

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXVII
2007
SUPPLEMENT 7**

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Tomasz Gos

**SAMOBÓJSTWO A DEPRESJA
W ŚWIETLE ILOŚCIOWYCH BADAŃ
NEUROHISTOLOGICZNYCH MÓZGU**

*Suicide and depression in quantitative neurohistological
investigations of the brain*

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: dr hab. med. Zbigniew Jankowski

Gdańsk 2007

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan, prof. AMG,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak,
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
80-210 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published in Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

SPIS TREŚCI

Spis treści.....	5
Wykaz ważniejszych skrótów użytych w pracy.....	7
Wstęp.....	8
1. Wprowadzenie.....	8
2. Znaczenie zaburzeń jądra grzbietowego szwu.....	10
3. Znaczenie zaburzeń kory przedniej części zakrętu obręczy.....	11
4. Znaczenie zaburzeń kory oczodołowo-czołowej.....	12
5. Znaczenie zaburzeń neuronów noradrenergicznych miejsca sinawego.....	12
6. Znaczenie zaburzeń układu GABAergicznego.....	13
Cele pracy.....	15
Materiały i metodyka.....	16
1. Charakterystyka materiału badawczego.....	16
2. Badania kariometryczne.....	22
2.1. Preparatyka mózgu.....	22
2.1.1. Badania neuronów jądra grzbietowego szwu.....	22
2.1.2. Badania neuronów piramidowych warstw III i V kory przedniej części zakrętu obręczy.....	22
2.1.3. Badania neuronów piramidowych warstw III i V kory oczodołowo-czołowej.....	23
2.2. Barwienie metodą AgNOR.....	23
2.3. Badania ilościowe.....	24
2.3.1. Badania neuronów jądra grzbietowego szwu.....	24
2.3.2. Badania neuronów piramidowych warstw III i V kory przedniej części zakrętu obręczy i oczodołowo-czołowej.....	25
2.4. Analiza statystyczna wyników.....	25
2.4.1. Analiza wyników badań neuronów jądra grzbietowego szwu.....	25
2.4.2. Analiza wyników badań neuronów piramidowych warstw III i V kory przedniej części zakrętu obręczy oraz oczodołowo-czołowej.....	26
3. Badania liczby neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym mostu.....	30
3.1. Preparatyka mózgu.....	30
3.2. Procedura immunohistochemiczna.....	30
3.3. Badania ilościowe.....	31
3.4. Analiza statystyczna wyników.....	31
4. Badania gęstości neuropilu GABAergicznego w regionach kory przedczołowej i w wybranych strukturach limbicznych płata skroniowego.....	33
4.1. Preparatyka mózgu.....	33
4.2. Procedura immunohistochemiczna.....	33
4.3. Badania ilościowe.....	33
4.4. Analiza statystyczna wyników.....	34
Wyniki.....	36
1. Badania kariometryczne neuronów jądra grzbietowego szwu.....	36
1.1. Zmienne wklajające.....	36
2. Badania kariometryczne neuronów piramidowych warstw III i V kory przedniej części zakrętu obręczy.....	39
2.1. Zmienne wklajające.....	39

3. Badania kariometryczne neuronów piramidowych warstw III i V kory oczodołowo-czołowej	43
3.1. Zmienne wikłające.....	44
4. Badania liczby neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym.....	48
4.1. Zmienne wikłające.....	48
5. Badania gęstości neuropilu GABAergicznego w regionach kory przedczołowej i w wybranych strukturach limbicznych płata skroniowego	50
5.1. Zmienne wikłające	50
Dyskusja	54
1. Badania kariometryczne neuronów jądra grzbietowego szwu.....	54
2. Badania kariometryczne neuronów piramidowych warstw III i V kory przedniej części zakrętu obręczy.....	56
3. Badania kariometryczne neuronów piramidowych warstw III i V kory oczodołowo-czołowej.....	59
4. Badania liczby neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym	62
5. Badania gęstości neuropilu GABAergicznego w regionach kory przedczołowej i w wybranych strukturach limbicznych płata skroniowego.....	64
6. Dyskusja podsumowująca	68
Wnioski.....	70
Piśmiennictwo.....	71
Streszczenie	89
Summary.....	91

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY

- AC – kora przedniej części zakrętu obręczy (ang. *anterior cingulate cortex*), ACv – część brzuszna, ACd – część grzbietowa
- AgNOR – srebrochłonny organizator jąderkowy (ang. *argyrophilic nucleolar organiser*)
- ANOVA – analiza wariancji (ang. *analysis of variance*)
- BD – zaburzenie dwubiegunowe (ang. *bipolar disorder*)
- CA1 – pole CA1 hipokampa
- CRH – kortykoliberyna (ang. *corticotropine-releasing hormone*)
- DG – zakręt zębaty (ang. *dentate gyrus*)
- DLC – grzbietowo-boczna kora przedczołowa (ang. *dorsolateral prefrontal cortex*)
- DRN – jądro grzbietowe szwu (ang. *dorsal raphe nucleus*)
- DSM-IV – Diagnostyczny i Statystyczny Podręcznik Zaburzeń Psychiczych, wydanie IV (ang. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition*)
- EC – kora śródwęchowa (ang. *entorhinal cortex*)
- GABA – kwas gamma-aminomasłowy (ang. *gamma-amino butyric acid*)
- GAD – dekarboksylaza kwasu glutaminowego (ang. *glutamic acid decarboxylase*)
- GDNF – czynnik neurotroficzny pochodzący z linii komórek glejowych (ang. *glial-cell-line-derived neurotrophic factor*)
- HPA – (oś) podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal [axis]*)
- 5-HT – 5-hydroksytryptamina (serotonina)
- 5-HTT – transporter serotoninowy
- KW – (test) Kruskal-Wallis
- LC – miejsce sinawe (ang. *locus coeruleus*)
- LD – jądro boczne grzbietowe wzgórza (ang. *lateral dorsal thalamic nucleus*)
- MANOVA – wieloczynnikowa analiza wariancji (ang. *multivariate analysis of variance*)
- MD – jądro przyśrodkowe grzbietowe wzgórza (ang. *medial dorsal thalamic nucleus*)
- MDD – duża depresja (ang. *major depressive disorder*)
- NA – noradrenalina
- NOR – organizator jąderkowy (ang. *nucleolar organiser*)
- OFC – kora oczodołowo-czołowa (ang. *orbitofrontal cortex*)
- OUN – ośrodkowy układ nerwowy
- P* – poziom znamienności (istotności) statystycznej
- PET – pozytonowa tomografia emisyjna (ang. *positron emission tomography*)
- PFC – kora przedczołowa (ang. *prefrontal cortex*)
- rDNA – rybosomalny DNA
- SD – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)
- TH – hydroksylaza tyrozynowa (ang. *tyrosine hydroxylase*)

WSTĘP

1. Wprowadzenie

Samobójstwo jest dużym problemem zdrowotnym, powodującym prawie połowę wszystkich zgonów gwałtownych, co stanowi około miliona ofiar śmiertelnych na świecie w skali rocznej. Wyniki badań epidemiologicznych w krajach zarówno rozwiniętych jak i rozwijających się wskazują na występowanie zaburzeń psychicznych w 80%-100% dokonanych, tj. zakończonych zgonem samobójstw, przy czym depresja jest najczęstszym z nich, występującym w ok. 50% przypadków [278]. Pomimo tych jednoznacznych danych statystycznych, przekonanie o zasadniczej roli czynnika neurobiologicznego w podłożu samobójstwa nie jest w pełni podzielane zwłaszcza wśród przedstawicieli nauk humanistycznych, na co wskazał m.in. Pużyński [224].

Za powstawanie bogatych i różnorodnych objawów depresji odpowiadają najpewniej zaburzenia licznych struktur mózgu, wśród nich w głównej mierze kory przedczołowej, zespołu hipokampa, prążkowiec z jądrem półleżącym, ciała migdałowatego i wzgórza oraz komponent układów monoaminergicznych, zwłaszcza serotonergicznego. Bardzo ważną rolę w patogenezie depresji przypisuje się także przewlekłym zaburzeniom osi podwzgórze-przysadka-nadnercza [90, 197, 252]. Wyniki współczesnych badań neurobiologicznych wskazują, że procesy prowadzące do samobójstwa stanowią odrębne zjawisko w depresji [8, 24, 33, 109, 168, 170, 249], jednak również i ten pogląd nie jest jeszcze powszechnie akceptowany. Może wynikać to z faktu, że kryteria diagnostyczne jednoznaczne dla każdego z tych zjawisk patologicznych nie zostały dotychczas opracowane a mogłyby one być ważne zarówno dla psychiatrii jak i medycyny sądowej.

W medycynie sądowej bowiem szczególne znaczenie posiada diagnostyka różnicowa pomiędzy samobójstwem dokonany i zabójstwem. W aspekcie takim na uwagę zasługują: samobójstwo kombinowane (złożone), samobójstwo wspólne, zabójstwo z samobójstwem sprawcy oraz symulacja czy dysymulacja samobójstwa. Ustalenia mogą być trudne, jeśli w ramach jednego zdarzenia jednocześnie lub bezpośrednio jedna po drugiej zostaną zastosowane dwie lub więcej metod samobójstwa. Do takiej sytuacji odnosi się pojęcie samobójstwa kombinowanego (ang. *complex suicide*, niem. *kombinierter Suizid*), w którym wyróżnia się pierwotne (planowane) i wtórne (nieplanowane, improwizowane) [41, 221]. Podobne trudności mogą pojawić się w przypadku samobójstwa wspólnego (podwójnego lub wielokrotnego, ang. *suicide pact*), gdy dwoje lub więcej ludzi chce wspólnie rozstać się z życiem i dlatego zgodnie postanawia dokonać jednocześnie samobójstwa lub przyzwolić, aby uczyniła to inna osoba, która następnie popełnia samobójstwo [221]. Ta druga forma stanowi w istocie rzeczy postać zabójstwa z samobójstwem sprawcy (ang. *homicide-suicide*, *dyadic death*) [152, 190]. Może ona być bardzo trudna czy wręcz niemożliwa do odróżnienia od tzw. samobójstwa poagresyjnego (ang. *post-aggression suicide*), w którym osoba popełniająca samobójstwo pozbawia życia najpierw inną osobę (inne osoby) bez przyzwolenia lub wbrew woli [36, 152]. Ta szczególna forma samobójstwa jest określana w dalszym ciągu w sposób tradycyjny przez autorów niemieckich mianem samobójstwa poszerzonego (niem. *erweiterter Suizid*, *Mitnahmesuizid*) [220] pomimo zastrzeżeń nomenklaturowych, podnoszonych przez autorów innych [152].

Kolejnym źródłem trudności w diagnostyce sądowo-lekarskiej może być dysymulacja samobójstwa. Motywacje do takiego działania mogą być różne. W przeszłości czynnikiem nie bez znaczenia mogła być chęć uzyskania przez rodzinę pogrzebu kościelnego. Obecnie może być to chęć uniknięcia przez partnera samobójcy zarzutów ze strony jego rodziny, szczególnie w przypadku związków obfitujących w konflikty. Są także znane przypadki, gdy samobójca sam inscenizował czyn swój w taki sposób, aby sprawiał on wrażenie wypadku, np. przypadkowego postrzału przy czyszczeniu broni lub wypadku drogowego [139, 220]. Działanie takie, podkreślane zwłaszcza w odniesieniu do rzekomych wypadków z bronią [139], może mieć na celu chęć zapewnienia najbliższemu wyplaty pełnej sumy ubezpieczenia na życie.

Z kryminalistycznego punktu widzenia o wiele poważniejsze znaczenie posiada chęć zatuszowania zabójstwa poprzez symulację (upozorowanie) samobójstwa. Przykładem takiej sytuacji może być umieszczenie broni palnej w rękę zabitego [139] lub też zadanie zwłokom powierzchownych ran w obrębie przedramion bądź szyi, mających sprawiać wrażenie tzw. nacięć próbnych, często spotykanych w przypadkach rzeczywistych samobójstw [91]. Zdaniem autorów niemieckich [220], szczególnie ważną, niedocenioną w piśmiennictwie anglosaskim grupę upozorowanych samobójstw stanowią przypadki zbrodniczego powieszenia. Szacunkowo przyjmuje się, że na 1000 powieszonych samobójczych przypada 1 zabójstwo [223], przy czym inni autorzy zwracają uwagę na możliwość znacznie większej częstości tego zjawiska [51]. Należy przy tym podkreślić, że przyjęte od dziesięcioleci w medycynie sądowej tradycyjne kryteria różnicujące pomiędzy powieszeniem bądź zadziergnięciem samobójczym i spowodowanym działaniem ręki obcej nie mają charakteru bezwzględnie jednoznacznego [51, 150, 220]. Stwierdzenie to dotyczy także śmiertelnych ran kłutych i ciętych [19, 91, 142, 148, 151], uszkodzeń postrzałowych [85, 139-141] oraz innych następstw urazów mechanicznych [14, 28, 151, 175].

Szczególnym miejscem samobójstwa, którego znaczenie wzrasta od ok. 30 lat jest wanna łazienkowa [51, 220, 258]. Obok zwykle stosowanych w takich okolicznościach sposobów samobójstwa (ran ciętych przedramion i szyi bądź ran kłutych serca) dochodzi w niej coraz częściej do samobójstw kombinowanych wskutek przedawkowania leków/alkoholu z następowym utonięciem. Niezwykle trudnym problemem diagnostycznym może być porażenie prądem elektrycznym w takich okolicznościach z uwagi na bardzo częsty brak znamienia prądu, gdy ciało jest zanurzone w wodzie. Przy braku jednoznacznych danych z badań elektrotechnicznych bądź innych informacji pozamedycznych przypadek taki praktycznie wymyka się możliwości ustalenia przyczyny śmierci. Nie będzie stanowić przesady stwierdzenie, że porażenie prądem w opisanej sytuacji stanowi modelowy przykład trudności w diagnostyce różnicowej pomiędzy samobójstwem, zabójstwem i zgonem wypadkowym. Trudności takie mogą pojawić się także przy ustalaniu przyczyny śmierci w wodzie w innych niż podana okolicznościach [266].

Podany przegląd uzmysławia, że uzyskanie opartych na badaniach mózgu kryteriów diagnostycznych procesów prowadzących do samobójstwa mogłoby być przydatne w sądowo-lekarskiej diagnostyce trudnych opiniodawczo przypadków zgonów gwałtownych.

2. Znaczenie zaburzeń jądra grzbietowego szwu

Zburzenia ośrodkowego układu serotonergicznego implikują etiologię depresji, agresji, impulsywności i procesów prowadzących do samobójstwa. Mogą one być niezależnym od zasadniczego zaburzenia psychicznego czynnikiem zachowań samobójczych, najprawdopodobniej uwarunkowanym w pewnej mierze genetycznie [168, 259, 282]. Dysfunkcja może być ograniczona do niewielkiej struktury mózgu jaką jest należące do kompleksu jąder szwu, znajdujące się w śródmózgowiu i moście jądro grzbietowe szwu (ang. *dorsal raphe nucleus*, DRN) mające wpływ na złożone sieci neuronalne [7, 198, 222, 249]. Ocena biochemiczna płynu mózgowo-rdzeniowego wskazuje, że obniżona aktywność serotonergiczna może być szczególnie wyrażona u osób podejmujących działania samobójcze cechujące się impulsywnością i nasiloną autoagresywnością (ang. *violent suicide*) [67, 171, 172]. Zaburzenia ośrodkowego układu serotonergicznego nasilone wraz z poziomem autoagresywności zamachu samobójczego stwierdzono także pośmiertnie [59, 176]. Jednak statystycznie znamienne spadki stężenia serotoniny, wykazany *post mortem* w płynie mózgowo-rdzeniowym niewielkiej grupy samobójców bez ustalonego rozpoznania psychiatrycznego nie został oceniony jako posiadający wartość diagnostyczną [196].

Neurony serotonergiczne stanowią około 70% neuronów DRN [276]. Prawie wszystkie duże komórki w tym jądrze posiadające długie aksony projekcyjne są serotonergiczne [133]. Stanowią one m.in. źródło większości unerwienia serotonergicznego w przyśrodkowo-brzuszej części kory przedczołowej i w jądrze półleżącym (ang. *nucleus accumbens*) – dwóch regionach mózgu kluczowych dla regulacji zachowań powodowanych przez emocje [71, 168, 197, 263, 276]. Jak wykazano w zwierzęcych modelach doświadczalnych, zaburzone unerwienie serotonergiczne tych regionów jest m.in. konsekwencją emocjonalnej deprywacji społecznej we wczesnym okresie życia osobniczego, uważanej za jeden z czynników usposabiających do rozwoju depresji u człowieka [50, 110].

Wiele badań wykazało zmiany biochemiczne i morfologiczne w DRN u ofiar samobójstwa [9, 15, 18, 23, 33, 43, 109, 161, 260]. Jednakże w danych z piśmiennictwa występują rozbieżności spowodowane różnymi czynnikami. Różnice w rozpoznaniach psychiatrycznych i stosowanym przyżyciowo leczeniu, w przyczynie śmierci (samobójcza/nie-samobójcza), w szczegółowej lokalizacji badanych obszarów oraz mała liczba badanych przypadków należą do najważniejszych z nich [249]. Wobec tego, ocena zmian patologicznych w DRN w zaburzeniach psychicznych powinna być kontynuowana przy pomocy różnych metod badawczych. Dlatego też u chorych z depresją (w tym samobójców) podjęto badania kariometryczne neuronów DRN metodą wysrebrzania AgNOR (skrót od ang. *argyrophilic nucleolar organiser*, srebrochłonny organizator jąderkowy).

Organizator jąderkowy (ang. *nucleolar organiser*, NOR) stanowi aktywny obszar jądra komórkowego posiadający zasadnicze znaczenie dla syntezy rybosomów. NOR składa się z rybosomalnego DNA (rDNA) i białek, z których niektóre są srebrochłonne. AgNOR stanowi transkrypcyjnie aktywną część NOR i miejsce syntezy rybosomalnego RNA; jest on synonimem jąderka. Wobec tego, aktywność komórkowa określana jako aktywność transkrypcyjna rDNA może być oceniana pośrednio poprzez pomiar wielkości AgNOR [78, 103, 216-218, 237]. Z drugiej strony należy podkreślić, że metoda AgNOR umożliwia także ocenę wielkości samego jądra komórkowego, która również

pozwala pośrednio wnioskować o aktywności neuronalnej [21, 101-104, 107, 108, 186, 225, 229, 236, 242, 245, 265]. Względnie prosta metoda barwienia AgNOR posiada ustalone miejsce w neuropatologii w diagnostyce guzów oraz chorób zwyrodnieniowych i naczyniowych mózgu [1, 54, 77, 95, 134, 231]. Znalazła ona także zastosowanie naukowe i praktyczne w medycynie sądowej [54, 228]. Ostatnio metoda ta została wykorzystana w badaniach nad depresją i samobójstwem [33, 109], które także mogą posiadać znaczenie dla medycyny sądowej.

