⓐ RNase treatment completely removes RNA contaminants from the final DNA sample, yielding pure DNA with no RNA contamination. However, if subsequent applications do not require a RNA-free sample, this step can be eliminated.
    - ⓑ The incubation time can be extended up to 1 h at 37°C.

---

  - 9 Transfer the sample to a sterile 17 × 100 mm tube.
    - ⓐ The sample can remain in the 50 ml centrifugation tube if the 50 ml tube is capable of withstanding 12,000 × *g* centrifugal force

---

  - 10 Add 2.6 ml Protein Precipitation Solution to each sample.
    - ⓐ Vortex thoroughly! (We recommend that you vortex continuously for approximately 25 sec.) This is necessary for effective removal of protein from the sample.
    - ⓑ Upon vortexing, a brownish protein precipitate will be clearly visible.

---

  - 11 Centrifuge the sample at 12,000 × *g* (e.g., 10,000 rpm in a Sorvall RC5B centrifuge) for 10 min.
    - ⓐ Samples must be centrifuged at 12,000 × *g* for a minimum of 10 min. Lower-speed spins will result in loose protein pellets, making it very difficult to effectively separate the proteinaceous material from the supernatant.

---

  - 12 Carefully pour the supernatant, which contains the DNA, into a new sterile 50 ml centrifuge tube. Properly dispose of the protein pellet.
    - ⓐ The new centrifuge tube must accommodate approximately 30 ml and withstand a minimum of 900 × *g* (or 12,000 × *g* for isolation of <math><1.5 \times 10^7</math> cells).
-

- 13 Ethanol precipitate the DNA:
- Add 2 volumes of +15 to +25°C ethanol to the supernatant from step 12. Gently mix by inversion until DNA strands precipitate out of solution and the remaining liquid is no longer cloudy.
  - Centrifuge the sample at  $875 \times g$  for 10 min (e.g., 2,000 rpm in a Sorvall RT6000B centrifuge). Discard the supernatant. For  $<1.5 \times 10^7$  cells, centrifuge at  $12,000 \times g$  for 10 min following addition of glycogen carrier.
- Optional Method:** Instead of centrifugation, a sterile blunt-ended glass rod may be used to carefully remove the DNA strands from the 100% ethanol before transferring them to a new sterile tube containing cold 70% ethanol (see step 14). Swirl until DNA strands are released into 70% ethanol.
- Ⓢ If the number of leukocytes in the sample is less than  $1.5 \times 10^7$  cells, the yield may be insufficient to see visible DNA strands falling out of solution. If this occurs, add glycogen\* carrier prior to the ethanol precipitation, and increase the centrifugal to  $12,000 \times g$  to facilitate effective precipitation.
- 
- 14 Add 3 ml cold 70% ethanol to the DNA pellet in the tube, and carefully mix the sample several times by gentle inversion. Centrifuge the sample at  $875 \times g$  for 5 minutes (e.g., at 2,000 rpm in a Sorvall RT6000B centrifuge). Discard the supernatant.
- Ⓢ Do not vortex during this wash step. For samples containing  $<1.5 \times 10^7$  cells, centrifuge the DNA at  $12,000 \times g$  for 5 min after the 70% ethanol wash.
- 
- 15 Dry the DNA pellet by placing the sample under vacuum without heat for a few minutes or until the ethanol is no longer visible.
- OR** Allow the sample to air dry.
- Ⓢ Do not overdry the DNA pellet as this will make it much more difficult to fully resuspend the DNA.
- 
- 16 To resuspend the DNA pellet, add 1 ml TE Buffer, pH 8.0, or desired buffer. Vortex thoroughly. Place samples at 65°C for 30–60 min to aid in resuspension; periodically vortex the samples. .
- Ⓢ Vortex thoroughly to help resuspend the DNA pellet.
  - Ⓢ For human blood samples, a 30-min incubation at 65°C is sufficient to fully resuspend DNA samples. For samples from other mammalian species, place the samples at 65°C for 60 min.
- 
- 17 Store samples at +2 to +8°C until use.
- Ⓢ If desired, samples can be accurately quantified using spectrophotometry or fluorometry.

**Total time:**  $\leq 1.5$  h + resuspension (for 4 samples)

**Hands-on time:**  $\leq 15$  min

**2.2.1 Using the isolated DNA**

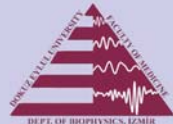
DNA prepared using the DNA Isolation Kit for Mammalian Blood can be effectively used in multiple applications, including Southern and PCR with either Taq DNA polymerase or Expand PCR System\* products. Once quantified, use the same amount of DNA per application as you would typically use of DNA prepared with an alternative purification method.

**2.2.2 Optional procedure for use with smaller quantities of blood**

By slightly adjusting the procedure detailed in the section titled "DNA isolation from 10 ml mammalian whole blood," blood samples from 1–10 ml can be processed. Follow the procedure described above with the following volume modifications.

Blood Volume (ml)	Red Blood Cell Lysis Buffer Volume: Blood Ratio* (Step 1)	White Blood Cell Lysis Buffer Volume (ml) (Step 7)	Protein Precipitation Solution volume (ml) (Step 10)	Recom. Resuspension Volumes (μl) (Step 16)
9 - <10	3:1	5.0	2.6	1000
8 - <9	3:1	5.0	2.6	800
7 - <8	3:1	5.0	2.6	800
6 - <7	3:1	5.0	2.6	600
>5 - 6	3:1	5.0	2.6	600
4 - 5	3:1	2.5	1.3	400
3 - <4	3:1	1.5	0.780	400
2 - <3	3:1	1.0	0.520	200
1 - <2	3:1	1.0	0.520	200

\* Add 3 ml Red Blood Cell Lysis Buffer for every 1 ml whole blood.