3. Znaczenie zaburzeń kory przedniej części zakrętu obręczy

Wśród licznych struktur mózgu, których zaburzenia odpowiadają za powstawanie depresji, zwłaszcza obszary kory przedczołowej (ang. *prefrontal cortex*, PFC) mają posiadać krytyczne znaczenie dla tych jej objawów, które w sposób szczególnie przypisywane są człowiekowi (tendencje samobójcze, poczucie bezwartościowości, beznadziejności, winy i in.) [71, 197].

Zaburzenia czynności przedniej część zakrętu obręczy (ang. *anterior cingulate cortex*, AC), usytuowanej brzusznie (ang. *anterior cingulate cortex, ventral part*, ACv lub *subgenual AC*) i do przodu od kolana spoidła wielkiego (ang. *pregenual* lub *rostral AC*) są związane w sposób stały z patofizjologią najważniejszych zaburzeń afektywnych, jak tzw. duża depresja i zaburzenie dwubiegunowe. Według powszechnie stosowanego w badaniach naukowych systemu klasyfikacyjnego DSM IV (skrót tytułu: Diagnostyczny i Statystyczny Podręcznik Zaburzeń Psychiczych, wydanie IV; ang. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition*) schorzenia te są określane w języku angielskim odpowiednio jako: *major depressive disorder*, MDD i *bipolar disorder*, BD. Ta określona wyżej, „afektywna” część AC posiada połączenia o szczególnym znaczeniu czynnościowym z korą oczodołową, zespołem hipokampa, przednią częścią wyspy, ciałem migdałowatym, jądrem półłożącym, jądrem ogoniastym, jądrami przegrody, jądrami wzgórza (przysrodkowym grzbietowym i jądrami linii środkowej), podwzgórzem, istotą szarą okołowodociągową oraz jądrami monoaminoergicznymi i cholinergicznymi pnia mózgu [53, 81, 98]. W przeciwieństwie do neuronów położonych bardziej powierzchownie i młodszych ontogenetycznie, komórki piramidowe warstw V/VI ACv są głównym źródłem połączeń eferentnych ze strukturami podkorowymi. W związku z tym odgrywają one centralną rolę w koordynacji odpowiedzi behawioralnej powodowanej przez emocje [96, 97, 184, 191].

Część grzbietowa AC (ang. *anterior cingulate cortex, dorsal part*, ACd) jest w pierwszym rzędzie zaangażowana w ocenę znaczenia informacji emocjonalnej i motywacyjnej oraz w regulację odpowiedzi emocjonalnej. Wzajemne hamowanie części brzusznej – „afektywnej” AC przez jej część grzbietową – „kognitywną” podczas realizacji zadań poznawczych (i *vice versa*) jest często obserwowane. Tak więc osobnicy z ciężką depresją i psychicznie zdrowi osobnicy odczuwający ból wykazują w badaniach obrazowych mózgu metodą czynnościowego rezonansu magnetycznego spadek aktywności ACd [52, 53, 275].

Istnieje wiele spójnych doniesień na temat badań zarówno obrazowych jak i neurohistologicznych sugerujących, że w depresji występują zaburzenia morfologiczne w AC [45, 62, 65, 84, 89, 226, 256]. Niektóre z nich wskazują na możliwość obniżonej aktywności AC, towarzyszącej myślom negatywnym i autoagresywności u chorych z

depresją [188, 204]. Oba te objawy są najprawdopodobniej nasilone u samobójców, co może odpowiadać odchyleniom w obrębie układu serotonergicznego w AC, stwierdzanym w tej grupie *post mortem* [8, 92, 170]. Biorąc pod uwagę cytowane dane i znaczenie czynnościowe AC, podjęto badania metodą AgNOR neuronów piramidowych warstw III i V tego regionu PFC, uwzględniające podział chorych z depresją na samobójców i niesamobójców. Wyniki tych badań przedstawione w rozprawie zostały już opublikowane [108].

4. Znaczenie zaburzeń kory oczodołowo-czołowej

Oczodołowa część kory przedczołowej jest zaangażowana w ocenę znaczenia emocjonalnego różnorodnych bodźców sensorycznych oraz konsekwencji związanych z działaniami pod wpływem tych bodźców [22, 128, 200, 203, 232-235]. Kora oczodołowo-czołowa (ang. *orbitofrontal cortex*, OFC) posiada najważniejsze czynnościowo połączenia jak AC, z którą łączy ją gęsta sieć połączeń aferentnych i eferentnych [96, 97, 203, 233]. OFC przypisywana jest często rola „sensoryczna” w regulacji reakcji emocjonalnych, podczas gdy z AC wiąże się rolę „motoryczną” w tym zakresie, przekładającą się bardziej bezpośrednio na zachowania. Jednocześnie jednak podkreśla się, że te limbiczne obszary kory przedczołowej stanowią czynnościowe kontinuum, wynikające z połączeń pomiędzy nimi [22, 203, 232-234]. Podobnie jak w AC, komórki piramidowe warstw V/VI OFC w przeciwieństwie do neuronów położonych bardziej powierzchownie i młodszych ontogenetycznie są głównym źródłem połączeń eferentnych ze strukturami podkorowymi. W związku z tym odgrywają one centralną rolę w regulacji odpowiedzi behawioralnej na emocje [96, 97, 184, 191]. Ponieważ funkcja ta jest upośledzona w zaburzeniach afektywnych, OFC podobnie jak AC jest w sposób stały uwzględniana w badaniach nad patofizjologią zarówno MDD jak i BD [71, 81, 90, 122, 251]. Odnosnie obu tych zaburzeń istnieją doniesienia dotyczące badań zarówno obrazowych jak i neurohistologicznych, wskazujące na obecność nieprawidłowości morfologicznych w OFC [63, 164, 201, 227].

Podobnie jak w AC, w OFC samobójców depresyjnych stwierdzono odchylenia w zakresie komponent układu serotonergicznego [8, 92, 170]. Biorąc pod uwagę te doniesienia oraz neurotroficzną funkcję serotoniny w ośrodkowym układzie nerwowym [113, 133], w kolejnym etapie podjęto badania parametrów AgNOR w neuronach piramidowych OFC u chorych z depresją, w tym samobójców.

5. Znaczenie zaburzeń neuronów noradrenergicznych miejsca sinawego

Miejsce sinawe (ang. *locus coeruleus*, LC), leżące w górnej części mostu w dnii komory IV stanowi największe w mózgu ssaków skupienie neuronów zawierających noradrenalinę (NA) [70]. Należąc podobnie jak DRN do komponent układów aktywujących pnia mózgu, zapewnia rozległe unerwienie noradrenergiczne OUN [29]. Zgodnie z wynikami badań przedklinicznych i klinicznych, zaburzenia afektywne połączone są z odchyleniami w obrębie ośrodkowego układu noradrenergicznego, za czym przemawiają jego rozliczne funkcje regulacyjne, szczególnie uwidaczniające się w odpowiedzi stresowej i pobudzeniu OUN [6, 230]. Jednakże badaniom pośmiertnym presynaptycznej

aktywności noradrenergicznej w zaburzeniach afektywnych poświęcono tylko nieliczne prace, które wykazały, że w depresji występują odchylenia w obrębie układu LC-NA [24, 146, 281].

Depresja jest główną przyczyną samobójstw, stanowiących z kolei jedną z najczęstszych przyczyn śmierci w krajach rozwiniętych [278]. Dlatego problematyka samobójstwa jest szeroko badana w aspekcie zarówno diagnostycznym jak i neurobiologicznym, w tym w odniesieniu do układu noradrenergicznego [10, 12, 137, 160, 168, 173]. De Paermentier ze współpracownikami [75, 76] podkreślili związek poziomu autoagresywności manifestującego się w akcie samobójczym z odchyleniami obserwowanymi pośmiertnie w obrębie układu noradrenergicznego. Jak wspomniano w odniesieniu do DRN, czynnik ten najwyraźniej manifestuje się zaburzeniami układu serotonergicznego.

Jedynie nieliczne badania samobójców poświęcono hydroksylazie tyrozynowej (ang. *tyrosine hydroxylase*, TH), kluczowemu enzymowi w syntezie NA. Jednak ich wyniki nie są zgodne. W jednym z tych studiów wykazano podwyższony poziom białka TH [206], podczas gdy w innym stwierdzono zmniejszoną intensywność reakcji immunohistochemicznej na obecność TH w neuronach LC, bez jednoczesnej zmiany liczby neuronów TH-reaktywnych w porównaniu z kontrolą [31]. Późniejsze badania wskazywały także na prawidłową liczbę takich neuronów u samobójców z depresją [24].

Chociaż samobójstwo należy do kluczowych objawów depresji a udział zaburzeń układu noradrenergicznego został wykazany w obu tych zjawiskach chorobowych, w żadnym z dotychczasowych badań pośmiertnych nie analizowano zależności TH-reaktywnych neuronów LC od poziomu autoagresywności u samobójców z dobrze udokumentowanymi zaburzeniami afektywnymi. Dlatego w przedstawianych badaniach własnych m.in. poddano ocenie porównawczej tę populację neuronalną u chorych z depresją, którzy dokonali aktu samobójczego w sposób mniej i bardziej autoagresywny (ang. *non-violent i violent*).

Generalnie rzecz biorąc, badania koncentrowały się wokół dwóch zagadnień: po pierwsze ustalenia, czy depresja i/lub procesy prowadzące do samobójstwa u chorych z depresją mają związek z liczbą neuronów TH-reaktywnych w LC oraz po drugie ustalenia, czy parametr ten jest powiązany z poziomem autoagresywności u samobójców z depresją. Wpływ tego czynnika wykazano bowiem w przeprowadzonych wcześniej, stanowiących część rozprawy badaniach kariometrycznych neuronów DRN. Ponieważ nasilonej autoagresywności towarzyszą najczęściej mechaniczne uszkodzenia ciała, wymagające niejednokrotnie różnicowania ze skutkami działania ręki obcej, możliwość pośmiertnej oceny poziomu autoagresywności jest szczególnie interesująca z punktu widzenia medycyny sądowej.

6. Znaczenie zaburzeń układu GABAergicznego

Zmiany patologiczne w przekazywaniu GABAergicznym (GABA – skrót ang. *gamma-amino butyric acid*, kwas gamma-aminomasłowy) uważane są za jedną z kluczowych przyczyn powstawania zaburzeń afektywnych [49, 255]. Jednak mechanizmy molekularne mogące prowadzić bądź przyczyniać się do zaburzeń regulacji w obrębie układu GABAergicznego pozostają w dużej mierze nieznane. Dużą rolę w tym zakresie przypisuje się układom monoaminoergicznym, zwłaszcza serotonergicznemu [49, 99].

GABA jest najważniejszym hamującym przekaźnikiem ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [211]. Najnowsze odkrycia wykazały, że oprócz wielu innych funkcji, GABA ma pełnić również bardzo ważną rolę w regulacji neurogenezy, także w mózgu dorosłych [105]. GABA działa poprzez receptory typu A i B, przy czym receptor typu B jest receptorem metabotropowym, sprzężonym z białkiem G i w związku z tym różni się pod względem charakterystyki zarówno farmakologicznej jak i elektrofizjologicznej od receptora jonotropowego GABA-A [193, 149]. Znane są dowody neurobiologiczne na związek pomiędzy zachowaniem samobójczym a składem podjednostek w obrębie receptora GABA-A [60, 187].

Dekarboksylaza kwasu glutaminowego (ang. *glutamic acid decarboxylase*, GAD) jest enzymem kluczowym w syntezie GABA, odpowiedzialnym za przekształcenie glutaminianu w GABA. W mózgu człowieka dorosłego występują dwie izoformy GAD, mianowicie GAD o masie cząsteczkowej ok. 65 kDa i 67 kDa, w skrócie oznaczane jako GAD 65 i GAD 67, będące produktami dwóch niezależnie regulowanych genów, zlokalizowanych odpowiednio na chromosomie 2 i 10 [153, 246]. Obie izoformy występują w większości neuronów OUN zawierających GABA, z tym, że GAD 65 wykazuje preferencję wobec zakończeń aksonalnych, gdzie ma być powiązana z pęcherzykami synaptycznymi, podczas gdy GAD 67 jest rozprzestrzeniona w całym neuronie i ma odpowiadać za większą część syntezy GABA [246].

Szereg badań pośmiertnych nad zaburzeniami afektywnymi, w których poddano ilościowej ocenie poziom GAD w ciałach neuronów i zakończeniach GABAergicznym oraz receptorów dla GABA, sugerowało występowanie obniżonego przekazywania GABAergicznego w BD [27, 117, 125, 130, 131, 277, 279]. Znane są także badania, w których nie wykazano u chorych z BD zmian poziomu mRNA GAD w neuronach GABAergicznym [64, 194]. Dostępny jest szereg publikacji na temat pośmiertnych badań ilościowych neuronów GABAergicznym i poziomu mRNA GAD u chorych z MDD, w których nie stwierdzono znamiennych różnic [26, 64, 117, 194, 279], ponadto znane są takie badania, które wykazały obniżenie aktywności GAD i poziomu białka GAD (odpowiednio: [209] i [94]). Studium badawcze przeprowadzone przy pomocy spektroskopii protonowego rezonansu magnetycznego wykazało u nieleczonych chorych z MDD obniżenie całkowitego stężenia GABA w korze potylicznej [238, 239]. Leczenie chorych z depresją przy pomocy leków przeciwdepresyjnych powodowało wzrost całkowitego stężenia GABA w tym regionie kory [30, 238]. Zastosowanie tych leków w zwierzęcych modelach depresji przeciwdziało obniżeniu korowego poziomu GABA [213]. Z drugiej strony, ostatnio stwierdzono wzrost gęstości neuronów GAD 65/67 – immunoreaktywnych w obszarach PFC i w hipokampie chorych z zaburzeniami afektywnymi [32]. Podsumowując te momentami sprzeczne wyniki, badania pośmiertne, kliniczne i przedkliniczne przemawiają w przeważającej mierze za hipotezą, że w depresji występuje obniżenie aktywności GABAergicznej; efekt ten jednakże nie miałby być specyficzny dla grupy samobójców [49].

W przedstawianym badaniu własnym koncentrowano się na odpowiedzi na trzy pytania. Po pierwsze, czy zgodnie z poprzednimi danymi występują przesłanki do przyjęcia hipotezy na temat obniżonego przekazywania GABAergicznego u pacjentów z depresją? Po drugie, czy w badanych strukturach półkul mózgu występują różnice w gęstości neuropilu GAD-immunoreaktywnego pomiędzy depresyjnymi samobójcami i nie-samobójcami a zwłaszcza, czy występują różnice pomiędzy samobójcami i grupą kontrolną? Po trzecie, ponieważ część z chorych w badanej grupie przyjmowała leki psychotropowe, czy miało to wpływ na badaną gęstość neuropilu?

CELE PRACY

1. Zbadanie zmian morfologicznych występujących w wybranych okolicach mózgu w przebiegu depresji.
2. Określenie, czy zmiany morfologiczne mogą być pomocne w pośmiertnej diagnostyce różnicowej samobójstwa u chorych z depresją.
3. Próba oceny nasilenia zmian morfologicznych wraz z poziomem autoagresywności manifestującym się w akcie samobójczym u tych chorych.
4. Ocena, czy stosowane leki psychotropowe mogły mieć wpływ na obserwowane zmiany morfologiczne.
5. Ocena ewentualnej przydatności badań w diagnostyce pośmiertnej.

MATERIAŁY I METODYKA

1. Charakterystyka materiału badawczego

Badania zostały przeprowadzone na materiale uzyskanym z Magdeburgskiego Zbioru Mózgów (niem. *Magdeburger Hirnkollektion*), znajdującego się w dyspozycji Kliniki Psychiatrycznej Uniwersytetu w Magdeburgu. Liczebność badanych grup różniła się nieznacznie w poszczególnych rodzajach przedstawianych badań, co wynikało z warunkowań technicznych (czas przygotowywania preparatów) oraz metodycznych (dążenie do optymalnego doboru przypadków w porównywanych grupach, uwzględniającego zmienne demograficzne i kliniczne, ang. *matching*). Badane mózgi zostały pobrane pośmiertnie od łącznie 26 chorych (9 mężczyzn i 17 kobiet) z rozpoznaną przyżyciowo depresją podczas sekcji zwłok przeprowadzonych w kilku instytutach patologii i medycyny sądowej. Wiek chorych wynosił 16-69 lat. 14 z nich zginęło wskutek samobójstwa (4 mężczyzn i 10 kobiet w wieku 16-68 lat). Jego metodami były: przedawkowanie leków psychotropowych (4) i sposoby związane z bardziej nasiloną autoagresywnością (10), takie jak powieszenie (6), rana cięta przedramienia z uszkodzeniem tętnicy promieniowej (1), rana kłuta serca (1), upadek z wysokości (1) i porażenie prądem elektrycznym (1). Ta pierwsza podgrupa będzie w dalszym ciągu określana umownie jako samobójcy nieagresywni, ta druga jako agresywni. Określenia takie zostały przyjęte z uwagi na brak adekwatnych z sądowo-lekarskiego punktu widzenia, polskich odpowiedników pojęć: *non-violent suicide* i *violent suicide*, powszechnie używanych w piśmiennictwie anglojęzycznym. Zgodnie bowiem z mianownictwem polskim, wszystkie zgony spowodowane działaniem czynnika zewnętrznego określane są mianem gwałtownych. Nie jest więc prawidłowym z punktu widzenia polskiego mianownictwa medycznego używanie pojęć: samobójstwo gwałtowne i niegwałtowne. Samobójstwo było w każdym przypadku rozpoznawane przez specjalistę medycyny sądowej. Zatrucie lekami zostało potwierdzone pośmiertnym badaniem toksykologicznym. Pozostałych 12 osobników z zaburzeniami afektywnymi (5 mężczyzn i 7 kobiet w wieku 39-69 lat) zmarło z przyczyn chorobowych. Mózgi osobników kontrolnych bez zaburzeń psychicznych zostały pobrane od łącznie 11 mężczyzn i 19 kobiet w wieku od 30 do 72 lat, którzy zmarli z przyczyn chorobowych (29) lub wypadkowych (1). Czas od chwili śmierci do pobrania mózgu wynosił zarówno w przypadku chorych z zaburzeniami afektywnymi jak i w przypadku osobników kontrolnych 4-96 godzin (do momentu sekcji zwłoki były przechowywane w chłodni). Po pobraniu mózgi były utrwalane w całości przez co najmniej 2 miesiące w 8% zbuforowanej formalinie (pH = 7,0, T = 15-20 °C). Szczegółowa preparatyka mózgu w poszczególnych rodzajach badań została przedstawiona w dalszych częściach rozdziału.

Badania zostały zatwierdzone przez Komisję Etyczną Uniwersytetu w Magdeburgu jako zgodne z Deklaracją Helsińską z 1964 roku oraz obowiązującym prawem europejskim i niemieckim. Stosownie do prawa niemieckiego, każdorazowo uzyskiwano zgodę od rodziny zmarłego na przeprowadzenie sekcji zwłok, pobranie mózgu oraz wykorzystywanie dokumentacji lekarskiej do celów badawczych. Rozpoznanie kliniczne było stawiane po dokładnej analizie informacji klinicznych, sądowo-lekarskich i policyjnych oraz po uzyskaniu wywiadu od osób, które bądź mieszkały, bądź często kontaktowały się z osobą zmarłą za jej życia (tzw. autopsja psychologiczna, ang. *psychological autop-*

sy). Dwóch doświadczonych psychiatrów (prof. Bernhard Bogerts i dr Hendrik Bielau, Uniwersytet w Magdeburgu) określało, czy były spełnione kryteria diagnostyczne MDD lub BD wg DSM IV. Sprawdzali oni także, czy nie występowało dodatkowo inne zaburzenie psychiczne. Podobną procedurę stosowano także w celu wykluczenia zaburzeń psychicznych u osobników kontrolnych. Średnie dawki dobowe leków psychotropowych zostały ustalone w oparciu o dane zawarte w dokumentacji klinicznej. Dane demograficzne i kliniczne wszystkich badanych przypadków ujęte są w tabelach 1a,b i 2 na końcu tego podrozdziału.

Zasady kodowania cyfrowego w systemie klasyfikacyjnym DSM IV, zastosowanego w tabeli 1b wymagają wyjaśnienia (opracowano wg [244]). Odnośnie dużej depresji przedstawiają się one następująco:

1. Pierwsze trzy cyfry: 296.
2. Czwartą cyfrą jest 2 (dla pojedynczego epizodu dużej depresji) lub 3 (dla nawracających epizodów dużej depresji).
3. Jeśli aktualnie są całkowicie spełnione kryteria rozpoznawcze epizodu dużej depresji (szczegółowo określone w tym systemie), piąta cyfra określa obecnie występujący stopień jego ciężkości w sposób następujący: 1 – ciężki, 2 – średnio ciężki, 3 – ciężki bez objawów psychotycznych, 4 – ciężki z objawami psychotycznymi. Jeśli aktualnie kryteria te nie są całkowicie spełnione, piąta cyfra określa obecny stan kliniczny dużej depresji w sposób następujący: 5 – z częściową remisją, 6 – z całkowitą remisją. Jeśli natomiast stopień ciężkości obecnego epizodu lub obecny stan zaburzenia (tj. dużej depresji) nie jest specyficzny, piątą cyfrę stanowi 0.

Przy stawianiu diagnozy określenia powinny być uporządkowane w następujący sposób: kod dużej depresji, kod dodatkowy - określony przez czwartą cyfrę (np. nawracająca), kod dodatkowy - określony przez piątą cyfrę (np. lekka, ciężka z objawami psychotycznymi, z częściową remisją).

Wszystkie analizowane przypadki zaburzenia dwubiegunowego należały do typu I tego zaburzenia wg kryteriów DSM IV, charakteryzującego się występowaniem epizodów dużej depresji i manii (w typie II nie występują epizody manii lecz hipomanii). Zasady kodowania cyfrowego w systemie klasyfikacyjnym DSM IV odnośnie zaburzenia dwubiegunowego typu I przedstawiają się następująco:

1. Podobnie jak w przypadku dużej depresji pierwsze trzy cyfry stanowią 296.
2. Czwartą cyfrą jest 0, jeśli występuje pojedynczy epizod maniakalny. W przypadku nawracającego epizodu cyfra ta podaje rodzaj aktualnego epizodu (lub rodzaj ostatnio występującego epizodu, jeśli zaburzenie znajduje się obecnie w częściowej lub całkowitej remisji): 4 oznacza epizod hipomaniakalny lub maniakalny, 5 – epizod dużej depresji, 6 – epizod mieszany i 7 – epizod niespecyficzny.
3. Jeśli kryteria epizodu maniakalnego, mieszanego lub depresyjnego są obecnie całkowicie spełnione, stosuje się piątą cyfrę (oprócz sytuacji, gdy ostatni epizod był hipomaniakalny lub niespecyficzny) dla określenia stopnia ciężkości aktualnego epizodu w sposób następujący: 1 – lekki, 2 – średnio ciężki, 3 – ciężki bez objawów psychotycznych, 4 – ciężki z objawami psychotycznymi. Jeśli kryteria epizodu maniakalnego, mieszanego lub depresyjnego nie są aktualnie całkowicie spełnione, stosowane są oznaczenia cyfrowe dla częściowej bądź całkowitej remisji jak w przypadku dużej depresji. Jeśli natomiast stopień ciężkości lub obraz stanu klinicznego są niespecyficzne, stosuje się zawsze jako piątą cyfrę 0; tak samo postępuje się, gdy ostatni epizod był hipomaniakalny.

Przy stawianiu diagnozy określenia cyfrowe powinny być uporządkowane w następujący sposób: kod zaburzenia dwubiegunowego typu I, kod dodatkowy - określony przez czwartą cyfrę (np. ostatni epizod maniakalny), kod dodatkowy - określony przez piątą cyfrę (np. lekkie, ciężkie z objawami psychotycznymi, z częściową remisją). Jak wynika z zestawienia podanego w tabeli 1b, wszyscy chorzy z BD znajdowali się w chwili zgonu w fazie depresyjnej. Wiele danych wskazuje na podobieństwo epizodu depresyjnego w BD i MDD (przegląd w: [68]), co uzasadnia łączne uwzględnianie w przeprowadzonych badaniach chorych depresyjnych z tych dwóch najważniejszych grup zaburzeń afektywnych.

Żaden z chorych ani z osobników kontrolnych nie był uzależniony od alkoholu bądź narkotyków ani nie spełniał kryteriów aktualnego nadużywania tych substancji wg DSM IV. Jakościowe badanie neuropatologiczne przeprowadzone w każdym z przypadków przez doświadczonego neuropatologa (prof. Liselotte Gerhard, Uniwersytet w Essen lub dr hab. Christian Mawrin, Uniwersytet w Magdeburgu) nie wykazało zmian charakterystycznych dla chorób zwyrodnieniowych mózgu (takich jak choroby: Alzheimer, Parkinsona czy Picka), nowotworu, zapalenia, zmian naczyniopochodnych lub pourazowych.

Tabela 1a. Charakterystyka osobników kontrolnych.

Table 1a. Characteristics of controls.

Nr/Płeć/Wiek (lata) <i>No./Sex/Age (years)</i>	Przyczyna śmierci <i>Cause of death</i>	PMI (g) (h)
1/M/47	CF	24
2/F/52	Rak jajnika / <i>Ovarian carcinoma</i>	24
3/F/48	PE	48
4/M/47	RHF	24
5/F/64	Posocznica / <i>Sepsis</i>	24
6/F/33	CF	72
7/M/40	MI	96
8/M/64	HF	35
9/F/48	PE	26
10/F/65	HF	24
11/F/30	PE	48
12/M/56	PE	24
13/F/64	HF	26
14/M/63	HF	48
15/F/61	SCD	8
16/F/61	HF	24
17/F/38	PE	24
18/M/39	Zapalenie otrzewnej / <i>Peritonitis</i>	4
19/F/61	HF	24
20/F/67	SCD	24
21/M/54	RHF	24
22/M/46	Chłoniak / <i>Lymphoma</i>	24
23/F/63	HF	24
24/F/39	Udar cieplny / <i>Heat stroke</i>	48
25/F/66	RHF	24
26/F/39	MI	48
27/M/50	MI	72
28/F/72	Rak trzustki / <i>Pancreas carcinoma</i>	24
29/M/38	CF	19
30/F/50	Tętniak aorty / <i>Aortic aneurysm</i>	72

M – mężczyzna / *male*, F – kobieta / *female*, PMI – czas po śmierci / *postmortem interval*, CF – niewydolność wieńcowa / *coronary failure*, HF – niewydolność serca / *heart failure*, MI – zawał mięśnia serca / *myocardial infarction*, PE – zatorowość płucna / *pulmonary embolism*, RHF – niewydolność prawokomorowa / *right heart failure*, SCD – nagła śmierć sercowa / *sudden cardiac death*

Tabela 1b. Charakterystyka chorych z depresją.
Table 1b. Characteristics of depressives.

	Nr/Płeć/Wiek (lata)	Rozpoznanie psychiatryczne (DSM-IV)	Przyczyna śmierci	PMI (g) (h)
	<i>No./Sex/Age (years)</i>	<i>Psychiatric diagnosis (DSM-IV)</i>	<i>Cause of death</i>	
NS	1/F/63	MDD (296.34)	PE	17
	2/F/62	BD-D (296.54)	PE	72
	3/F/60	BD-D (296.54)	Zapalenie płuc / <i>Pneumonia</i>	14
	4/M/39	BD-D (296.53)	PE	14
	5/F/61	MDD (296.34)	SCD	70
	6/F/41	MDD (296.34)	PE	20
	7/M/39	BD-D (296.53)	CF	56
	8/M/69	BD-D (296.53)	PE	48
	9/M/69	BD-D (296.54)	Zapalenie płuc / <i>Pneumonia</i>	24
	10/F/52	BD-D (296.53)	PE	24
	11/F/65	BD-D (296.54)	HF	52
	12/M/44	BD-D (296.54)	HF	96
S	13/F/53	BD-D (296.53)	Porażenie prądem / <i>Electric shock</i>	47
	14/M/47	BD-D (296.53)	Rana kłuta serca / <i>Stab wound of heart</i>	24
	15/F/39	BD-D (296.53)	Przedawkowanie pochodnej benzodwuzepiny / <i>Benzodiazepine-class overdose</i>	48
	16/F/46	MDD (296.24)	Powieszenie / <i>Hanging</i>	48
	17/F/53	MDD (296.33)	Powieszenie / <i>Hanging</i>	46
	18/F/26	MDD (296.33)	Upadek z wysokości / <i>Fall from the height</i>	22
	19/F/46	BD-D (296.54)	Przedawkowanie pochodnej benzodwuzepiny / <i>Benzodiazepine-class overdose</i>	4
	20/M/42	BD-D (296.54)	Powieszenie / <i>Hanging</i>	17
	21/F/47	MDD (296.34)	Przedawkowanie pochodnej butyrofenonu / <i>Butyrophenone-class overdose</i>	24
	22/F/59	BD-D (296.54)	Przedawkowanie pochodnej fenotiazyny / <i>Phenothiazine-class overdose</i>	72
	23/M/35	MDD (296.33)	Rana cięta przedramienia / <i>Cut wound of forearm</i>	15
	24/M/36	MDD (296.34)	Powieszenie / <i>Hanging</i>	42
	25/F/16	BD-D (296.54)	Powieszenie / <i>Hanging</i>	48
	26/F/68	MDD (296.33)	Powieszenie / <i>Hanging</i>	96

NS – nie-samobójcy / *non-suicides*, S – samobójcy / *suicides*, M – mężczyzna / *male*, F – kobieta / *female*, PMI – czas po śmierci / *postmortem interval*, BD-D – zaburzenie dwubiegunowe, epizod depresyjny/*bipolar disorder, depressive episode*, MDD – duża depresja/*major depressive disorder*, CF – niewydolność wieńcowa/*coronary failure*, HF – niewydolność serca/ *heart failure*, PE – zatorowość płucna / *pulmonary embolism*, SCD – nagła śmierć sercowa / *sudden cardiac death*

Tabela 2. Leki psychotropowe podawane przez ostatnie 90 dni życia (średnie dawki dobowe).

Table 2. Psychotropic drugs in the last 90 days of lifetime (mean daily doses).

Chory nr	Leki przeciwdepresyjne (równoważniki amitriptyliny) <i>Antidepressants (amitriptyline equivalents)</i>	Neuroleptyki (równoważniki chlorpromazyny) <i>Neuroleptics (chlorpromazine equivalents)</i>	Benzodwuzepiny (równoważniki diaze- pamu) <i>Benzodiazepines (diazepam equivalents)</i>	Lit <i>Lithium</i>
<i>Depressive No</i>	mg	mg	mg	mg
1	50	0	0	0
2	0	110	17,6	0
3	52	109	10,9	0
4	0	280	0	0
5	30	111	16,5	0
6	17	501	0	0
7	0	221	0,8	740
8	0	0	6,8	0
9	0	0	1,6	280
10	0	0	0	0
11	93	117	3,9	0
12	0	0	0	0
13	67	0	0	0
14	20	0	0	0
15	93	0	3,1	560
16	124	109	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	133	327	3,3	558
20	95	47	18,3	565
21	47	0	0	0
22	112	140	10	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0

2. Badania kariometryczne

2.1. Preparatyka mózgu

2.1.1. Badania neuronów jądra grzbietowego szwu

Po śmierci mózgi były pobierane średnio po 34,1 godzinach od samobójców (n=12), po 37,4 godzinach od innych chorych z depresją (n=11) i po 32,4 godzinach od osobników kontrolnych (n=26). Pień mózgu wraz z mózdzkiem oddzielano poprzez cięcie prostopadłe do jego podłużnej osi w miejscu wyjścia nerwu okoruchowego. Drugie cięcie poprzeczne było dokonywane w dolnej części rdzenia przedłużonego. Po zatopieniu w parafinie, pień mózgu na całej długości był krojony seryjnie w płaszczyźnie poprzecznej na skrawki grubości 20 μm , które następnie umieszczano na szklach podstawowych. Co 50 przekrój poprzeczny pnia był odparafinowywany, uwadniany i barwiony metodą Nissla (fioletem krezyłu). Z leżących najbardziej do przodu (w śródmózgowiu na wysokości jądra nerwu błoczkowego) pierwszych trzech preparatów zawierających na przekrojach rostralną część DRN wybierano losowo jeden. Najbliższy mu przekrój pnia był barwiony metodą AgNOR. W podobny sposób wybierano przekrój poprzeczny pnia zawierający kaudalną część DRN (na wysokości rostralnej części miejsca sinawego w moście). Tak więc wybór preparatów do badań był przeprowadzany zgodnie z zasadą systematycznego, zrandomizowanego pobierania prób (ang. *systematic random sampling*), stosowanego w stereologii (zasadą tą kierowano się we wszystkich przedstawianych badaniach) [56, 118]. Następnie pobierano po jednym dodatkowym przekroju poprzecznym pnia na wysokości rostralnej i kaudalnej części DRN i barwiono metodą AgNOR. Odległość pomiędzy dwoma preparatami w części rostralnej i dwoma w części kaudalnej DRN wynosiła po 1 mm. W efekcie tej procedury otrzymywano dwa preparaty obejmujące część rostralną DRN, które zawierały jego region grzbietowy, brzuszno-boczny, brzuszny i międzypęczkowy oraz dwa preparaty obejmujące część kaudalną DRN (charakterystyka anatomiczna wg [20]). Te cztery preparaty były użyte do oceny parametrów AgNOR w każdym z badanych przypadków.

2.1.2. Badania neuronów piramidowych warstw III i V kory przedniej części zakrętu obręczy

Po śmierci mózgi były pobierane średnio po 33,8 godzinach od samobójców (n=10), po 38,7 godzinach od innych chorych z depresją (n=10) i po 34,1 godzinach od osobników kontrolnych (n=24). Po oddzieleniu pnia mózgu z mózdzkiem i zatopieniu w parafinie, półkule mózgu na całej długości były krojone seryjnie w płaszczyźnie czołowej na skrawki grubości 20 μm , które następnie umieszczano na szklach podstawowych. Co 50 skrawek był odparafinowywany, uwadniany w szeregu alkoholi i barwiony metodą Nissla.

Do badania pobierano skrawki z poziomu lokalizacji AC, określonego wg [165]. Obszar badany w ACv odpowiadał jej przedniej części, określonej wg [62]. Z preparatów barwionych metodą Nissla wybierano w sposób zrandomizowany dwa i przekroje

bezpośrednio do nich przylegające były barwione metodą AgNOR. Tak więc w każdym z badanych przypadków wykorzystywano do badania parametrów AgNOR po dwa preparaty przekrojów czołowych półkul mózgu, wybierane losowo na poziomie AC.

2.1.3. Badania neuronów piramidowych warstw III i V kory oczodołowo-czołowej

Po śmierci mózgi były pobierane średnio po 33,8 godzinach od samobójców (n=9), po 38,7 godzinach od innych chorych z depresją (n=10) i po 34,1 godzinach od osobników kontrolnych (n=24). Po zatopieniu półkul mózgu w parafinie, dalsza preparatyka była identyczna jak w odniesieniu do AC.

Do badania pobierano preparaty z poziomu lokalizacji OFC, na którym były także widoczne obie części AC (przednie części zakrętów: obręczy i podspoidłowego wg [165], tj. grzbietowa i brzuszna część AC). Stosownie do podziału zaproponowanego przez cytowanych autorów, następujące komponenty OFC były widoczne na tym poziomie idąc od przyśrodkowej do bocznej części półkuli: zakręt prosty, zakręt oczodołowy przyśrodkowy, zakręt oczodołowy tylny i część oczodołowa zakrętu czołowego dolnego. Z preparatów tych wybierano w sposób zrandomizowany dwa i przekroje bezpośrednio do nich przylegające były barwione metodą AgNOR. Tak więc w każdym z badanych przypadków wykorzystywano do badania parametrów AgNOR po dwa preparaty przekrojów czołowych półkul mózgu, wybierane losowo na określonym wyżej poziomie OFC.