# MULTIBLOCK AUDITORY APPROACH IN SCHIZOPHRENIA PATIENTS



Murat ÖZGÖREN<sup>1</sup>, Adile ÖNİZ<sup>1</sup>, Serhat TAŞLICA<sup>1</sup>, Ahmet AKTENER<sup>2</sup>, Berna AKDEDE<sup>2</sup>, Köksal ALPTEKİN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics <sup>2</sup>Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Psychiatry

## Introduction

The recent cognitive biophysical studies focus on different properties of auditory domain, especially in the schizophrenia research. The classical auditory oddball paradigm mainly targets an attentional process (AERP) whereas the MMN design is to a great extent attention-free. Mismatch Negativity (MMN) is an endogenous response which is elicited, irrespective of the subject's attention or behavioral task, when a series of a standard sound is interrupted by an infrequent deviant sound (differs from standard sound by any characteristics of sound like duration, intensity and pitch) (1). Many studies have reported abnormalities in the generation of MMN in schizophrenia (2). In Dichotic Listening (DL) test, two different auditory stimuli are simultaneously presented to a subject, one in each ear (3). Among the different procedures of DL, consonant-vowel syllable setup is one of the most frequently used methods to study language asymmetry in the human brain (4). As contralateral projections to the temporal lobe are stronger than ipsilateral projections and left temporal lobe is involved in phonological input, subjects recall from right ear better than left ear. This Right Ear Advantage (REA) is reduced in schizophrenia, an expected result as functional and anatomical asymmetry of auditory areas is also reduced in this pathology (5).

## Materials&Methods

19 patients (age:36.8±8.7, 8 females, 1 left handed) diagnosed with schizophrenia according to DSM-IV were recruited from the Department of Psychiatry of Dokuz Eylül University, Turkey. 19 control subjects (age:32.5±11.1, 9 females, 2 left handed) with no psychiatric or neurological disorders were recruited for the study. Handedness of participants is determined by Edinburgh Handedness Questionnaire. Furthermore all of the subjects were screened with audiometric testing to ensure normal hearing on both ears. 64-channel digital EEG recording was performed by Scan 4.2 software while stimuli were presented to the subjects electrically shielded, acoustically isolated, and dimly lit room. A recently developed system, EMISU, is used for integration of stimulation and behavioral data on EEG data, online (6). EEG data were analysed by Neuroscan 4.4 software. SPSS 11.0 was used for statistical analyses and nonparametric tests were used.

**To elicit AERPs**, auditory oddball paradigm is applied via headphones binaurally. Auditory stimuli were 500 ms, 80 dB SPL, sinusoidal (target: 1500 Hz, nontarget:1600 Hz) sounds. Targets occurred in 20-25% of the cases. Subjects were asked to count the target sounds mentally. Continuous EEG data were epoched, grouped according to stimulus type, baseline, filtered (0.5-48 Hz band-pass), and averaged (in time domain). Artifact rejection was performed manually. Peak amplitudes and latencies of N1 and P2 components were measured. P3 mean amplitude value is measured in 300-450 ms range.

**During DL test**, subjects underwent EEG recording. 36 different combinations of /ba/, /da/, /ga/, /ka/, /pa/, /ta/ syllables were represented by headphones, one from each ear. Interstimulus interval was varied randomly between 5.17 and 6.17 seconds. Subjects were asked to recall and mark the syllable they perceived on a keypad using their index finger of one hand. All 36 possible combinations of syllables were presented twice in each session, one session for each hand. Thus a total of 144 (36x2x2) stimuli were presented. Continuous data were epoched and for each subject, epochs were sorted as REA (when the subject recalls the syllable presented in the right ear), LEA (left ear) and HOM (when the same syllable is presented in both ear). After artefact rejection was performed manually, sweep numbers were equated. Then epochs were baseline corrected, filtered (0.5-48 Hz bandpass) and averaged (in time domain). Peak amplitudes and latencies of N1 and P2 were measured manually at Fz and Cz electrodes.

**During MMN paradigm**, subjects underwent EEG recording. A modified version of optimized MMN paradigm developed by Pakarinen et al. (7) is used. Standard tone was 75 ms in duration, at an intensity of 80 dB, composed of three sinusoidal partials (523 Hz as fundamental frequency) and presented simultaneously via headphones (resulting in perception of the sound source as localized in the centre). There were four type of deviants (duration, intensity, frequency, location), each with three levels. Location deviance is achieved by delaying the tone monaurally, right or left with equal probability. Subjects watched a silent movie while the auditory stimuli were presented. A total of 964 tones are presented (484 standard, 480 deviant). The number of stimuli of each deviation level was 40. Interstimulus interval was 500 ms. Continuous EEG data were epoched, grouped according to stimulus type, baseline, filtered (0.5-48 Hz band-pass), and averaged (in time domain). Artifact rejection was performed automatically. Mean value of MMN responses between 100-200 ms (for location deviants), 150-250 ms (for intensity deviants), 125-225 ms (for frequency deviants) or 100-200 ms (for location deviants) was measured automatically. For simplicity, only MMN responses to most deviant stimuli are analysed. Data from Fz and Cz electrodes are used.

## Results

### AERP

Amplitude of N1 response to nontarget but not to target stimulus was reduced in patients at Fz and Cz electrodes compared to controls ( $p<0.05$ ). No latency difference is shown between the N1 responses of group either to target or nontarget stimuli. There is no difference between the N1 responses (amplitude and latency) to target and nontarget stimuli within the groups. Amplitude of P3 response to target stimulus is significantly larger than response to nontarget stimulus in control group ( $p<0.05$ ). This difference is reduced in patient group.

### Dichotic Listening

The percentages of behavioural responses are: for patient group, 52,7% REA; 33,6% LEA; 13,7 Error; for control group, 60,2% REA; 28,6% LEA; 11,2% Error. In LEA and HOM conditions, N1 amplitude of patients is smaller than controls' at Cz electrode ( $p<0.05$ ). In REA condition, N1 amplitude of patients is smaller than controls' at Cz and Fz electrodes ( $p<0.05$ ). No difference in latency of N1 response is observed between the groups. P2 latency and amplitude values also did not differ between groups. Grand average electrophysiological responses of each group at each condition is given in figure 1.

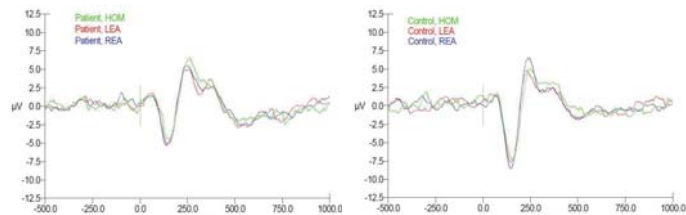


Figure 1. Grand averages of REA, LEA and homonym conditions for patient (left) and control (right) groups.

### MMN

The procedure, effectively distinguished the four above mentioned auditory specifications in both patients and controls (fig.2). MMN response at Cz electrode to location deviation are diminished in patients in respect to controls ( $p<0.05$ ). MMN response to both intensity and frequency deviation are reduced in patients in respect to controls at Fz and Cz electrodes ( $p<0.05$ ). No reduction in MMN response to location deviation is observed.

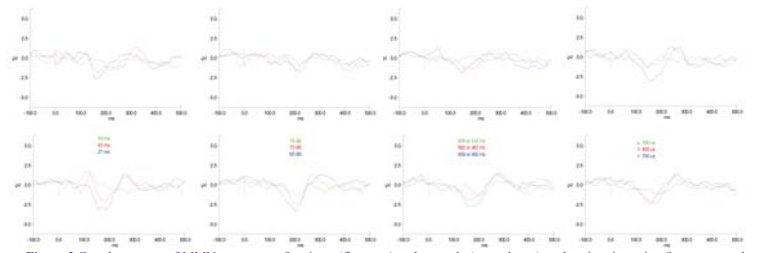


Figure 2. Grand averages of MMN responses of patients (first row) and controls (second row) to duration, intensity, frequency, and location deviations (1st, 2nd, 3rd, and 4th column, respectively). Different levels of deviation from the standard tone are indicated with different colours (green: lowest deviation level, red: intermediate deviation level, blue: highest deviation level).

## Discussion&Conclusion

This is the first study that applied AERP, MMN and DL on the same heads of the healthy individuals and patients. Turetsky et al (8) has proposed that MMN and N100 (AERP) could be from common cortical generators in a recent study with schizophrenics. Price et al. (9) suggested a multivariate electrophysiological phenotype. Furthermore, P300 has been reported to be reduced as a progressive indicator of the disease (10). On the other hand, MMN (frequency and duration) has been found to be less sensitive to predict the course of the later stages of the disease (11). Therefore, an ideal design should incorporate different aspects of such cognitive analysis, namely MMN, AERP and DL. Our results point to the applicability of a multiblock design in schizophrenia. The value of the dichotic paradigm and the relative ease of the application are supporting measures of the new design. Recently, Kim and Chung (12) also supported the importance of one-syllable words for studying laterality functions. Finally, the electrophysiological data can now be effectively applied to construct 3D functional electrophysiological imaging (see fig. 3). The joint analysis of such data with the classical methods i.e. fMRI will possibly become routine applications.