2.2. Barwienie metodą AgNOR

Barwienie metodą AgNOR było przeprowadzane w sposób powszechnie stosowany [1, 231]. Skrawki obejmujące całe przekroje poprzeczne mózgu grubości 20 μm na odpowiednich poziomach uzyskiwane w sposób opisany były odparafinowywane i przeprowadzane przez szereg alkoholowy w celu ponownego uwodnienia. Roztwór do wysrebrzenia był świeżo przygotowywany przez rozpuszczanie roztworu żelatyny o stężeniu 2g/100ml w wodnym roztworze azotanu srebra o stężeniu 1 ml/100ml w proporcji 1:2. Skrawki pokryte tym roztworem były inkubowane w cieplarni w temperaturze pokojowej przez 45 minut, a następnie splukiwane wodą destylowaną. W następstwie tej procedury, elementy AgNOR uwidoczniały się jako zlokalizowane wewnątrzjądrowo ciemne, wyraźnie odgraniczone plamki i granica jądra komórkowego była również wyraźnie widoczna (ryc. 1, 2 i 3 na końcu podrozdziału poświęconego metodyce badań kariometrycznych).

2.3. Badania ilościowe

2.3.1. Badania neuronów jądra grzbietowego szwu

Granice anatomiczne regionów DRN (ang. *DRN subnuclei*) zostały określone w sposób podany przez Baker i współpracowników [20]. W każdym z tych regionów, parametry AgNOR były mierzone w 40 wybranych w sposób zrandomizowany neuronach (20 w każdym z dwóch preparatów). Tak więc w każdym z analizowanych przypadków mierzono parametry AgNOR w 200 neuronach DRN. Ponieważ DRN jest rozpatrywane jako jedna struktura anatomiczna [20], liczba badanych neuronów odpowiadała przyjętej w badaniach stereologicznych dla pojedynczej struktury [118]. Neurony były wyszukiwane przy pomocy obiektywu immersyjnego o powiększeniu $\times 100$ i ramki stereologicznej. W barwieniu opisaną metodą, komórki glejowe były odróżniane od neuronów na podstawie wyraźnie widocznych różnic w budowie: mniejszej wielkości, braku cytoplazmy i ciemniejszej błony jądrowej. Przy zastosowanym powiększeniu, cechy morfologiczne neuronów DRN widoczne w barwieniu metodą AgNOR nie pozwalają na pomylenie ich z innym typem komórek (ryc. 1).

Oznaczano liczbę i całkowite pole powierzchni przekroju elementów AgNOR oraz pole przekroju jądra komórkowego w każdym z poddawanych analizie neuronów posługując się mikroskopem świetlnym, wyposażonym w system cyfrowej analizy obrazu ze stosownym oprogramowaniem morfometrycznym (Digitrace®, Imatec, Germany) oraz w urządzenie umożliwiające kontrolowaną zmianę wysokości stolika (tzw. mikrokator). W systemie tym, każdy z badanych neuronów był poddawany wizualizacji cyfrowej i ogniskowany, po czym najwyraźniejsze i najdłuższe obwody przekrojów poprzecznych jądra i elementów AgNOR były obrysowywane kursorem na ekranie monitora. Wartość powierzchni badanych przekrojów (nazywanych dalej w skrócie powierzchnią AgNOR i powierzchnią jądra) oraz liczba elementów AgNOR (nazywanych dalej w skrócie liczbą AgNOR) były oznaczane automatycznie. Tzw. wskaźnik AgNOR (ang. *AgNOR ratio*), określane także jako względna powierzchnia AgNOR (ang. *relative AgNOR area*) był otrzymywany jako iloraz powierzchni AgNOR i powierzchni jądra, przy czym uwzględniano wszystkie elementy AgNOR uwidaczniające się w obrębie jednego jądra komórkowego, w liczeniu których stosowano metodę dysektora optycznego. Procedura była przeprowadzana odrębnie dla każdego z badanych neuronów. Współczynniki korelacji (wewnątrzklasowej i Pearsona) dla par pomiarów powtórzonych były zbliżone do 1, co odpowiadało wymaganej niezawodności (ang. *reliability*) metody pomiarowej.

Zarówno w odniesieniu do badań DRN jak też innych badań przedstawianych w prezentowanej pracy, nie tyle była istotna ocena bezwzględnych wartości parametrów neurohistologicznych, jak ocena różnic w ich zakresie występujących pomiędzy porównywanymi grupami. Stosując przedstawiane metody pomiarowe autor miał świadomość, że każda metoda morfometryczna prowadzi do uzyskania przybliżonych wartości oznaczanych parametrów [61, 79, 118, 271].

2.3.2. *Badania neuronów piramidowych warstw III i V kory przedniej części zakrętu obręczy i oczodołowo-czołowej*

W warstwach III i V określonych w sposób opisany regionów ACv i ACd oraz zakrętu oczodołowego przyśrodkowego dokonywano pomiarów parametrów AgNOR w 160 wybranych w sposób zrandomizowany neuronach (po 80 w każdym z preparatów). Liczba badanych neuronów była zgodna z wytycznymi ustalonymi dla oceny morfometrycznej pojedynczej struktury anatomicznej [118]. Neurony były wyszukiwane przy pomocy obiektywu immersyjnego o powiększeniu $\times 100$ i ramki stereologicznej. Cechy morfologiczne neuronów piramidowych widoczne w barwieniu metodą AgNOR pozwalały na jednoznaczne odróżnienie ich od innych typów komórek (ryc. 2 i 3). Współczynniki korelacji (wewnątrzklasowej i Pearsona) dla par pomiarów powtarzanych były zbliżone do 1, co odpowiadało wymaganej niezawodności metody pomiarowej.

2.4. *Analiza statystyczna wyników*

2.4.1. *Analiza wyników badań neuronów jądra grzbietowego szwu*

Stosowano trzy odrębne procedury. Po pierwsze, przeprowadzano porównania przy pomocy niesparowanego testu t w celu wykrycia różnic w wartości parametrów AgNOR pomiędzy dwiema grupami (depresyjni / kontrolni). Po drugie, przeprowadzano jednoczynnikową analizę wariancji (ang. *univariate analysis of variance*, ANOVA), w której przyjmowano grupę diagnostyczną jako trójstopniową zmienną niezależną (samobójcy / nie-samobójcy / kontrolni) i parametry AgNOR jako zmienne zależne; w przypadku uzyskania znamiennej wartości P dla porównania pomiędzy trzema grupami stosowano następnie porównania pomiędzy dwiema grupami przy pomocy niesparowanego testu t . Po trzecie, przeprowadzano porównania przy pomocy testu Kruskal-Wallis (test KW, nieparametryczna wersja testu ANOVA), przyjmując grupę diagnostyczną (uwzględniającą stopień nasilenia autoagresywności w samobójstwie) jako czterostopniową zmienną niezależną (samobójcy agresywni / samobójcy nieagresywni / nie-samobójcy / kontrolni) i parametry AgNOR jako zmienne zależne. W przypadku uzyskania znamiennej wartości P dla porównania pomiędzy czterema grupami stosowano następnie porównania pomiędzy dwiema grupami przy pomocy nieadjustowanego testu U Mann-Whitney. Stosowanie procedur nieparametrycznych wynikało z braku rozkładu normalnego w porównywanych czterech grupach.

Ten sam sposób postępowania był stosowany w celu wykrycia różnic pomiędzy porównywanymi grupami odnośnie płci, wieku, masy mózgu, czasu po śmierci, czasu utrwalania mózgu, współczynnika obkurczania mózgu pod wpływem zatapiania w parafinie, pory roku (wiosna-lato/jesień-zima). Czas trwania i biegunowość zaburzenia afektywnego jak również farmakoterapia psychiatryczna (średnie dobowe dawki leków) były porównywane pomiędzy samobójczą i nie-samobójczą grupą chorych z depresją przy pomocy niesparowanego testu t .

Współczynniki korelacji Pearsona były obliczane w celu określenia wpływu podanych zmiennych demograficznych, klinicznych i metodycznych, które mogły zaburzać wyniki testowania statystycznego zmiennych zależnych.

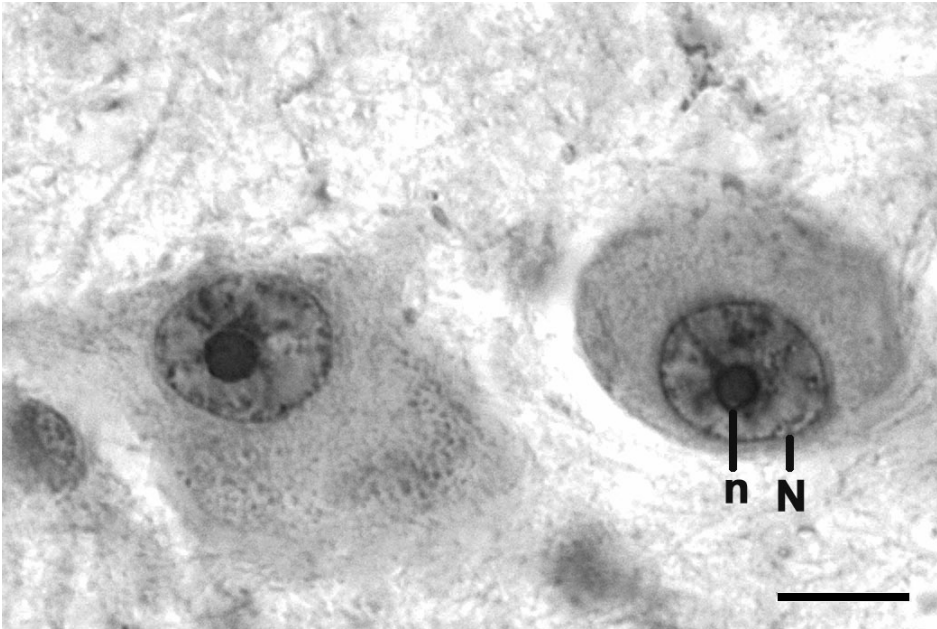
Jako statystycznie znamienne przyjmowano ogólnie wartości poziomu istotności (P) $<0,05$. Jednakże w sytuacjach, gdy stosowano połączenie ANOVA i wielokrotnych testów t lub połączenie testu KW i wielokrotnych testów U , wartości P były korygowane dla porównań wielokrotnych metodą Bonferroni-Holm-Shaffer. Zasady te dotyczyły analizy statystycznej wszystkich wyników przedstawianych w rozprawie.

Wszystkie elementy analizy statystycznej zarówno w tej jak i w pozostałych częściach rozprawy wykonywano przy pomocy pakietu statystycznego „SPSS 12 for Windows”.

2.4.2. Analiza wyników badań neuronów piramidowych warstw III i V kory przedniej części zakrętu obręczy oraz oczodołowo-czołowej

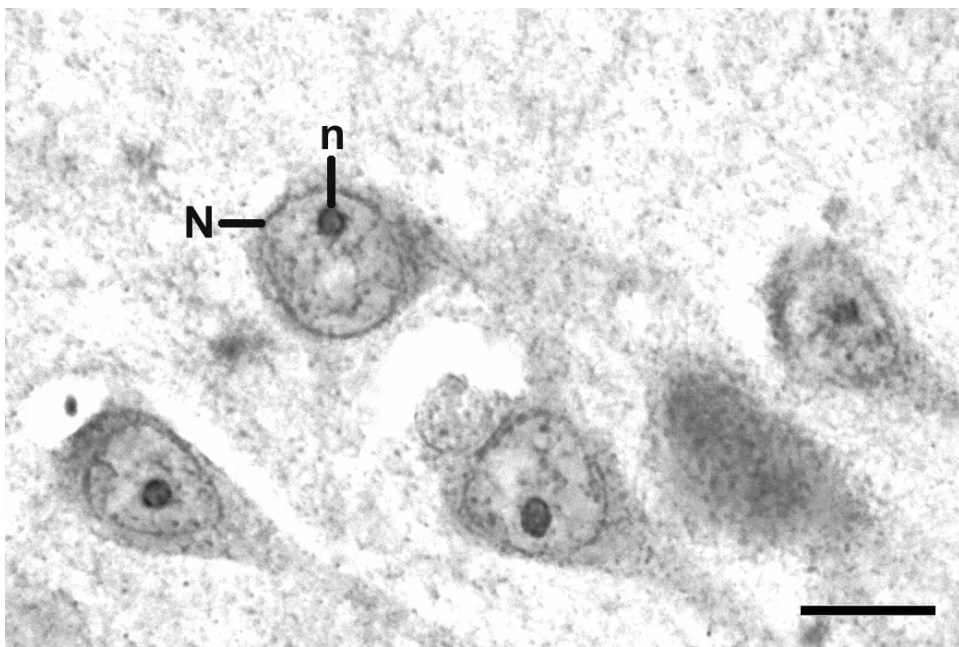
Na wstępie przeprowadzono wieloczynnikową analizę wariancji (ang. *multivariate analysis of variance*, MANOVA) przyjmując grupę diagnostyczną oraz region, stronę i warstwę w przypadku AC lub grupę diagnostyczną oraz stronę i warstwę w przypadku OFC jako zmienne niezależne a parametry AgNOR jako zmienne zależne. Następnie stosowano trzy odrębne procedury. Dwie pierwsze odpowiadały procedurom parametrycznym, podanym w odniesieniu do DRN. Trzecią stanowiły porównania przy pomocy testu Wilcoxon dla par w celu wykrycia wewnątrzgrupowych różnic pomiędzy wartościami parametrów AgNOR w badanych okolicach PFC, właściwych dla strony i regionu w przypadku AC bądź dla strony w przypadku OFC.

Druga procedura (tzn. ANOVA połączona z testami *t post hoc*) była stosowana także w celu wykrycia różnic pomiędzy porównywanymi grupami odnośnie płci, wieku, masy mózgu, czasu po śmierci, czasu utrwalania mózgu i współczynnika obkurczania mózgu. Czas trwania i biegunowość zaburzenia afektywnego jak również farmakoterapia psychiatryczna (średnie dobowe dawki leków) były porównywane pomiędzy samobójczą i nie-samobójczą grupą chorych z depresją w taki sam sposób jak w przypadku DRN. Tak samo przeprowadzono również analizę korelacji.



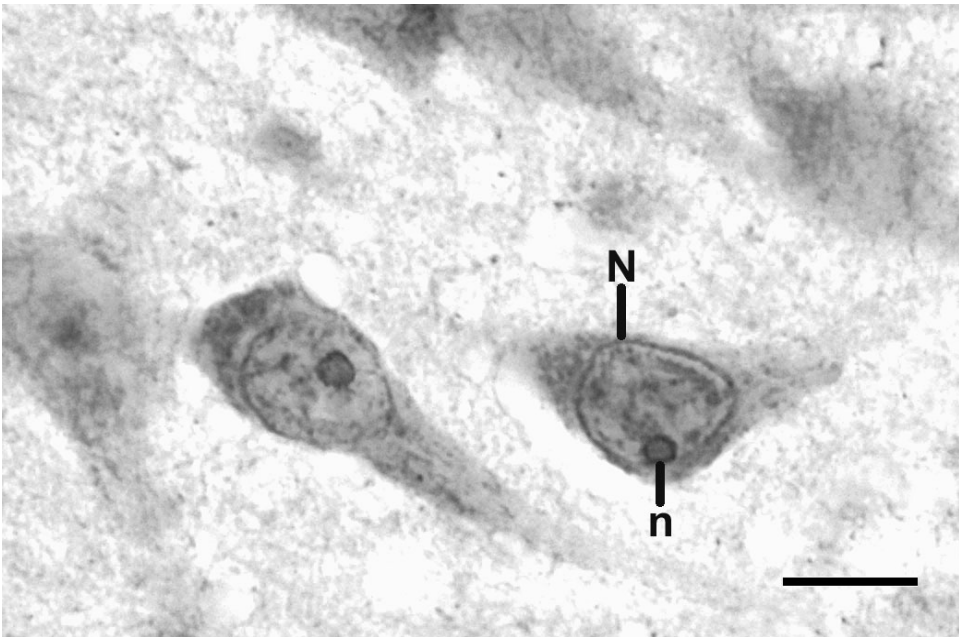
Ryc. 1. Po przeprowadzeniu barwienia metodą AgNOR, granice obszaru AgNOR (równoznacznego z jąderkiem) (n) i jądra (N) były wyraźnie widoczne w obrębie neuronów DRN (pasek kalibracyjny 10 μm).

Fig. 1. After silver staining by means of the AgNOR method, the borders of AgNOR (synonymous with nucleolus) (n) and the nucleus (N) were clearly visible within the DRN neurons (scale bar 10 μm).



Ryc. 2. Po przeprowadzeniu barwienia metodą AgNOR, granice obszaru AgNOR (równoznaczne-go z jąderkiem) (n) i jądra (N) były wyraźnie widoczne w obrębie neuronów piramidowych przedniej części zakrętu obręczy (pasek kalibracyjny 10 μm).

Fig. 2. After silver staining by means of the AgNOR method, nuclear (N) and AgNOR (synonymous with nucleolar) (n) borders were clearly visible within anterior cingulate pyramidal neurons (scale bar 10 μm).



Ryc. 3. Po przeprowadzeniu barwienia metodą AgNOR, granice obszaru AgNOR (równoznacznego z jąderkiem) (n) i jądra (N) były wyraźnie widoczne w obrębie neuronów piramidowych kory oczodołowo-czołowej (pasek kalibracyjny 10 μm).

Fig. 3. After silver staining by means of the AgNOR method, the borders of AgNOR (synonymous with nucleolus) (n) and the nucleus (N) were clearly visible within orbitofrontal pyramidal neurons (scale bar 10 μm).

3. Badania liczby neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym mostu

3.1. Preparatyka mózgu

Po śmierci mózgi były pobierane średnio po 32,9 godzinach od samobójców (n=11), po 37,4 godzinach od innych chorych z depresją (n=11) i po 33,3 godzinach od osobników kontrolnych (n=21). Wstępna preparatyka mózgu była taka sama jak w odniesieniu do DRN. Z leżących najbardziej do przodu, pierwszych trzech preparatów barwionych metodą Nissla zawierających na przekrojach LC wybierano losowo jeden. Sąsiadujący z nim bezpośrednio przekrój pnia mózgu był pierwszym z preparatów barwionych immunohistochemicznie na hydroksylazę tyrozynową (TH). Tak więc wybór preparatów do badań był dokonywany w sposób zrandomizowany. Odległość zarówno pomiędzy preparatami barwionymi metodą Nissla jak również pomiędzy preparatami barwionymi na TH wynosiła po 1 mm. Na każde z badanych LC przypadało średnio 12 preparatów barwionych immunohistochemicznie na TH.