### REFERENCES

1. Turetsky BI, Calkins ME, Light GA, Olincy A, Radant AD, Swerdlow NR. Neurophysiological Endophenotypes of Schizophrenia: The Viability of Selected Candidate Measures. *Schizophrenia Bulletin* 2007; 33(1): 69-94.
2. Uhlirich D, Krljes S. Mismatch Negativity in Schizophrenia: A Meta-Analysis. *Schizophrenia Research* 2005; 76(1): 1-23.
3. Kimura D. Functional Asymmetry of the Brain in Dichotic Listening. *Cortex* 1967; 3: 163-168.
4. Tervaniemi M, Hugdahl K. Lateralization of Auditory-Cortex Functions. *Brain Research Reviews* 2003; 43: 231-246.
5. Lobeg EM, Hugdahl K, Green MK. Hemispheric Asymmetry in Schizophrenia: A "Dual Deficits" Model. *Biological Psychiatry* 1999; 45: 76-81.
6. Özgören M, Erdoğan U, Bayazit O, Taşlica S, Öniş A. Brain Asymmetry Measurement Using EMISU (Embedded Interactive Stimulation Unit) in Applied Brain Biophysics. (submitted).
7. Pakarinen S, Tiekka R, Rinne T, Huotilainen M, Näätänen R. Measurement of Extensive Auditory Discrimination Profiles Using the Mismatch Negativity (MMN) of the Auditory Event-related Potential (ERP). *Clinical Neurophysiology* 2007; 118(1): 177-185.
8. Turetsky BI, Calkins ME, Light GA, Olincy A, Radant AD, Swerdlow NR. Neurophysiological Endophenotypes of Schizophrenia: The Viability of Selected Candidate Measures. *Schizophrenia Bulletin* (in press) doi:10.1093/schbul/sbl060.
9. Price GW, Meltzer PJ, Johnson J, Imms-Brown H, Kent A, Chisa P, Jablensky AV. A Multivariate Electrophysiological Endophenotype, from a Utility Cohort, Shows Greater Research Utility than Any Single Feature in the Western Australian Family Study of Schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2006; 60: 1-10.
10. Özgürül S, Littman E, Hauser M, et al. Neurocognitive performances in participants of at-risk mental state for schizophrenia and in first-episode patients. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 2008; 11:1-10.
11. Maguire F, Yeat S, Thakore JH, Grayson H, De Sanctis P, Foxe JJ. Are Auditory-Evoked Frequency and Duration Mismatch Negativity Deficits Endophenotypic for Schizophrenia? High-Density Electrical Mapping in Clinically Unaffected First-Degree Relatives and First-Episode and Chronic Schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2008; 64(5):585-591.
12. Kim JS, Chung CK. Language Lateralization Using Meg Beta Frequency Deynchronization during Auditory Oddball Stimulation with One-syllable Words. *NeuroImage* 2008; 42(4): 1499-1507.
13. Pascual-Marqui RD, Michel CM, Lehmann D. Low Resolution Electromagnetic Tomography: A New Method for Localizing Electrical Activity in the Brain. *International Journal of Psychophysiology* 1994; 18: 49-65.
14. Pascual-Marqui RD, Esslen M, Kochi K, Lehmann D. Functional Imaging with Low Resolution Brain Electromagnetic Tomography (LORETA): Review, New Comparisons, and New Validation. *Japanese Journal of Clinical Neurophysiology* 2002; 30:81-89.

**Acknowledgement:** The authors are thankful to Onur Bayazit for his support during the research. This study was supported by DEU project 2006.KB.SAG.038

**For further information contact with Murat Özgören (murat.ozgoren@deu.edu.tr)**

### Exemplary Application of sLORETA

sLORETA (Low Resolution Electromagnetic Tomography) was applied to our DL test data in order to estimate the neural sources of event related scalp potentials (Pascual-Marqui et al., 1994; 2002) in the sLORETA 2D potential distribution to 3D brain volume. MNI (Montreal Neurological Institute) was referred for standard solution space which was subdivided into a 3D grid consisting of 2394 volume elements with a regular cube size of 7x7x7 mm. An equivalent current dipole is positioned, for which a current density ( $\mu A/mm^2$ ) is computed on each of these voxels (Pascual-Marqui et al., 1994; 2002). Brodmann Area (BA) 7, postcentral gyrus, parietal lobe activations were observed when N1 peak occurs in REA condition.

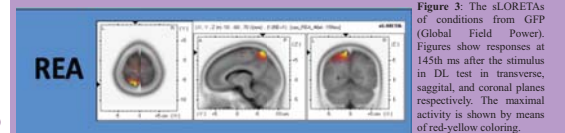


Figure 3: The sLORETA of conditions from GFP (Global Field Power). Figures show responses at 145ms after the stimulus in DL test in transverse, sagittal, and coronal planes respectively. The maximal activity is shown by means of red-yellow coloring.



# MODIFIED MMN AND DICHOTIC LISTENING PARADIGM APPLIED IN SCHIZOPHRENIA PATIENTS



Adile ÖNİZ<sup>1</sup>, Murat ÖZGÖREN<sup>1</sup>, Serhat TAŞLICA<sup>1</sup>, Çağdaş GÜDÜCÜ<sup>1</sup>  
Ahmet AKTENER<sup>2</sup>, Berna AKDEDE<sup>2</sup>, Köksal ALPTEKİN<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics  
<sup>2</sup>Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Psychiatry

## Introduction

In Dichotic Listening (DL) test, two different auditory stimuli are simultaneously presented to a subject, one in each ear (1). Among the different procedures of DL, consonant-vowel syllable setup is one of the most frequently used methods to study language asymmetry in the human brain (2). As contralateral projections to the temporal lobe are stronger than ipsilateral projections and left temporal lobe is involved in phonological input, subjects recall from right ear better than left ear. This Right Ear Advantage (REA) is reduced in schizophrenia, an expected result as functional and anatomical asymmetry of auditory areas is also reduced in this pathology (3). Mismatch Negativity (MMN) is an endogenous response which is elicited, irrespective of the subject's attention or behavioral task, when a series of a standard sound is interrupted by an infrequent deviant sound (differs from standard sound by any characteristics of sound like duration, intensity and pitch) (4). Many studies have reported abnormalities in the generation of MMN in schizophrenia (for a meta-analysis, see reference 5).

## Materials&Methods

Patients diagnosed with schizophrenia according to DSM-IV were recruited from the Department of Psychiatry of Dokuz Eylul University, Turkey. Control subjects with no psychiatric or neurological disorders were matched to the patients with respect to age and sex. All participants received more than 60 points in Edinburgh Handedness Questionnaire and were identified as right handed. Furthermore all of the subjects were screened with audiometric testing (0.125, 0.25, 0.5, 0.750, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, and 8 kHz with SibelMED, AC-50D) to ensure normal hearing on both ears. 64-channel digital EEG recording was performed by Scan 4.2 software while stimuli were presented to the subjects electrically shielded, acoustically isolated, and dimly lit room. A recently developed system, EMISU, is used for integration of stimulation behavioral and data on EEG data, online (emisu ref). EEG data were analysed by Neuroscan 4.3 software. SPSS 12.0 was used for statistical analyses.

### DL

During DL test, 12 patients (mean age 35.2) with schizophrenia and 12 healthy control subjects (mean age 30.8) underwent EEG recording. 36 different combinations of "BA", "DA", "GA", "KA", "PA", "TA" syllables were represented by headphones, one from each ear. Interstimulus interval was varied randomly between 5.17 and 6.17 seconds. Subjects were asked to recall and mark the syllable they perceived on a keypad using their index finger of one hand. All 36 possible combinations of syllables were presented twice in each session, one session for each hand. Thus a total of 144 (36x2x2) stimuli were presented. Continuous data were epoched (1000 ms prestimulus, 1000 ms poststimulus), baseline corrected (according to prestim area), filtered (0.5-30 Hz bandpass) and averaged (in time domain). Artifact rejection was performed manually. For each subject, epochs were sorted as REA (when the subject recalls the syllable presented in the right ear), LEA (left ear) and diotic (when the same syllable is presented in both ear). Then sweep numbers were equated and each group was averaged separately. Peak-to-peak amplitudes of N1-P2, and N2-P3, amplitude of Late Negativity (LN), latencies of N1, P3 and LN were measured manually at Cz electrode.

### MMN

During MMN paradigm, 15 patients (age 23-49 years, mean 34.1) with schizophrenia and 15 healthy control subjects (age 22-48 years, mean age 30.2) underwent EEG recording. A modified version of optimized MMN paradigm developed by Pakarinen et al. (6) is used. Standard tone was 75 ms in duration, at an intensity of 80 dB, composed of three sinusoidal partials (523 Hz as fundamental frequency) and presented simultaneously via headphones (resulting in perception of the sound source as localized in the centre). There were four type of deviants (duration, intensity, frequency, location), each with three levels. Location deviance is achieved by delaying the tone monaurally, right or left with equal probability. Subjects watched a silent movie while the auditory stimuli were presented. A total of 964 tones are presented (484 standard, 480 deviant). The number of stimuli of each deviation level was 400. Interstimulus interval was 500 ms. Continuous EEG data were epoched (100 ms prestim, 500 ms poststim), baseline corrected (according to prestim area), filtered (0.5-30 Hz bandpass), and averaged (in time domain). Artifact rejection was performed automatically, rejecting all sweeps that had amplitude higher than 50 µV at Cz electrode. Averaged data was further filtered (0.5-20). Mean value of MMN responses between 125-225 ms was measured automatically.

## Results

The percentages of behavioural responses were (fig. 1):

For case group; 52.17 right ear advantage (REA); 33.51 left ear advantage (LEA); 14.32 error  
For control group; 56.82 right ear advantage (REA); 33.32 left ear advantage (LEA); 9.86 error

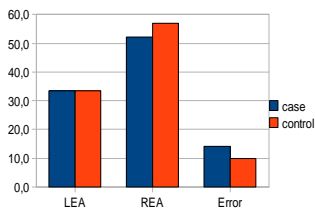


Figure 1: Percentages of the responses of case and control groups to the stimuli. REA: the subject recalls the syllable presented in the right ear, LEA: the subject recalls the syllable presented in the left ear, Error: the subject recalls a syllable not presented. Diotic conditions are excluded.

For the electrophysiological analysis, responses were observed in three time windows (N1P2, N2P3, and LN) (fig. 2). A repeated measures of ANOVA revealed differentiation between latency of responses to different conditions (REA, LEA and diotic) of Late Negativity responses ( $F(2)=4.741, p=0.015$ ).

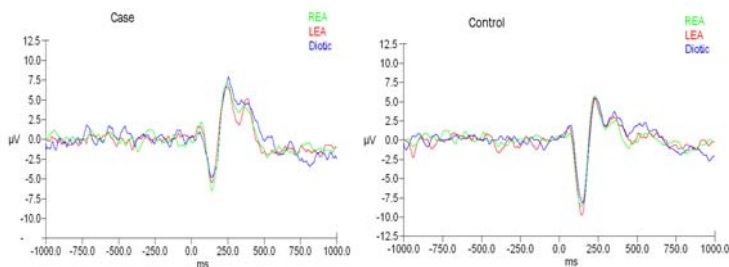


Figure 2. Grand averages of REA, LEA and diotic conditions for case (left) and control (right) groups.