3.2. Procedura immunohistochemiczna

Skrawki obejmujące całe przekroje pnia mózgu grubości 20 μm , uzyskiwane w sposób opisany, były odparafinowywane i przeprowadzane przez szereg alkoholowy w celu ponownego uwodnienia. Neuromelanina w neuronach LC była wybielana przez 48 godzin przy pomocy H_2O_2 . Po preinkubacji skrawków z 1,5% roztworem H_2O_2 w PBS (phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) w celu inaktywacji endogennych peroksydaz a następnie z normalną surowicą kozią (producent j.w., rozcieńczenie 1:10 w PBS) w celu blokowania wiązania niespecyficznego przeciwciała pierwotnego, stosowano poliklonalne przeciwciało królicze anti-TH (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Niemcy). Używano je w rozcieńczeniu 1:1000, inkubując preparaty przez 48 godzin w temperaturze $+4^\circ\text{C}$ po preadsorpcji przeciwciała z naturalną melaniną (*Sepia officinalis*, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 0,1mg/ml przez 60 minut) w celu usunięcia reaktywności krzyżowej z neuromelaniną. Protokół immunohistochemiczny w dalszej części obejmował inkubację przez 2 godziny z wtórnym, biotynylowanym przeciwciałem kozim przeciwko króliczemu (DAKO, Wiesenheim, Niemcy) w celu zastosowania systemu detekcyjnego awidyna-biotyna (Amersham Biosciences UK, Ltd., Little Chalford, Anglia). Produkt reakcji uwidaczniano stosując DAB (tetrahydrochloride 3,3'-diaminobenzidine, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). W celu kontroli przeciwciała pierwotne było zastępowane przez PBS lub normalną surowicę kozią. Preparaty pozbawione przeciwciała anti-TH nie wykazywały jakiegokolwiek reakcji barwnej. Dodatkowa kontrola swoistości reakcji polegała na jej zniesieniu po preadsorpcji przeciwciała anti-TH z odwirowanym homogenatem ludzkiego nadnercza bogatego w TH. Ponadto w celu kontroli zastosowano dwa dalsze przeciwciała anti-TH (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; Camon, Wiesbaden, Niemcy), uzyskując podobny obraz barwienia neuronów LC jak w przypadku przeciwciała użytego do badań. Zastosowana metoda pozwalała na uzyskanie dobrego obrazu neuronów TH-immunoreaktywnych (TH-ir) (ryc. 4 na końcu tej części rozdziału).

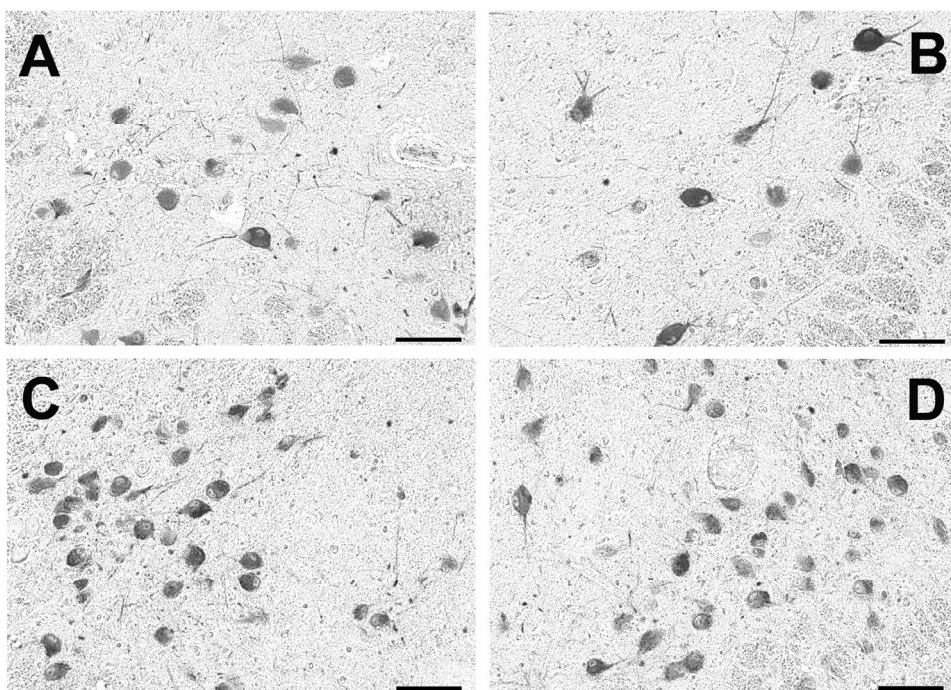
3.3. *Badania ilościowe*

Neurony TH-ir w LC były liczone w każdym z przypadków w sposób zautomatyzowany przy pomocy wyposażonego w kamerę video systemu komputerowego (Digitrace[®], Imatec, Niemcy), połączonego z wyposażonym w stolik motorowy mikroskopem LEICA, przy użyciu obiektywu $\times 10$. W systemie tym uzyskiwano w pierwszym etapie dla każdego preparatu szczegółowe obrazy cyfrowe LC (obustronnie po 9), na których przekroje neuronów TH-ir były oznakowane kolorem. Oznakowanie neuronów korygowano wzrokowo w celu uniknięcia artefaktów. Obrazy szczegółowe były integrowane w jeden obraz panoramiczny przekroju poprzecznego LC, dostosowany do wielkości monitora. Liczba oznakowanych neuronów była obliczana automatycznie przez program komputerowy. Przy znanej odległości pomiędzy preparatami (1mm), liczbę neuronów TH-ir w LC (dla każdej strony i całkowitą) otrzymywano na drodze całkowania liczb neuronów otrzymanych w każdym z badanych przekrojów poprzecznych. Przeprowadzone ostatnio przez Craven i współpracowników [66] badania neuronów TH-ir w LC schizofreników wykazały, że przy podobnym powiększeniu liczba przekrojów neuronów odzwierciedlała w miarodajny sposób liczbę neuronów i nie wymagała korekty uwzględniającej ich wielkość. Współczynniki korelacji (wewnątrzklasowej i Pearsona) dla par pomiarów powtórzonych były wyższe niż 0,9, co odpowiadało wymaganej niezawodności metody pomiarowej.

3.4. *Analiza statystyczna wyników*

Ponieważ nie wszystkie porównywane grupy wykazywały rozkład normalny wyników, stosowano trzy odrębne procedury nieparametryczne. Po pierwsze, przeprowadzono porównania przy pomocy nieadjustowanego testu U Mann-Whitney (testu U) w celu wykrycia różnic w liczbie neuronów TH-reaktywnych pomiędzy dwiema grupami (depresyjni / kontrolni). Po drugie, przeprowadzono porównania przy pomocy testu Kruskal-Wallis (test KW, nieparametryczna wersja testu ANOVA), przyjmując grupę diagnostyczną jako zmienną niezależną trójstopniową (samobójcy / nie-samobójcy / kontrolni oraz samobójcy agresywni / samobójcy nieagresywni / kontrolni) lub czterostopniową (samobójcy agresywni / samobójcy nieagresywni / nie-samobójcy / kontrolni) i liczbę neuronów TH-reaktywnych jako zmienną zależną. W przypadku uzyskania znamiennych wartości *P* dla testów KW stosowano następnie porównania pomiędzy dwiema grupami przy pomocy nieadjustowanego testu U.

Ten sam sposób postępowania był stosowany w celu wykrycia różnic pomiędzy porównywanymi grupami odnośnie płci, wieku, masy mózgu, czasu po śmierci, czasu utrwalania mózgu, współczynnika obkurczania mózgu, statusu palenia tytoniu, czynników stresujących i czasu trwania agonii. Czas trwania i biegunowość zaburzenia afektywnego jak również farmakoterapia psychiatryczna (średnie dobowe dawki leków) były porównywane pomiędzy samobójczą i nie-samobójczą grupą chorych z depresją oraz pomiędzy samobójcami agresywnymi i nieagresywnymi przy pomocy testu U. Współczynniki korelacji Spearmana były obliczane w celu określenia wpływu podanych zmiennych demograficznych, klinicznych i metodycznych, które mogły zaburzać wyniki testowania statystycznego zmiennej zależnej.



Ryc. 4. TH-immunoreaktywne neurony w miejscu sinawym osobnika kontrolnego (A – strona prawa, B – strona lewa) w porównaniu z samobójcą z depresją, wykazującym wyższy poziom autoagresywności (przypadek powieszenia) (C – strona prawa, D – strona lewa); paski kalibracyjne 100 μ m.

Fig. 4. TH-immunoreactive neurons in the LC of control subject (A – right side, B – left side) compared with violent suicidal depressive patient (the case of hanging) (C – right side, B – left side); scale bars 100 μ m.

4. *Badania gęstości neuropilu GABAergicznego w regionach kory przedczołowej i w wybranych strukturach limbicznych płata skroniowego*

4.1. *Preparatyka mózgu*

Po śmierci mózgi były pobierane średnio po 43,4 godzinach od samobójców (n=14), po 56,3 godzinach od innych chorych z depresją (n=7) i po 50,5 godzinach od osobników kontrolnych (n=18). W taki sam sposób jak w odniesieniu do badań AC i OFC metodą AgNOR, wstępna preparatyka polegała na zatapianiu półkul mózgu w parafinie i uzyskiwaniu skrawków o grubości 20 μm obejmujących przekroje poprzeczne na całej długości półkul; skrawki te umieszczano na szklach podstawowych. Do barwienia immunohistemicznego na GAD wybierano w sposób zrandomizowany po dwa takie preparaty na wysokości kory przedniej części zakrętu obręczy, leżącej do przodu od kolana spoidła wielkiego oraz na wysokości stopy hipokampa (łącznie 4 preparaty w każdym przypadku).

4.2. *Procedura immunohistochemiczna*

Podane preparaty były odparafinowywane i przeprowadzane przez szereg alkoholowy w celu ponownego uwodnienia. Do lokalizacji GAD wykorzystywano mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko GAD 65 i 67 (Medical & Biological Laboratories Co., Woburn, USA). Po preinkubacji skrawków z 1,5% roztworem H_2O_2 w PBS (phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) w celu inaktywacji endogennych peroksydaz a następnie z normalną surowicą kozią (producent j.w., rozcieńczenie 1:10 w PBS) w celu blokowania wiązania niespecyficznego przeciwciała pierwotnego, stosowano w rozcieńczeniu 1:1000 wymienione przeciwciała mysie anty-GAD. Preparaty inkubowano najpierw przez 48 godzin w temperaturze $+4^\circ\text{C}$ z przeciwciałem pierwotnym a następnie przez 2 godziny z wtórnym, biotynylowanym, kozim przeciwciałem anty-mysim (Amersham Biosciences UK, Ltd., Little Chalford, Anglia) w celu zastosowania systemu detekcyjnego awidyna-biotyna (Amersham). Produkt reakcji uwidaczniano stosując DAB (tetrahydrochloride 3,3'-diaminobenzidine, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) i sześciowodzian siarczanu amonowo-niklowego. W celu kontroli pierwotne przeciwciała było zastępowane przez PBS lub normalną surowicę kozią. Preparaty pozbawione przeciwciała anty-GAD nie wykazywały jakiegokolwiek reakcji barwnej. Zastosowana metoda pozwalała na uzyskanie dobrego obrazu struktur GAD-immunoreaktywnych (GAD-ir) (ryc. 5 na końcu tej części rozdziału).

4.3. *Badania ilościowe*

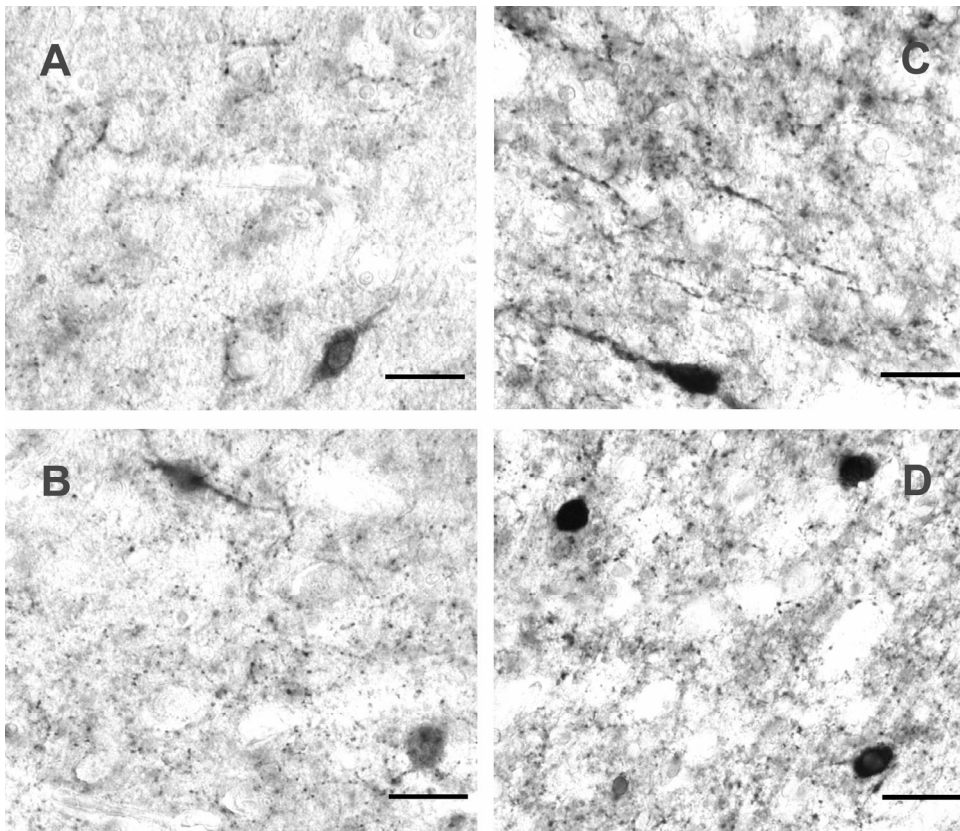
Gęstość neuropilu GAD-ir (włókna i/lub zakończenia synaptyczne) u chorych z depresją i osobników kontrolnych była mierzona w obszarach kory nowej: w PFC (w jej części grzbietowo-bocznej, DLC, w OFC i w przedspoidłowym fragmencie AC) i w korze śródwęchowej (EC), ponadto w korze starej (w zakręcie zębatym, DG i w polu CA1 hipokampa, CA1) oraz w jądrach wzgórza (przyśrodkowym grzbietowym, MD i

bocznym grzbietowym, LD). W każdym z badanych regionów kory nowej wybierano w sposób przypadkowy trzy prostokątne pola pomiarowe w warstwie III i trzy w warstwie V. Pola te skanowano obustronnie do komputera przy pomocy mikroskopu Olympus BX60 wyposażonego w kamerę cyfrową ColorView Soft Imaging System, używając obiektywu $\times 20$. W strukturach zespołu hipokampa ta sama procedura była przeprowadzana w warstwie piramidowej CA1 i w warstwie ziarnistej DG. W LD i MD skanowano obustronnie po trzy pola wybrane w sposób przypadkowy. Liczba pól wybieranych do oceny morfometrycznej została ustalona po analizie statystycznej wstępnych danych, obejmujących wyniki pomiarów dokonywanych dla danej struktury obustronnie w 10 polach.

Powierzchnia względna neuropilu GAD-ir w wymienionych regionach została określona przy pomocy analizy densytometrycznej obrazu, przeprowadzonej w oparciu o komputerowy program morfometryczny AnalySIS[®]. W celu pomiaru powierzchni neuropilu GAD-ir dokonywano pod kontrolą wzroku wizualizacji zabarwionych precypitów przez odniesienie poziomu reakcji barwnej do minimalnego i maksymalnego poziomu szarości w obrazie cyfrowym pola pomiarowego. Powierzchnia oznakowanych struktur immunoreaktywnych była w sposób automatyczny mierzona i dzielona przez całkowitą powierzchnię pola pomiarowego, tak więc otrzymany iloraz wskazywał na względną powierzchnię tych struktur. Celem przeprowadzonych pomiarów nie było otrzymanie bezwzględnych wartości powierzchni zabarwionego neuropilu, lecz wykrycie różnic w intensywności unerwienia GABAergicznego pomiędzy porównywanymi grupami, tak jak zostało to uprzednio dokonane w modelu zwierzęcym w odniesieniu do unerwienia monoaminoergicznego [110]. Współczynniki korelacji (wewnątrzklasowej i Pearsona) dla par pomiarów powtórzonych wynosiły 0,9-1, co odpowiadało wymaganej niezawodności metody pomiarowej.

4.4. Analiza statystyczna wyników

Ponieważ analizowane grupy nie wykazywały rozkładu normalnego wyników we wszystkich badanych regionach, stosowano testy nieparametryczne. Metoda statystyczna była więc podobna do opisanej uprzednio w odniesieniu do analizy liczby neuronów TH-immunoreaktywnych w LC.



Ryc. 5. Immunoreaktywność GAD 65/67 w warstwie III (A) i V (B) kory śródwęchowej prawej osobnika kontrolnego w porównaniu z odpowiednimi regionami (C i D) samobójcy z depresją; paski kalibracyjne 50 μm .

Fig. 5. GAD 65/67 immunoreactivity in the right entorhinal cortex layer III (A) and V (B) of control case compared with corresponding layers of suicidal depressive patient (C and D, respectively); scale bars 50 μm .

WYNIKI

1. Badania kariometryczne neuronów jądra grzbietowego szwu

Analiza statystyczna wykazała znamienne różnice tylko przy sumarycznej analizie wszystkich pięciu regionów DRN (tj. obejmującej wszystkie neurony DRN z danego przypadku). Różnice te były nieuchwytnie w ocenie jakościowej i mogły być stwierdzone jedynie na drodze ilościowych badań morfometrycznych. ANOVA wykazała znamienne wpływy samobójstwa jako pojedynczego czynnika na średnią powierzchnię jądra komórkowego ($P=0,032$). Parametr ten był znamienne niższy u samobójców w porównaniu z grupą kontrolną. Choć bezwzględne wartości powierzchni i liczby AgNOR nie wykazywały znamienych różnic pomiędzy tymi grupami, ich średnie wartości były niższe u samobójców. W związku z tym, znamienne wyższy wskaźnik AgNOR u samobójców w porównaniu z kontrolą był spowodowany zmniejszeniem powierzchni jądra komórkowego bardziej nasilonym niż zmniejszenie powierzchni AgNOR (tabela 3; tabele ujmujące wyniki znajdują się na końcu podrozdziałów). Co charakterystyczne, nie stwierdzono znamiennej różnicy pomiędzy nie-samobójcami i kontrolą jak również pomiędzy wszystkimi osobnikami z depresją i kontrolnymi w odniesieniu do jakiegokolwiek parametru AgNOR. Pomiedzy agresywnymi i nieagresywnymi samobójcami, nie-samobójcami i osobnikami kontrolnymi wykazano przy pomocy testu KW znamienne statystycznie różnice w powierzchni jądra i powierzchni AgNOR (odpowiednie wartości $P= 0,002$ i $0,037$). Podgrupa samobójców agresywnych wykazywała w porównaniu z nie-samobójcami i grupą kontrolną o wiele bardziej nasilone zmiany parametrów AgNOR niż wszyscy samobójcy (tabela 4).