## Conclusion

The present results of right ear/left hemisphere dominance in dichotic syllable test supports the previous studies (1). Furthermore, this is the first known study that evaluates electrophysiological responses in three different conditions (REA, LEA, diotic) in schizophrenia patients with a similar approach. Whether the increased error rate in schizophrenic subjects is due to the deficits in coping with conflicting stimuli or due to the general cognitive deficits (understanding the instructions etc.) can be investigated further by comparing the error rates in diotic and dichotic conditions. Error rates in monotic condition (one syllable only in one ear) can also be compared with these conditions. The results confirm the sensitivity of DL paradigm as well as the possible implications to conflict processing mechanisms. The results from MMN paradigm validate the sensitivity and applicability of the modified paradigm, which has a comparatively easy and cost effective application. Further, it requires minimal obedience on the patient's side, which is crucial for the effective paradigm applications.

## REFERENCES

1. Kimura D, Functional Asymmetry of the Brain in Dichotic Listening. Cortex 3 (1967) 163-168.
2. Tervaniemi M, Hugdahl K, Lateralization of Auditory-cortex Functions. Brain Research Reviews 43 (2003) 231-246.
3. Löberg EM, Hugdahl K, Green MK, Hemispheric Asymmetry in Schizophrenia: A "Dual Deficits" Model. Bipolar Psychiatry 45 (1999) 76-81.
4. Turetsky BI, Calkins ME, Light GA, Olincy A, Radant AD, Swerdlow NR. Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: the viability of selected candidate measures. Schizophr Bull. 2007 Jan;33(1):69-94.
5. Umbrecht D, Krüger S. Mismatch negativity in schizophrenia: a meta-analysis. Schizophr Res. 2005 Jul 1;76(1):1-23.
6. Pakarinen S, Takegata R, Rinne T, Huotilainen M, Näätänen R. Measurement of extensive auditory discrimination profiles using the mismatch negativity (MMN) of the auditory event-related potential (ERP). Clin Neurophysiol. 2007 Jan;118(1):177-85.

Acknowledgement: The authors are thankful to research assistant Onur Bayazit for his support during the research. This study was supported by DEU project 2006.KB.SAG.038

For further information contact with Adile Öniz (adile.oniz@deu.edu.tr)

The preliminary analysis revealed MMN responses to duration and frequency deviations to be diminished in schizophrenia patients in respect to controls ( $p<0.05$ ). The procedure, effectively distinguished the four above mentioned auditory specifications in both patients and controls. The grand average wave forms before subtraction point to a distinctly different wave pattern with clear responses in the controls. However, the patient MMN responses were somewhat less clear and consistent (fig. 3). The joint application of the deviant stimuli concurrently gives a ground to jointly analyze and assess the mechanisms behind the variations. This can further be applied to different age groups etc.

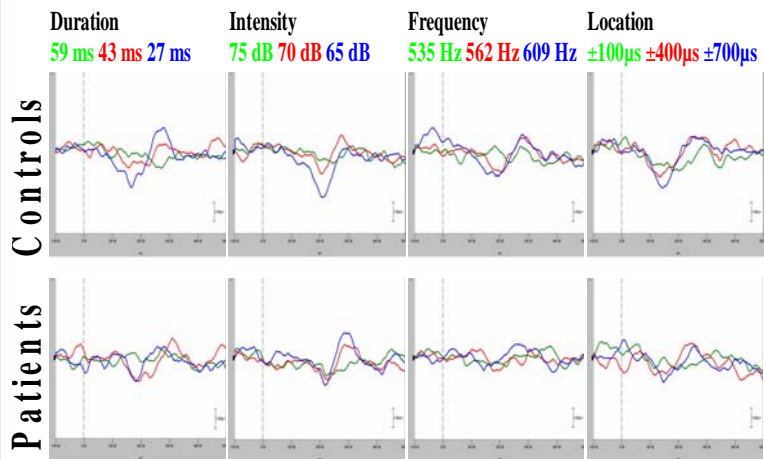


Figure 3. Grand averages of MMN responses of controls (first row) and patients (second row) to duration, intensity, frequency, and location deviations (1st, 2nd, 3rd, and 4th column, respectively). Different levels of deviation from the standard tone are indicated with different colours (green: lowest deviation level, red: intermediate deviation level, blue: highest deviation level). Time of stimulus presentation is marked with a vertical dashed line. Positive potentials are shown upwards on Y axis.





Adile Öniz<sup>1,2</sup>, Murat Özgören<sup>1,2</sup>, Serhat Taşlıca<sup>1</sup>, Çağdaş Güdücü<sup>1</sup>, Ahmet Aktener<sup>3</sup>  
Berna Akdede<sup>3</sup>, Köksal Alptekin,<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biophysics, <sup>2</sup>Brain Dynamics Research Center, <sup>3</sup>Department of Psychiatry  
Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Balçova, 35340, İzmir, Turkey

**ABSTRACT** The mismatch negativity has attracted a number of scientists in the schizophrenia research area. The major reason is that the MMN paradigm has sensitivity to assess the electrophysiological abnormality in the patients, both in early and later stages of the disease. The aim of this study was to show the applicability of the modified version of so called "optimal MMN paradigm". 15 patients (age 23-49 years, mean 34.1) with schizophrenia (DSM-IV criteria) and 15 healthy control subjects (age 22-48 years, mean age 30.2) were recruited and underwent 64-channel EEG recording. The stimuli consisted of auditory stimuli with duration, intensity, frequency and location deviants which were applied while subjects watched a silent movie. The first stage preliminary analysis revealed duration and frequency deviations to be diminished in schizophrenia patients in respect to controls ( $p < 0.05$ ). The procedure, effectively distinguished the four above mentioned auditory specifications in both patients and controls. The grand average wave forms before subtraction point to a distinctly different wave pattern with clear responses in the controls. The results validate the sensitivity and applicability of the modified paradigm, which has a comparatively easy and cost effective application. Further, it requires minimal obedience on the patient's side, which is crucial for the effective paradigm applications.