1.1. Zmienne wklajające

Wiek w chwili śmierci był znamienne niższy u samobójców w porównaniu z nie-samobójcami (odpowiednio: $44,1 \pm 9,1$ i $56,4 \pm 11,7$ lat, $P=0,01$) i u samobójców w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio: $44,1 \pm 9,1$ i $52,1 \pm 11,6$ lat, $P=0,04$). Średnia dawka leków przeciwdepresyjnych przyjmowanych w ciągu ostatnich 7 dni przed śmiercią była znamienne wyższa u samobójców w porównaniu z nie-samobójcami ($125,7 \pm 82,0$ i $48,9 \pm 53,0$ mg równoważników amitryptyliny, $P=0,031$). Inne analizowane zmienne wklajające, takie jak czas po śmierci, czas utrwalania mózgu i współczynnik jego obkurczenia, płeć, masa mózgu, pora roku w chwili śmierci, czas trwania i biegunowość zaburzenia afektywnego oraz wiek w momencie jego rozpoznania nie różniły się znamienne pomiędzy porównywanymi grupami.

Wszyscy samobójcy z depresją wykazywali umiarkowaną korelację pomiędzy powierzchnią jądra komórkowego uzyskaną w sumarycznej analizie DRN a średnią dawką dobową leków przeciwdepresyjnych i litu, przyjmowanych przez ostatnie 90 dni przed śmiercią (odpowiednio: $r=0,63$ i $P=0,038$ dla leków przeciwdepresyjnych oraz $r=0,642$ i $P=0,033$ dla litu). W grupie tej występowała ponadto silna korelacja pomiędzy powierzchnią AgNOR a średnią dawką dzienną benzodwiazepin przyjmowanych w ciągu ostatnich 28 dni przed śmiercią ($r=0,845$, $P=0,001$). W grupie nie-samobójców występowała umiarkowana korelacja pomiędzy liczbą AgNOR a średnią dawką leków prze-

ciwdesyjnych przyjmowanych w ciągu ostatnich 90 dni przed śmiercią ($r=0,606$, $P=0,048$). Inne analizowane zmienne wykłające nie korelowały z wartościami parametrów AgNOR w neuronach DRN.

Tabela 3. Porównanie pomiędzy parametrami AgNOR uzyskanymi w sumarycznej analizie wszystkich regionów DRN samobójców, nie-samobójców i osobników kontrolnych.

Table 3. AgNOR parameters in the global analysis of all DRN subregions in all suicides versus non-suicides and controls.

Parametr <i>Parameter</i>	K (n=26)	S (n=12)	NS (n=11)	Skorygowane wartości <i>P</i> <i>Corrected P values</i>		
	Średnia ±SD <i>Mean±SD</i>	Średnia ±SD <i>Mean±SD</i>	Średnia ±SD <i>Mean±SD</i>	S/NS	S/K	NS/K
Powierzchnia jądra <i>Nuclear area</i> (μm^2)	110,8±28,9	88,4±15,2	108,4±19,6	nz	0,032	nz
Powierzchnia AgNOR <i>AgNOR area</i> (μm^2)	19,03±2,48	17,99±4,43	19,03±2,94	nz	nz	nz
Liczba AgNOR <i>AgNOR number</i>	1,04±0,07	1,01±0,03	1,02±0,04	nz	nz	nz
Wskaźnik AgNOR <i>AgNOR ratio</i>	0,188±0,028	0,213±0,034	0,188±0,021	nz	0,049	nz

K – osobnicy kontrolni / *controls*, S – samobójcy / *suicides*, NS – nie-samobójcy / *non-suicides*, nz – nieznamienna / *non significant*, n – liczba przypadków / *number of cases*, SD – odchylenie standardowe / *standard deviation*

Tabela 4. Porównanie pomiędzy parametrami AgNOR uzyskanymi w sumarycznej analizie wszystkich regionów DRN samobójców agresywnych, nieagresywnych, nie-samobójców i osobników kontrolnych.

Table 4. AgNOR parameters in the global analysis of all DRN subregions in violent versus non-violent suicides, non-suicides and controls.

Parametr <i>Parameter</i>	V (n=8) Średnia ± SD <i>Mean±SD</i>	NV (n=4) Średnia ± SD <i>Mean±SD</i>	Skorygowane wartości P <i>Corrected P values</i>		
			V/NV	V/NS	V/K
Powierzchnia jądra <i>Nuclear area</i> (μm^2)	79,6±8,9	104,8±5,2	0,012	0,006	0,001
Powierzchnia AgNOR <i>AgNOR area</i> (μm^2)	16,29±1,75	21,40±6,46	nz	nz	0,036
Liczba AgNOR <i>AgNOR number</i>	1,02±0,032	1,07±0,08	nz	nz	nz
Wskaźnik AgNOR <i>AgNOR ratio</i>	0,215±0,027	0,208±0,050	nz	nz	nz

V – samobójcy agresywni / *violent suicides*, NV – samobójcy nieagresywni / *non-violent suicides*, NS – nie-samobójcy / *non-suicides*, K – osobnicy kontrolni / *controls*, nz – niezamienna / *non significant*, n – liczba przypadków/*number of cases*, SD – odchylenie standardowe / *standard deviation*

2. *Badania kariometryczne neuronów piramidowych warstw III i V kory przedniej części zakrętu obręczy*

Z uwagi na dużą liczbę przeprowadzonych testów statystycznych przedstawione zostaną jedynie znamienne ich wyniki.

Najbardziej uderzającymi były obserwowane u osobników kontrolnych, właściwe dla strony i warstwy różnice w zakresie powierzchni jądra i wskaźnika AgNOR pomiędzy grzbietową i brzuszną częścią AC (MANOVA, $F=16,837$, $df=1;33$, $P<0,001$ i $F=5,251$, $df=1;33$, $P=0,028$, odpowiednio). W lewej ACd neurony piramidowe warstwy III wykazywały znamienne większą powierzchnię jądra, co przy niezmienionej powierzchni AgNOR powodowało zmniejszenie wskaźnika AgNOR (tabela 5). Natomiast chorzy z depresją nie wykazywali takich różnic, ponieważ powierzchnia jądra komórkowego w tych neuronach była u nich mniejsza w porównaniu z osobnikami kontrolnymi, jednakże różnica ta była statystycznie niezamienna (tabela 5). Jedyną znamiennej różnicą pomiędzy chorymi z depresją i osobnikami kontrolnymi, wskazaną przy pomocy MANOVA ($F=4,636$, $df=1;33$, $P=0,039$) i potwierdzoną testem t (tabela 6) była zmniejszona liczba AgNOR w warstwie III neuronów piramidowych ACv półkuli prawej w pierwszej z tych grup.

MANOVA wykazała także znamiennej różnicę we wskaźniku AgNOR jako zmienną zależną pomiędzy samobójcami, nie-samobójcami i grupą kontrolną w odniesieniu do warstwy jako jednej ze zmiennych niezależnych ($F=5,522$, $df=1;32$, $P=0,025$). Właściwa dla poszczególnych stron i warstw analiza obu części AC przy pomocy ANOVA wykazała znamiennej wpływ samobójstwa jako pojedynczego czynnika na średnie wartości wskaźnika AgNOR po stronie lewej. Wpływ ten był obserwowany w warstwie V ACv ($F=3,30$, $df=2;37$, $P=0,048$), w sumarycznej analizie warstw III i V ACv ($F=3,80$, $df=2;38$, $P=0,031$) oraz w sumarycznej analizie obu tych warstw w obu częściach AC, tzn. w obrębie wszystkich badanych neuronów piramidowych po stronie lewej ($F=3,91$, $df=2;40$, $P=0,028$). W każdym z podanych zbiorów wyników stwierdzono znamiennej niższy wskaźnik AgNOR u samobójców w porównaniu z nie-samobójcami. Efekt ten był w sposób szczególnie wyrażony w sumarycznej analizie wszystkich neuronów piramidowych po stronie lewej (tabela 7). Jednakże zmniejszeniu powierzchni AgNOR, odpowiedzialnemu za obniżenie wskaźnika AgNOR w tych neuronach, nie towarzyszyło obniżenie powierzchni jądra komórkowego.

Przeprowadzenie porównań z wyodrębnioną grupą samobójców agresywnych nie wpłynęło na wyniki testowania statystycznego.

2.1. *Zmienne wnikające*

Wiek w chwili śmierci jak również wiek w momencie rozpoznania zaburzenia afektywnego były znamiennej niższe u samobójców w porównaniu z nie-samobójcami, ale pierwsza z tych zmiennych nie wykazywała różnicy pomiędzy samobójcami i grupą kontrolną. Inne z analizowanych zmiennych wnikających, takich jak czas po śmierci, czas utrwalania mózgu, współczynnik jego obkurczania, płeć, masa mózgu, czas trwania i biegunowość zaburzenia afektywnego oraz farmakoterapia psychiatryczna nie różniły się znamiennej pomiędzy porównywanymi grupami.

Średnia dawka neuroleptyków podawanych w ostatnich 90 dniach przed śmiercią znamienne korelowała z powierzchnią AgNOR w neuronach piramidowych warstwy III ACd ($r=0,714$, $P<0,001$) u wszystkich chorych z depresją. Co charakterystyczne, występowała silna dodatnia korelacja pomiędzy średnią dawką leków przeciwdepresyjnych podawanych w ciągu ostatnich 7 i 28 dni przed śmiercią i wskaźnikiem AgNOR w neuronach piramidowych warstwy III ACv po stronie lewej u nie-samobójców (odpowiednio: $r=0,954$, $P=0,001$ i $r=0,927$, $P=0,003$). Korelacja ta nie występowała natomiast u samobójców. Inne z analizowanych zmiennych wključających nie wykazywały korelacji z parametrami AgNOR neuronów piramidowych AC.

Ponieważ nie stwierdzono korelacji pomiędzy wiekiem (w chwili śmierci i na początku zaburzenia) a którymkolwiek z badanych parametrów AgNOR, nie zastosowano analizy kowariancji z wiekiem jako zmienną współzależną pomimo stwierdzonych różnic w jego zakresie.

Tabela 5. Różnice wewnątrzgrupowe pomiędzy parametrami AgNOR neuronów piramidowych warstwy III ACd i ACv po stronie lewej.

Table 5. Intra-group differences in AgNOR parameters of pyramidal neurons layer III between the left ACd and ACv.

Parametr <i>Parameter</i>		K (n=24)	D (n=20)	Wartości P ACd/ACv <i>P values ACd/ACv</i>	
		Średnia ± SD <i>Mean±SD</i>	Średnia ± SD <i>Mean±SD</i>	K	D
Powierzchnia jądra <i>Nuclear area</i> (μm^2)	ACd	86,95±9,52	83,14±10,12	0,005	nz
	ACv	80,52±8,57	79,91±9,37		
Powierzchnia AgNOR <i>AgNOR area</i> (μm^2)	ACd	12,16±2,03	11,31±1,49	nz	nz
	ACv	11,88±1,77	11,31±1,73		
Liczba AgNOR <i>AgNOR number</i>	ACd	1,02±0,06	1,04±0,09	nz	nz
	ACv	1,01±0,04	1,02±0,05		
Wskaźnik AgNOR <i>AgNOR ratio</i>	ACd	0,143±0,024	0,139±0,02	0,006	nz
	ACv	0,151±0,021	0,144±0,024		

K – osobnicy kontrolni / *controls*, D – chorzy z depresją / *depressives*, nz – nieznamienna / *non significant*, n – liczba przypadków / *number of cases*, SD – odchylenie standardowe / *standard deviation*

Tabela 6. Porównanie pomiędzy parametrami AgNOR neuronów piramidowych warstwy III ACv po stronie prawej u osobników kontrolnych i chorych z depresją.

Table 6. AgNOR parameters in the analysis of right ACv layer III pyramidal neurons in depressives versus controls.

Parametr <i>Parameter</i>	K (n=24) Średnia ± SD <i>Mean±SD</i>	D (n=20) Średnia ± SD <i>Mean±SD</i>	Wartości P <i>P values</i> D/K
Powierzchnia jądra <i>Nuclear area (μm²)</i>	80,72±7,33	80,18±10,95	nz
Powierzchnia AgNOR <i>AgNOR area (μm²)</i>	11,66±2,18	11,05±1,72	nz
Liczba AgNOR <i>AgNOR number</i>	1,03±0,07	1,00±0,00	0,047
Wskaźnik AgNOR <i>AgNOR ratio</i>	0,147±0,024	0,141±0,018	nz

K – osobnicy kontrolni / *controls*, D – chorzy z depresją / *depressives*, nz – nieznamienna / *non significant*, n – liczba przypadków / *number of cases*, SD – odchylenie standardowe / *standard deviation*

Tabela 7. Parametry AgNOR w warstwie V (laV) lewej ACv i w sumarycznej analizie warstw III i V (cum) ACd i ACv po stronie lewej u samobójców w porównaniu z nie-samobójcami i osobnikami kontrolnymi.

Table 7. AgNOR parameters in the left ACv layer V (laV) and in cumulative analysis of the left ACd and ACv layers III and V (cum) in suicides versus non-suicides and controls.

Parametr <i>Parameter</i>		K (n=26) Średnia ± SD <i>Mean±SD</i>	S (n=12) Średnia ± SD <i>Mean±SD</i>	NS (n=11) Średnia ± SD <i>Mean±SD</i>	Skorygowane wartości P <i>Corrected P values</i>		
					S/NS	S/K	NS/K
Powierzchnia jądra <i>Nuclear area</i> (μm^2)	laV	81,05±10,60	82,90±11,00	73,13±11,57	nz	nz	nz
	cum	83,57±5,02	84,60±8,41	79,96±7,03	nz	nz	nz
Powierzchnia AgNOR <i>AgNOR area</i> (μm^2)	laV	11,98±1,90	10,71±2,21	11,37±1,22	nz	nz	nz
	cum	12,05±1,70	10,72±1,61	11,83±0,74	nz	nz	nz
Liczba AgNOR <i>AgNOR number</i>	laV	1,03±0,08	1,02±0,04	1,01±0,03	nz	nz	nz
	cum	1,02±0,03	1,04±0,05	1,01±0,02	nz	nz	nz
Wskaźnik AgNOR <i>AgNOR ratio</i>	laV	0,152±0,025	0,132±0,025	0,160±0,022	0,023	0,050	nz
	cum	0,147±0,019	0,130±0,022	0,152±0,012	0,014	0,034	nz

K – osobnicy kontrolni / *controls*, S – samobójcy / *suicides*, NS – nie-samobójcy / *non-suicides*, nz – nieznamienność / *non significant*, n – liczba przypadków / *number of cases*, SD – odchylenie standardowe / *standard deviation*

3. *Badania kariometryczne neuronów piramidowych warstw III i V kory oczodołowo-czołowej*

Wstępna analiza statystyczna przy pomocy MANOVA wykazała właściwe dla strony oraz warstwy różnice w powierzchni przekroju jądra komórkowego (odpowiednio: $F=6,57$, $df=1;33$, $P=0,015$ oraz $F=5,46$, $df=1;33$, $P=0,026$) jak również we wskaźniku AgNOR (odpowiednio: $F=78,81$, $df=1;33$, $P<0,001$ oraz $F=9,41$, $df=1;33$, $P=0,004$). Natomiast zgodnie z wynikami tego testu, różnice w liczbie i powierzchni AgNOR były właściwe tylko dla strony (odpowiednio: $F=12,1$, $df=1;31$, $P=0,002$ oraz $F=76,75$, $df=1;33$, $P<0,001$).

W obrębie półkuli prawej zmianą charakterystyczną dla depresji był statystycznie znamienny wzrost powierzchni AgNOR w neuronach piramidowych warstwy V (tabela 8). Nie był to efekt właściwy ani dla grupy samobójców, ani dla nie-samobójców (ANOVA, $P=0,074$). Wskaźnik AgNOR w neuronach piramidowych warstwy III po stronie prawej był znamiennie podwyższony u wszystkich chorych z depresją w następstwie powiększenia obszaru AgNOR (tabela 8). Także ta zmiana nie była właściwa dla żadnej z dwóch grup chorych (ANOVA, $P=0,1$). Również u wszystkich chorych z depresją, neurony piramidowe warstwy V w obrębie półkuli lewej wykazały wyższą liczbę AgNOR w porównaniu z osobnikami kontrolnymi (tabela 8). Ten efekt był jednak związany z wpływem trójstopniowej zmiennej niezależnej, jaką stanowiła grupa diagnostyczna: samobójcy / nie-samobójcy / kontrolni (ANOVA, $P=0,024$). Wartość P dla testu t po korekcie dla porównań wielokrotnych wskazywała na tendencję do występowania wyższej liczby AgNOR u nie-samobójców ($P=0,058$), nie osiągnęła jednak poziomu wymaganego dla znamienności statystycznej.

Przeprowadzenie porównań z wyodrębnioną grupą samobójców agresywnych nie wpłynęło na wyniki testowania statystycznego.

Różnice w parametrach AgNOR, zasygnalizowane wstępnie przy pomocy MANOVA, znalazły także odzwierciedlenie w porównaniach wewnątrzgrupowych dla par wartości, przeprowadzanych przy pomocy testu Wilcoxon. Jako charakterystyczne dla grupy kontrolnej stwierdzono: większą średnią powierzchnię jądra ($79,8$ wobec $75,9 \mu\text{m}^2$, $P=0,002$) i mniejszy średni wskaźnik AgNOR ($0,131$ wobec $0,135$, $P=0,017$) w komórkach piramidowych warstwy III w porównaniu z warstwą V po stronie prawej oraz większą średnią powierzchnię jądra w neuronach piramidowych warstwy V po stronie lewej w porównaniu z prawą ($79,1$ wobec $75,9 \mu\text{m}^2$, $P=0,039$; tabela 9). Inne cechy charakterystyczne grupy kontrolnej polegały na: wyższej średniej liczbie AgNOR w neuronach piramidowych warstwy III w porównaniu z V po stronie lewej ($1,04$ wobec $1,01$, $P=0,001$) oraz warstw V i III po stronie prawej w porównaniu z lewą (odpowiednio: $1,08$ wobec $1,01$ i $1,08$ wobec $1,04$, $P=0,001$ i $P=0,008$; wartości dla warstwy V ujęte w tabeli 9). Zarówno wszyscy chorzy z depresją jak i ich grupy nie wykazali tych charakterystycznych dla osobników kontrolnych różnic pomiędzy neuronami warstwy III i V oraz pomiędzy półkulami (porównanie pomiędzy neuronami warstwy V obu półkul w tabeli 9).