## Introduction

Mismatch Negativity (MMN) is an endogenous response which is elicited, irrespective of the subject's attention or behavioral task, when a series of a standard sound is interrupted by an infrequent deviant sound (differs from standard sound by any characteristics of sound like duration, intensity and pitch) (1). It is memory-based. It peaks 150-200 ms after the deviant stimulus and temporally overlaps with N1 response (2). That's why a difference wave is obtained by subtracting the standard stimulus ERP from that of the deviant stimulus for the different deviant stimuli in order to show MMN on the graph. MMN is generated by auditory cortices and dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) and is NMDA dependent. In a twin study(3), heritability of MMN amplitude is found to be 0.68.

Many studies have reported abnormalities in the generation of MMN in schizophrenia (for a meta-analysis, see 4). Anti-psychotic treatment or clinical change from acute to non-acute phase does not seem to be ameliorated (for a review, see 1). Many studies reported reduced MMN in unaffected family members of schizophrenic patients but studies with negative results are also present (1).

## Materials&Methods

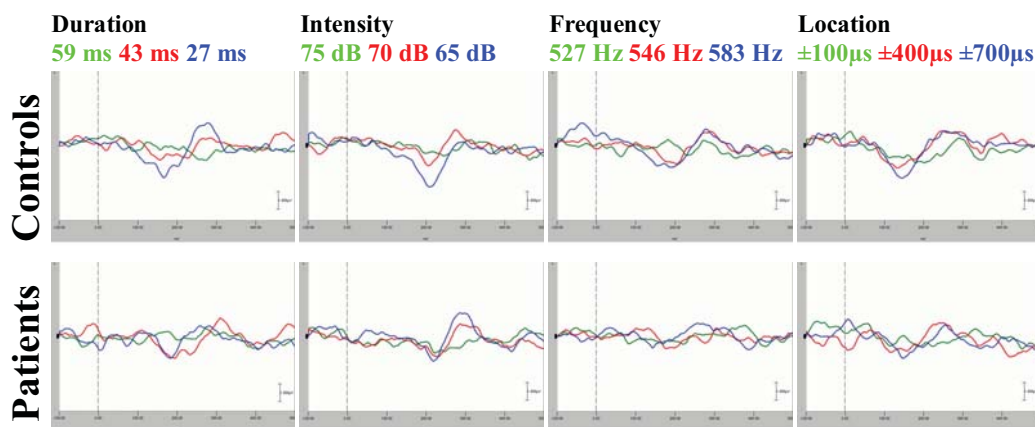
15 patients (age 23-49 years, mean 34.1) with schizophrenia (DSM-IV criteria) and 15 healthy control subjects (age 22-48 years, mean age 30.2) were recruited and underwent 64-channel EEG recording, by using Neuroscan 4.2. A modified version of optimized MMN paradigm developed by Pakarinen et al. (5) is used. Standard tone was 75 ms in duration, at an intensity of 80 dB, composed of three sinusoidal partials (523 Hz as fundamental frequency) and presented simultaneously via headphones (resulting in perception of the sound source as localized in the centre). There were four type of deviants (duration, intensity, frequency, location), each with three levels (table 1). Location deviance is achieved by delaying the tone monaurally, right or left with equal probability. Subjects watched a silent movie while the auditory stimuli were presented. A total of 964 tones are presented (484 standard, 480 deviant). Each level of each deviant type had the same probability so the number of each deviant stimuli was approximately 40. Interstimulus interval was 500 ms. Continuous EEG data were epoched (100 ms prestim, 500 ms poststim), baseline corrected (according to prestim area), filtered (0.5-30 Hz band-pass), and averaged (in time domain) by Neuroscan 4.3. Artifact rejection was performed automatically, rejecting all sweeps that had amplitude higher than 50  $\mu$ V at Cz electrode. Averaged data was further filtered (0.5-20). Mean value of MMN responses between 125-225 ms was measured automatically. For statistical analysis, SPSS 12.0 was used.

## Results

The first stage preliminary analysis revealed duration and frequency deviations to be diminished in schizophrenia patients in respect to controls ( $p < 0.05$ ). The procedure, effectively distinguished the four above mentioned auditory specifications in both patients and controls. The grand average wave forms before subtraction point to a distinctly different wave pattern with clear responses in the controls. However, the patient MMN responses were somewhat less clear and consistent. The joint application of the deviant stimuli concurrently gives a ground to jointly analyze and assess the mechanisms behind the variations. This can further be applied to different age groups etc.

	Duration			Intensity			Frequency			Location		
	59 ms	43 ms	27 ms	75 dB	70 dB	65 dB	527 Hz	546 Hz	583 Hz	$\pm 100 \mu$ s	$\pm 400 \mu$ s	$\pm 700 \mu$ s
Case	-0,06	-0,80	-0,48	-0,17	-0,39	-0,95	0,19	-0,56	-0,19	0,01	-0,36	-0,85
Control	-0,20	-0,64	-1,04	-0,30	-0,51	-1,65	0,05	-0,97	-1,32	-0,69	-0,48	-0,73

**Table 1.** Grand average of mean values of MMN amplitude responses ( $\mu$ V) between 125-225 ms after stimuli.



**Figure 1.**

### The four dimensions of MMN deviations

Grand averages of MMN responses of controls (first row) and patients (second row) to duration, intensity, frequency, and location deviations (1st, 2nd, 3rd, and 4th column, respectively). Different levels of deviation from the standard tone are indicated with different colours (green: lowest deviation level, red: intermediate deviation level, blue: highest deviation level). Time of stimulus presentation is marked with a vertical dashed line.

**Conclusion** The results validate the sensitivity and applicability of the modified paradigm, which has a comparatively easy and cost effective application. Further, it requires minimal obedience on the patient's side, which is crucial for the effective paradigm applications.

## REFERENCES

1. Turetsky BI, Calkins ME, Light GA, Olincy A, Radant AD, Swerdlow NR. Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: the viability of selected candidate measures. *Schizophr Bull.* 2007 Jan;33(1):69-94.
2. Näätänen R, Paavilainen P, Rinne T, Alho K. The mismatch negativity (MMN) in basic research of central auditory processing: a review. *Clin Neurophysiol.* 2007 Dec;118(12):2544-90.
3. Hall MH, Schulze K, Rijdsdijk F, Picchioni M, Ettinger U, Bramon E, Freedman R, Murray RM, Sham P. Heritability and reliability of P300, P50 and duration mismatch negativity. *Behav Genet.* 2006 Nov;36(6):845-57.
4. Umbricht D, Krljes S. Mismatch negativity in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res.* 2005 Jul 1;76(1):1-23.
5. Pakarinen S, Takegata R, Rinne T, Huotilainen M, Näätänen R. Measurement of extensive auditory discrimination profiles using the mismatch negativity (MMN) of the auditory event-related potential (ERP). *Clin Neurophysiol.* 2007 Jan;118(1):177-85.

**Acknowledgement:** This study was supported by DEU project 2006.KB.SAG.038

**ÖZGEÇMİŞ**  
**Araştırma**  
**Görevlisi SERHAT TAŞLICA**

TC Kimlik No / Pasaport No:	39085138940
Doğum Yılı:	1984
Yazışma Adresi :	1409 Sok. No:9 D:1 Buca Koop. Buca-İZMİR İzmir/Türkiye
Telefon :	232-4124494
e-posta :	serhat.taslica@deu.edu.tr

**EĞİTİM BİLGİLERİ**

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Orta Doğu Teknik Üniversitesi	FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ	MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK	Lisans	2007

**AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM**

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TEMEL TIP BİLİMLERİ	Araştırma Görevlisi	2007-

**UZMANLIK ALANLARI**

Uzmanlık Alanları
Nörobiyofizik , İnsan Genetiği
Beyin, Elektrofizyoloji, Şizofreni, Genetik, Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu, Neurofeedback

**DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER**

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	
	Devam

		<b>Tamamlanan</b>	<b>Eden</b>
<b>Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı</b>	<b>Yüksek Lisans</b>		
	<b>Doktora</b>		
	<b>Uzmanlık</b>		
<b>Diğer Faaliyetler</b> (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

### ÖDÜLLER

<b>Ödülün Adı</b>	<b>Alındığı Kuruluş</b>	<b>Yılı</b>
Soruna Yönelik Sistem Geliştirme Ödülü (Üçüncülük)	Dokuz Eylül Üniversitesi	2007
Poster Bildiri Ödülü (Üçüncülük)	Türkiye Psikiyatri Derneği	2007

### YAYINLARI

#### SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

OZGOREN M, ERDOGAN U, BAYAZIT O, TASLİCA S, ONİZ A. BRAİN ASYMMETRY MEASUREMENT USING EMISU (EMBEDDED İNTERACTIVE STİMULATION UNIT) İN APPLIED BRAİN BİOPHYSİCS. COMPUT BİOL MED. 2009 OCT39(10):879-88.

#### Diğer dergilerde yayımlanan makaleler

Ulaş H, Taşlıca S, Alptekin K. Şizofrenide Nörofizyolojik ve Nörokognitif Genetik Belirleyicilerin (Endofenotip) Yeri Klinik Psikiyatri Dergisi, 2008 (Ek 4)

#### Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar

Özgören M., Öniz A., Taşlıca S., Aktener A., Akdede B., Alptekin K. Multiblock Auditory Approach in Schizophrenia Patients. 12th International Congress on Schizophrenia Research (2009, ABD). Poster Bildiri.

Öniz A., Özgören M., Taşlıca S., Güdücü Ç., Aktener A., Akdede B., Alptekin K. Modified MMN and Dichotic Listening Paradigm Applied in Schizophrenia Patients. 14th World Congress of Psychophysiology: The Olympics of the Brain (2008, Rusya). Poster Bildiri.

Öniz A., Özgören M., Taşlıca S., Güdücü Ç., Aktener A.Y., Akdede B.B., Alptekin K. Optimal Mismatch Negativity applied in Schizophrenia Patients. 1st Schizophrenia International Research Society Conference (2008, İtalya). Poster Bildiri

#### Diğer yayımlar

Turan Onur Bayazıt, Sibel Kocaaslan, Burcu Aydın, Reha Uğraş Erdoğan, Çağdaş Güdücü, Serhat Taşlıca. Kavram haritaları ve beyin biyofiziği alanı tanımları. Ed. Murat Özgören, Adile Öniz, The



Applied Brain Biophysics, ISBN:978-975-441-259-8, DEÜ Rektörlük Matbaası, (2009), Syf.343-365.