Natomiast grupa samobójców w sposób charakterystyczny nie wykazywała znamiennej wyższej średniej wartości wskaźnika AgNOR w neuronach piramidowych warstwy V po stronie lewej w porównaniu z prawą, co było efektem obserwowanym w grupie kontrolnej, u wszystkich pacjentów z depresją oraz w grupie nie-samobójców

(tabela 9). Było to jedyne odchylenie specyficzne dla samobójców, wykazane w przeprowadzonej analizie statystycznej.

3.1. Zmienne wikłające

Wiek w chwili śmierci różnił się znamienne pomiędzy samobójcami, innymi chorymi nie-samobójcami i grupą kontrolną (ANOVA, $P=0,022$). Średnia tego wieku u samobójców była znamienne niższa niż u nie-samobójców (41,8 wobec 56,8 lat; test t, $P=0,018$). W drugiej z grup zmienna ta wykazywała korelację ujemną z powierzchnią AgNOR w neuronach piramidowych warstwy III obustronnie ($r\leq-0,80$, $P\leq0,006$).

Średnia wieku w momencie rozpoznania choroby była również znamienne niższa u samobójców w porównaniu z innymi chorymi (33,4 wobec 44,8 lat; test t, $P=0,008$). Zmienna ta korelowała z liczbą AgNOR w neuronach piramidowych warstwy III po stronie lewej u nie-samobójców ($r=0,84$, $P=0,002$).

Średni czas utrwalania mózgu różnił się znamienne pomiędzy samobójcami, nie-samobójcami i kontrolą (odpowiednio: 301,8, 1346,1 i 330,6 dni; ANOVA, $P<0,001$). Zmienna ta korelowała tylko ze wskaźnikiem AgNOR w neuronach piramidowych warstwy V po stronie prawej u samobójców ($r=0,89$, $P=0,001$).

Inne zmienne, które mogłyby wpływać na parametry AgNOR w neuronach piramidowych, takie jak płeć, czas trwania zaburzenia afektywnego i jego biegunowość, czas po śmierci, współczynnik obkurczania mózgu i jego masa nie różniły się pomiędzy porównywanymi grupami ani nie korelowały z wartościami parametrów AgNOR. Średnie dawki dobowe leków psychotropowych nie różniły się znamienne pomiędzy samobójcami i nie-samobójcami.

Reasumując, w porównywanych grupach nie stwierdzono zgodnych ze sobą korelacji pomiędzy zmiennymi wikłającymi, wykazującymi znamienne różnice a jakimkolwiek z parametrów AgNOR, różniącym się znamienne pomiędzy porównywanymi grupami. Wobec powyższego zmienne te, tj. wiek w chwili śmierci i w momencie rozpoznania zaburzenia oraz czas utrwalania mózgu nie stanowiły zmiennych współzależnych i nie wymagały zastosowania uwzględniającej je analizy kowariancji.

Chociaż pomiędzy porównywanymi grupami chorych z depresją nie występowały znamienne statystycznie różnice w dawkach dobowych leków psychotropowych, stwierdzono występowanie szeregu korelacji pomiędzy nimi a parametrami AgNOR (tabela 10). Podsumowując wyniki przeprowadzonych analiz, zasadniczym było stwierdzenie ujemnej korelacji pomiędzy dawkami leków przeciwdepresyjnych a powierzchnią AgNOR w neuronach piramidowych warstwy V OFC po stronie prawej u chorych nie będących samobójcami i jednocześnie jej brak u samobójców. Pewne znaczenie mogą także posiadać inne, wynikające z analizy korelacji odmienności wpływu stosowanych leków psychotropowych na parametry AgNOR w grupie samobójców i nie-samobójców.

Tabela 8. Ocena zbiorcza zmian parametrów AgNOR w korze oczodołowo-czołowej.
Table 8. The summarised changes of AgNOR parameters in the orbitofrontal cortex.

Zmiany parametrów AgNOR w neuronach piramidowych warstwy V po stronie prawej.
The changes of AgNOR parameters in the right OFC layer V pyramidal neurons.

Parametr <i>Parameter</i>	K (n = 24) Średnia±SD <i>Mean±SD</i>	D (n = 19) Średnia±SD <i>Mean±SD</i>	Wartości P <i>P values</i> D/K
Powierzchnia jądra (μm^2) <i>Nuclear area</i>	75,9±5,2	78,5±4,9	nz
Powierzchnia AgNOR (μm^2) <i>AgNOR area</i>	10,15±0,94	10,7±0,050	0,029
Liczba AgNOR <i>AgNOR number</i>	1,08±0,07	1,06±0,05	nz
Wskaźnik AgNOR <i>AgNOR ratio</i>	0,135±0,011	0,138±0,010	nz

Zmiany parametrów AgNOR w neuronach piramidowych warstwy III po stronie prawej.
The changes of AgNOR parameters in the right OFC layer III pyramidal neurons.

Parametr <i>Parameter</i>	K (n = 24) Średnia±SD <i>Mean±SD</i>	D (n = 19) Średnia±SD <i>Mean±SD</i>	Wartości P <i>P values</i> D/K
Powierzchnia jądra (μm^2) <i>Nuclear area</i>	79,8±3,7	79,3±3,5	nz
Powierzchnia AgNOR (μm^2) <i>AgNOR area</i>	10,35±0,79	10,73±0,73	nz
Liczba AgNOR <i>AgNOR number</i>	1,08±0,05	1,07±0,06	nz
Wskaźnik AgNOR <i>AgNOR ratio</i>	0,131±0,007	0,137±0,010	0,037

Zmiany parametrów AgNOR w neuronach piramidowych warstwy V po stronie lewej.
The changes of AgNOR parameters in the left OFC layer V pyramidal neurons.

Parametr <i>Parameter</i>	K (n = 24) Średnia±SD <i>Mean±SD</i>	D (n = 19) Średnia±SD <i>Mean±SD</i>	Wartości P <i>P values</i> D/K
Powierzchnia jądra (μm^2) <i>Nuclear area</i>	79,1±7,1	80,5±5,9	nz
powierzchnia AgNOR (μm^2) <i>AgNOR area</i>	11,67±1,22	12,14±0,82	nz
Liczba AgNOR <i>AgNOR ratio</i>	1,01±0,02	1,04±0,04	0,006
Wskaźnik AgNOR <i>AgNOR ratio</i>	0,152±0,012	0,155±0,007	nz

K – osobnicy kontrolni / *controls*, D – chorzy z depresją / *depressives*, nz – nieznamienna / *non significant*, n – liczba przypadków / *number of cases*, SD – odchylenie standardowe / *standard deviation*

Tabela 9. Ocena porównawcza parametrów AgNOR neuronów piramidowych warstwy V kory oczodołowo-czołowej po stronie prawej i lewej.

Table 9. The comparative analysis between AgNOR parameters of pyramidal neurons layer V in the right and left orbitofrontal cortex.

Parametr <i>Parameter</i>		K (n = 24) Średnia±SD <i>Mean±SD</i>	D (n = 19) Średnia±SD <i>Mean±SD</i>	NS (n = 10) Średnia±SD <i>Mean±SD</i>	S (n = 9) Średnia±SD <i>Mean±SD</i>
Powierzchnia jądra (μm^2) <i>Nuclear area</i>	Prawa <i>Right</i>	75,9±5,2	78,5±4,9	79,4±4,3	77,5±5,6
	Lewa <i>Left</i>	79,1±7,1	80,5±5,9	80,2±7,0	80,9±4,5
	<i>P</i>	0,039	nz	nz	nz
Powierzchnia AgNOR (μm^2) <i>AgNOR area</i>	Prawa <i>Right</i>	10,15±0,94	10,7±0,050	10,82±0,50	10,82±0,50
	Lewa <i>Left</i>	11,67±1,22	12,14±0,82	12,26±0,94	11,99±0,69
	<i>P</i>	<0,001	<0,001	0,007	0,012
Liczba AgNOR <i>AgNOR number</i>	Prawa <i>Right</i>	1,08±0,07	1,06±0,05	1,05±0,03	1,06±0,07
	Lewa <i>Left</i>	1,01±0,02	1,04±0,04	1,04±0,03	1,04±0,04
	<i>P</i>	0,001	nz	nz	nz
Wskaźnik AgNOR <i>AgNOR ratio</i>	Prawa <i>Right</i>	0,135±0,011	0,138±0,010	0,138±0,010	0,139±0,011
	Lewa <i>Left</i>	0,152±0,012	0,155±0,007	0,157±0,007	0,151±0,006
	<i>P</i>	0,001	0,002	0,007	nz

K – osobnicy kontrolni / *controls*, D – wszyscy chorzy z depresją / *all depressives*, S – samobójcy / *suicides*, NS – nie-samobójcy / *non-suicides*, nz – nieznamienna / *non significant*, n – liczba przypadków / *number of cases*, P – wartości P testu Wilcoxona / *Wilcoxon test P values*, SD – odchylenie standardowe / *standard deviation*

Tabela 10. Znamienne statystycznie korelacje pomiędzy parametrami AgNOR neuronów piramidowych kory oczodołowo-czołowej i lekami psychotropowymi przyjmowanymi przez badane grupy chorych z depresją w ciągu ostatnich 90 dni przed zgonem.

Table 10. The significant correlations found between AgNOR parameters of orbitofrontal cortex pyramidal neurons and psychotropic medication in analysed subgroups of depressives in the last 90 days of lifetime.

Region Region	AD		NL		Lit Lithium	
	NS	S	NS	S	NS	S
Warstwa III prawa						
<i>Layer III right</i>						
Powierzchnia jądra <i>Nuclear area</i>	nz/nk	nz/nk	nz/nk	nz/nk	nz/nk	0,85*
Powierzchnia AgNOR <i>AgNOR area</i>	nz/nk	nz/nk	0,75*	nz/nk	nz/nk	nz/nk
Warstwa V prawa						
<i>Layer V right</i>						
Powierzchnia jądra <i>Nuclear area</i>	nz/nk	0,8*	0,75*	nz/nk	nz/nk	-0,74*
Powierzchnia AgNOR <i>AgNOR area</i>	-0,92**	nz/nk	nz/nk	nz/nk	nz/nk	nz/nk
Warstwa III lewa						
<i>Layer III left</i>						
Powierzchnia jądra <i>Nuclear area</i>	nz/nk	nz/nk	0,72*	nz/nk	0,69*	nz/nk
Powierzchnia AgNOR <i>AgNOR area</i>	nz/nk	nz/nk	0,96**	nz/nk	nz/nk	nz/nk

AD – leki przeciwdepresyjne / *antidepressants*, NL – neuroleptyki / *neuroleptics*, NS – nie-samobójcy / *non-suicides*, S – samobójcy / *suicides*, * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, nz/nk – nie znamienne i nie korelujące / *non significant and non correlated*; podano wartości liczbowe współczynników korelacji / *the values of correlation coefficients are shown*

4. *Badania liczby neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym*

Nie stwierdzono znamiennej różnicy w liczbie neuronów TH-reaktywnych po obu stronach oraz w ich liczbie całkowitej pomiędzy wszystkimi chorymi z depresją a osobnikami kontrolnymi, co wykazano przy pomocy testu U. Nie stwierdzono także takich różnic pomiędzy samobójcami, nie-samobójcami i grupą kontrolną jak również pomiędzy samobójcami agresywnymi, nieagresywnymi, nie-samobójcami i grupą kontrolną, co wykazano przy pomocy testu KW. Natomiast test KW wykazał znamiennej różnicę pomiędzy samobójcami agresywnymi i nieagresywnymi oraz osobnikami kontrolnymi w odniesieniu do liczby neuronów po stronie prawej ($P=0,015$) i ich liczby całkowitej po obu stronach ($P=0,027$). Przeprowadzone *post hoc* testy U wykazały, że wartość tych parametrów była znamiennej wyższa u samobójców agresywnych w porównaniu zarówno z nieagresywnymi jak i z osobnikami kontrolnymi (tabela 11).

4.1. *Zmienne wklajające*

Wiek w chwili śmierci różnił się znamiennej pomiędzy samobójcami, nie-samobójcami i osobnikami kontrolnymi (test KW, $P=0,027$). Samobójcy byli młodsi niż osobnicy kontrolni (test U, $P=0,022$) i nie-samobójcy (test U, $P=0,048$). Jednakże nie stwierdzono znamiennej różnicy w zakresie tej zmiennej pomiędzy samobójcami agresywnymi i nieagresywnymi oraz grupą kontrolną (test KW, $P=0,055$). W grupie samobójców stwierdzono tendencję do występowania wyższej dawki dobowej leków przeciwdepresyjnych przyjmowanych w ciągu ostatnich 7 dni przed zgonem w porównaniu z nie-samobójcami (test U, $P=0,059$) ale tendencja taka nie występowała u samobójców agresywnych w porównaniu z nieagresywnymi (test U, $P=0,57$). Wiek w momencie stwierdzenia zaburzenia był znamiennej niższy w grupie samobójców w porównaniu z nie-samobójcami (test U, $P=0,003$) lecz pomiędzy samobójcami agresywnymi i nieagresywnymi nie stwierdzono różnicy (test U, $P=0,91$). Pomiedzy porównywanymi grupami nie występowały znamiennej statystycznie różnice w zakresie takich analizowanych zmiennych wklajających, jak płeć, czas po śmierci i czas utrwalania mózgu, jego masa i współczynnik obkurczania, czynniki stresujące w okresie roku przed zgonem, status palenia tytoniu, czas trwania agonii, biegunowość i czas trwania zaburzenia afektywnego.

Średnia dawka dobowe leków przeciwdepresyjnych przyjmowanych w ciągu ostatnich 90 dni przed śmiercią przez samobójców korelowała ujemnie z liczbą badanych neuronów po stronie prawej ($r=-0,725$, $P=0,018$). Wartości innych analizowanych zmiennych wklajających nie korelowały z liczbą neuronów TH-reaktywnych ani właściwą dla strony, ani całkowitą.

Tabela 11. Liczba neuronów TH-immunoreaktywnych w miejscu sinawym samobójców agresywnych w porównaniu z nieagresywnymi i z osobnikami kontrolnymi.

Table 11. The number of TH-immunoreactive neurons in the locus coeruleus of violent versus non-violent suicides and controls.

	K	NV	V	K/NV	K/V	NV/V
	n = 21	n = 4	n = 7	Wartości P* testu U		
	U-test P* values					
Średnia liczby całkowitej <i>Mean of the total number</i>	70 900	55 738	89 954	nz	0,042	0,042
SD	20 901	28 210	16 604			
Średnia strony prawej <i>Mean of the right side</i>	35 418	27 811	45 735	nz	0,018	0,024
SD	10 427	16 306	7 134			
Średnia strony lewej <i>Mean of the left side</i>	35 482	27 927	44 219	nz	nz	nz
SD	10 830	13 109	10 260			

V – samobójcy agresywni / *violent suicides*, NV – samobójcy nieagresywni / *non-violent suicides*, NS – nie-samobójcy / *non-suicides*, K – osobnicy kontrolni / *controls*, nz – niezamienna / *non significant*, n – liczba przypadków / *number of cases*, SD – odchylenie standardowe / *standard deviation*, * – skorygowane dla porównań wielokrotnych / *corrected for multiple comparisons*

5. *Badania gęstości neuropilu GABAergicznego w regionach kory przedczołowej i w wybranych strukturach limbicznych płata skroniowego*

Jedyna znamienne statystycznie różnica pomiędzy wszystkimi chorymi z depresją i grupą kontrolną polegała na wzroście gęstości neuropilu GAD-ir w pierwszej z tych grup obustronnie w warstwie III EC (test U, $P \leq 0,004$) i w jej warstwie V po stronie lewej (test U, $P=0,009$).

Analiza statystyczna przy pomocy testu KW wykazała znamienne, obustronne różnice gęstości neuropilu GAD-ir pomiędzy samobójcami, nie-samobójcami i osobnikami kontrolnymi w obrębie EC (warstwy III i V; $0,0001 \leq P \leq 0,006$), CA1 (warstwa piramidowa po stronie prawej $P=0,015$, po stronie lewej $P=0,003$) i DG (warstwa ziarnista po stronie prawej $P=0,013$, po stronie lewej $P=0,009$). Jedynie w półkuli lewej stwierdzono znamienne różnice pomiędzy porównywanymi grupami w obrębie warstwy V DLC ($P=0,041$). Nie stwierdzono natomiast znamiennych różnic w obrębie badanych obszarów limbicznych kory przedczołowej jak również jąder limbicznych wzgórza.

Zastosowane *post hoc* testy U z poprawką wg Bonferroni-Holm-Shaffer wykazały znamienne wyższą gęstość neuropilu GAD-ir u samobójców w porównaniu z nie-samobójcami i grupą kontrolną, a więc charakterystyczną dla samobójców, w obrębie EC, CA1 i DG (tabela 12). Efekt ten był najbardziej widoczny w EC. Tak więc stwierdzona w pierwszym etapie analizy statystycznej u wszystkich chorych z depresją w porównaniu z grupą kontrolną większa gęstość neuropilu GAD-ir w EC w warstwie III prawej i V lewej okazała się efektem właściwym jedynie dla samobójców. Jedynie warstwa III EC po stronie lewej była regionem, w którym także nie-samobójcy wykazywali wyższą gęstość neuropilu GAD-ir w porównaniu z osobnikami kontrolnymi, tak więc był to jedyny efekt wspólny dla obu grup chorych depresyjnych. Z kolei warstwa V DLC po stronie lewej była jedynym z badanych regionów, w którym stwierdzono zmniejszenie gęstości neuropilu GAD-ir, znamienne dla nie-samobójców w porównaniu z samobójcami i grupą kontrolną (tabela 12).

Wyodrębnienie podgrupy samobójców agresywnych nie wpłynęło w znaczący sposób na wyniki testowania statystycznego.

5.1. *Zmienne wikłające*

Pomiędzy samobójcami i nie-samobójcami występowała znamienne statystycznie różnica w składzie diagnostycznym tych grup, ponieważ w drugiej z nich dominowali chorzy z BD (6 z 7). Jednak tylko w warstwie III EC po stronie lewej występowała umiarkowana korelacja dodatnia pomiędzy gęstością neuropilu GAD-ir i biegunowością ($r=0,611$, $P=0,001$). Średnia wartość badanego parametru u nie-samobójców była znamienne niższa w porównaniu z samobójcami i wyższa w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 12). Tak więc biegunowość nie powinna być rozpatrywana jako zmienna mająca wpływ na stwierdzoną różnicę pomiędzy nie-samobójcami i samobójcami lecz wyższa gęstość neuropilu GAD-ir u nie-samobójców w porównaniu z kontrolą stanowiła najprawdopodobniej efekt BD. W podobny sposób, najprawdopodobniej efektem specyficznym dla BD było obniżenie wartości badanego parametru w warstwie V DLC po stronie lewej u nie-samobójców w porównaniu z samobójcami i kontrolą, chociaż w tym regionie nie stwierdzono korelacji z biegunowością ($r=-0,377$, $P=0,036$). Jednak zasto-

sowana procedura nieparametryczna wykluczała analizę kowariancji z biegunowością jako zmienną współzależną w obu podanych regionach.

Nie stwierdzono ponadto znamiennej statystycznie różnicy wartości badanego parametru pomiędzy samobójcami z MDD i BD w tych badanych regionach, gdzie występowały jego wyższe wartości charakterystyczne dla samobójców. Natomiast w regionach tych wykazano znamienne wyższą gęstość neuropilu GAD-ir u samobójców z BD w porównaniu z nie-samobójcami z tym rozpoznaniem. Podsumowując, potencjalnie wikłający wpływ dychotomii jednobiegunowość-dwubiegunowość na wynik porównania samobójców z nie-samobójcami wydaje się być wysoce wątpliwy.

Pomiędzy porównywanymi podgrupami pacjentów nie występowały znamienne statystycznie różnice dawek przyjmowanych leków psychotropowych. Jedynie u samobójców stwierdzono statystycznie znamienne, ujemne korelacje pomiędzy gęstością neuropilu GAD-ir a średnimi dawkami przyjmowanych leków psychotropowych w części badanych regionów oprócz OFC, EC, GD i MD (tabela 13).

Wartości innych zmiennych, które mogłyby wpływać na gęstość neuropilu GAD-ir, takich jak czas po śmierci i czas utrwalania mózgu, współczynnik jego obkurczania, masa mózgu, wiek w chwili śmierci i w momencie wystąpienia zaburzenia oraz jego czas trwania nie różniły się znamienne pomiędzy porównywanymi grupami i nie korelowały z wartościami badanego parametru w żadnym z badanych regionów.

Tabela 12. Wyniki testów U w badanych regionach, w których stwierdzono znamienne różnice pomiędzy porównywanymi grupami.

Table 12. The results of U-tests in regions of interest where significant differences between compared groups were found.

Region i grupa		Gęstość neuropilu GAD-ir <i>GAD-ir neuropil density</i>	<i>P*</i>		
<i>Region and group</i>	Mediana (q1;q3; n) <i>Median</i>		S/K	NS/K	S/NS
CA1 lewa <i>left</i>	K	0,004 (0,001; 0,253; 18)	0,004	nz	0,006
	S	1,090 (0,704; 1,908; 14)			
	NS	0,002 (0,001; 0,013; 7)			
CA1 prawe <i>right</i>	K	0,022 (0,002; 0,307; 18)	0,022	nz	0,021
	S	0,984 (0,259; 1,256; 14)			
	NS	0,003 (0,002; 0,075; 7)			
DLC lewa V <i>left</i>	K	0,552 (0,014; 5,346; 18)	nz	0,026	0,042
	S	0,505 (0,018; 2,960; 14)			
	NS	0,005 (0,002; 0,013; 7)			
EC lewa III <i>left</i>	K	0,008 (0,003; 0,029; 18)	<0,001	0,027	0,012
	S	0,707 (0,316; 3,768; 14)			
	NS	0,142 (0,014; 0,329; 7)			
EC lewa V <i>left</i>	K	0,011 (0,006; 0,035; 18)	<0,001	nz	0,001
	S	0,720 (0,568; 2,318; 14)			
	NS	0,013 (0,009; 0,228; 7)			
EC prawa III <i>right</i>	K	0,012 (0,003; 0,069; 18)	0,006	nz	nz
	S	0,702 (0,330; 2,833; 14)			
	NS	0,105 (0,015; 0,291; 7)			
EC prawa V <i>right</i>	K	0,023 (0,005; 0,073; 18)	0,015	nz	0,007
	S	0,779 (0,355; 2,975; 14)			
	NS	0,014 (0,003; 0,160; 7)			
GD lewy <i>left</i>	K	0,310 (0,035; 1,529; 18)	0,021	nz	0,021
	S	1,900 (1,159; 2,978; 14)			
	NS	0,009 (0,003; 0,187; 7)			
GD prawy <i>right</i>	K	0,207 (0,006; 1,187; 18)	0,022	nz	0,03
	S	1,702 (1,026; 4,524; 14)			
	NS	0,005 (0,002; 0,274; 7)			

GAD-ir – GAD-immunoreaktywnego/*GAD-immunoreactive*, *P**– wartości *P* testu U skorygowane dla porównań wielokrotnych/*U-test P values corrected for multiple comparisons*, K – osobnicy kontrolni/*controls*, S – samobójcy/*suicides*, NS – nie-samobójcy/*non-suicides*, nz – nieznamienne/*non significant*, q1 i q3 – kwartył 1 i 3/*quartile 1 and 3*, n – liczba przypadków/*number of cases*, CA1 – pole hipokampa CA1/*CA1 field of hippocampus*, DLC – grzbieutowo-boczna kora przedczołowa/*dorsolateral prefrontal cortex*, EC – kora śródwęchowa/*entorhinal cortex*, GD – zakręt zębaty/*gyrus dentatus*, III – warstwa III/*layer III* i V – warstwa V komórek piramidowych kory nowej/*and V – layer V of pyramidal cells in neocortex*

Tabela 13. Znamienne statystycznie korelacje stwierdzone u samobójców pomiędzy średnimi dawkami dobowymi leków psychotropowych i gęstością neuropilu GAD-immunoreaktywnego w badanych regionach (leki przeciwdepresyjne, neuroleptyki i lit – w ostatnich 90 dniach, benzodwiazepiny – w ostatnich 28 dniach przed śmiercią).

Table 13. The significant correlations found between mean daily doses of psychotropic medication and GAD-immunoreactive neuropil relative density in the regions of interest of suicides (antidepressants, neuroleptics and lithium – in the last 90 days, benzodiazepines – in the last 28 days of lifetime).

Region <i>Region</i>	AD	NL	BDZ	Lit <i>Lithium</i>
AC lewa III <i>left</i>	nz/nk	nz/nk	-0,69*	nz/nk
AC prawa III <i>right</i>	nz/nk	nz/nk	-0,81**	-0,80**
AC prawa V <i>right</i>	nz/nk	nz/nk	-0,83**	-0,74*
CA1 lewa <i>left</i>	-0,83*	nz/nk	nz/nk	nz/nk
DLC lewa III <i>left</i>	nz/nk	nz/nk	-0,86**	-0,72*
DLC lewa V <i>left</i>	-0,79**	-0,65*	-0,83**	-0,69*
DLC prawa III <i>right</i>	nz/nk	nz/nk	-0,78**	-0,75*
DLC prawa V <i>right</i>	nz/nk	nz/nk	-0,84**	-0,95*
LD lewa <i>left</i>	-0,71*	nz/nk	nz/nk	nz/nk

AD – leki przeciwdepresyjne/*antidepressants*, NL – neuroleptyki/*neuroleptics*, BDZ – benzodwiazepiny/*benzodiazepines*, AC – kora przedniej części zakrętu obręczy/*anterior cingulate cortex*, CA1 – pole CA1 hipokampa/*CA1 field of hippocampus*, DLC – grzbietowo-boczna kora przedczołowa/*dorsolateral prefrontal cortex*, LD – boczne grzbietowe jądro wzgórza/*laterodorsal thalamic nucleus*, nz/nk – nie znamienne i nie korelujące/*non significant and non correlated*, III – warstwa III/*layer III* i V – warstwa V komórek piramidowych kory nowej/*and V - layer V of pyramidal cells in neocortex*, * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$; podano wartości liczbowe współczynników korelacji/*the values of correlation coefficients are shown*

DYSKUSJA

1. *Badania kariometryczne neuronów jądra grzbietowego szwu*

Przeprowadzone badania wykazały u samobójców z depresją w porównaniu z osobnikami kontrolnymi statystycznie znamienne zmniejszenie jądra komórkowego neuronów DRN, któremu towarzyszyło nieznaczne zmniejszenie powierzchni i liczby AgNOR w tych neuronach. Ponieważ zmniejszenie jądra komórkowego było bardziej nasilone niż zmniejszenie elementów AgNOR, w konsekwencji wystąpił także znamienny wzrost wskaźnika AgNOR u samobójców w porównaniu z grupą kontrolną. Uzyskane wyniki są zgodne z poprzednio stwierdzonymi w mniejszej grupie [109]. Wykazano ponadto, że zmiany parametrów AgNOR ulegają nasileniu wraz z poziomem autoagresywności. Tak więc efekt zaobserwowany u części chorych z depresją jest specyficzny dla procesów prowadzących do samobójstwa, w szczególności o nasilonej autoagresywności. Samobójstwo takie jest połączone z reguły z uszkodzeniami mechanicznymi ciała, wymagającymi w praktyce sądowo-lekarskiej niekiedy różnicowania z następstwami działania ręki obcej. Choć występowały znamienne różnice wiekowe pomiędzy porównywanymi grupami oraz w dawkach leków przeciwdepresyjnych przyjmowanych na krótko przed śmiercią, zmienne te nie korelowały z żadnym z badanych parametrów AgNOR. Dlatego nie musiały być one uwzględniane jako zmienne współzależne i tym samym nie musiała być stosowana analiza kowariancji uwzględniająca oprócz parametrów AgNOR także te zmienne (wiek: $-0,304 \leq r \leq 0,416$ i $0,098 \leq P \leq 0,97$; średnia dawka leków przeciwdepresyjnych przyjmowanych w ostatnich 7 dniach przed śmiercią: $-0,546 \leq r \leq 0,635$ i $0,066 \leq P \leq 0,91$). Natomiast u samobójców stwierdzono korelację dodatnią pomiędzy wielkością jądra komórkowego a dawkami leków psychotropowych przyjmowanych przez dłuższy czas przed śmiercią. Oznacza to, że leki te przeciwdziałały zmniejszaniu się jądra neuronów DRN stwierdzonemu u samobójców w porównaniu z nie-samobójcami i osobnikami kontrolnymi. Obie grupy chorych z depresją nie wykazywały znamiennych różnic w kompozycji diagnostycznej (MDD/BD) ani żaden z parametrów AgNOR nie korelował z biegunowością zaburzenia. Reasumując, całość omówionych wyników przemawia za procesami prowadzącymi do samobójstwa jako wyłączną przyczyną wykazanych odchyłeń kariometrycznych.

Znamienność statystyczna została wykazana jedynie na drodze sumarycznej analizy wszystkich regionów DRN. Pozostaje to w zgodzie z poprzednimi doniesieniami na temat globalnego wpływu na DRN procesów neurobiologicznych prowadzących do samobójstwa, co z kolei odpowiada wielości i różnorodności objawów poprzedzających akt samobójczy, powodowanych przez dysfunkcję ośrodkowego układu serotonergicznego [129, 260]. Obserwowany efekt może wynikać także z uwarunkowań anatomicznych, ponieważ obszary unerwienia przez poszczególne regiony DRN nakładają się wzajemnie w dużym stopniu pomimo zaznaczonej specyfiki [133, 263, 276]. Uwarunkowania te uzasadniają jednocześnie rozpatrywanie DRN jako pojedynczej struktury anatomiczno-czynnościowej.

W badaniach zaburzeń psychicznych u człowieka metoda barwienia AgNOR była do tej pory rzadko stosowana [33, 108, 109, 163]. Pacjenci z chorobą Alzheimera (ang. *Alzheimer disease*, AD) i starsi osobnicy kontrolni wykazywali w porównaniu z młodymi osobnikami kontrolnymi zmniejszenie powierzchni AgNOR w neuronach piramido-

wych hipokampa, co wskazywało na związane z AD i wiekiem obniżenie aktywności transkrypcyjnej rDNA [163]. Podobny efekt obserwowano w neuronach piramidowych AC samobójców z depresją, chociaż bez uzyskania znamienności statystycznej (tabela 7). Wyniki te są do pewnego stopnia zgodne z uzyskanymi w DRN samobójców z depresją, zwłaszcza w podgrupie samobójców agresywnych (tabela 3 i 4). Z drugiej strony należy podkreślić, że znane są od dziesięcioleci badania kariometryczne struktur OUN innych niż DRN i obszary PFC, przeprowadzane w różnych modelach zwierzęcych przy użyciu metod wysrebrzania [21, 101-104, 107, 186, 225, 229, 236, 242, 245, 265]. Badania te wykazały w sposób jednoznaczny korelację dodatnią pomiędzy wielkością jądra komórkowego i aktywnością neuronalną.

Zmiany wielkości i liczby elementów AgNOR w komórkach nie ulegających podziałowi (poza komórkami OUN) uznano za wyznacznik aktywności syntezy komórkowej białka pod warunkiem, że jej poziom był zwiększony przez dłuższy okres czasu (tygodnie – miesiące) [72, 136, 167, 237]. To samo sugerowano w odniesieniu do neuronów [186]. Wynika z tego, że rytm dobowy nie może być uważany za zmienną mogącą mieć wpływ na wyniki badania metodą AgNOR neuronów DRN, chociaż jego wpływ na aktywność dobową tych neuronów jest dobrze udokumentowany [133, 129]. Z tego samego powodu można w interpretacji wyników badań metodą AgNOR pominąć wpływ mechanizmu śmierci.

Przedstawiane zmiany kariometryczne wskazują więc na obniżoną aktywność syntezy w neuronach DRN u samobójców z depresją. Wyniki te są zgodne z licznymi doniesieniami dotyczącymi obniżonej ośrodkowej aktywności serotoninericznej w samobójstwie i depresji [7, 8, 137, 169, 222, 249]. Co więcej, ta obniżona aktywność wydaje się być szczególnie zaznaczona u samobójców z wysokim poziomem autoagresywności, co jest zgodne z poprzednimi doniesieniami na temat osób podejmujących próby samobójcze, cechujące się nasilonymi samouszkodzeniami [171, 172].

Neurony zaopatrywane przez włókna serotoninericzne mogą stymulować wzrost neuronów, będących źródłem tych włókien; proces wzrostu neuronów serotoninericznych znajduje się także pod kontrolą ich własnego przekaźnika a uczestniczą w nim receptory serotoninericzne z grupy 5-HT1 i astrocyty [129, 133, 248]. Stwierdzono zmniejszoną ekspresję genów receptora 5-HT1A i transportera serotoninowego (5-HTT) w DRN ofiar samobójstwa, co wskazywało na obniżoną syntezę białek ważnych dla autoregulacji aktywności serotoninericznej [9]. Jednakże występują także odmienne doniesienia [35, 250], co może częściowo wynikać z różnic lokalizacyjnych analizowanych regionów DRN [8]. Zwiększona ekspresja genu presynaptycznego autoreceptora hamującego 5-HT1A w DRN w depresji i samobójstwie mogłaby częściowo tłumaczyć obniżoną aktywność serotoninericzną [4, 156]. Zwiększona immunoreaktywność kortykoliberyny (ang. *corticotropin-releasing hormone*, CRH) stwierdzona w regionie kaudalnym DRN u samobójców płci męskiej z rozpoznaną depresją [15] może także pośrednio wskazywać na zaburzenia aktywności serotoninericznej. Wykazano bowiem wpływ CRH na neurony serotoninericzne DRN, zależny od jego stężenia i lokalizacji neuronu [143].

Ponieważ DRN jest źródłem unerwienia serotoninericznego PFC, obniżona immunoreaktywność 5-HTT jako markera zakończeń serotoninericznych w regionach PFC może być spowodowana obniżoną aktywnością syntezy w DRN [8, 16, 170]. Z drugiej strony, niezaburzona czy wręcz zwiększona ekspresja genu neuronalnej izoforny hydroksylazy tryptofanowej (enzymu kluczowego w syntezie serotoniny w OUN) w DRN samobójców może odzwierciedlać odpowiedź homeostaticzną na obniżenie synaptycz-

nego przekąźnictwa serotonergicznego [18, 33, 42-44, 260]. Przytoczone dane na temat zróżnicowanej ekspresji genów molekularnych komponent układu serotonergicznego wskazują na raczej częściowo niż globalnie obniżoną syntezę białka w neuronach DRN w procesach prowadzących do samobójstwa.

Dobrze ustalona samohamująca funkcja receptorów somatodendrycznych 5HT1A dominuje w pierwszych tygodniach leczenia przy pomocy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny. W konsekwencji tego występuje przejściowy spadek czynności bioelektrycznej neuronów serotonergiczných [4, 248]. Zjawisko to mogło być bardziej nasilone u badanych samobójców w porównaniu z innymi chorymi z powodu wyższych dawek leków przeciwdepresyjnych przyjmowanych w okresie bezpośrednio przed zgonem. Ustalenie to odpowiada doniesieniom na temat zwiększonego ryzyka samobójstwa we wczesnym okresie leczenia przeciwdepresyjnego w pewnej grupie chorych z depresją [123, 126]. Z drugiej strony, leki psychotropowe przyjmowane przez dłuższy czas (90 dni przed śmiercią) wydają się wywierać pozytywny, jednak niewystarczający wpływ na przypuszczalnie niekorzystne zmiany w neuronach DRN u tych chorych, którzy popełniają samobójstwo.

Niezależnie od znaczenia dla czynności DRN, jakie posiadają zaobserwowane zmiany parametrów AgNOR można sądzić, że w istocie są one specyficzne dla procesów prowadzących do samobójstwa u chorych z depresją. Uzyskane wyniki wskazują na obniżanie się aktywności neuronów DRN wraz z poziomem autoagresywności. Nie wykazano, aby był to efekt przyjmowanych leków ani aby leki te przeciwdziałały jemu w istotny sposób. Nie stwierdzono także, aby procesy pośmiertne w rozpatrywanym przedziale czasowym wpływały na wartość parametrów AgNOR w DRN.

2. *Badania kariometryczne neuronów piramidowych warstw III i V kory przedniej części zakrętu obręczy*

Uzyskane wyniki wskazują na spadek wielkości parametrów AgNOR w grzbietowej części AC po stronie lewej i brzusznej części AC po stronie prawej u chorych z depresją w porównaniu z osobnikami kontrolnymi. Jednakże wyniki dotyczące prawej półkuli powinny być interpretowane w sposób ostrożny, ponieważ niewielka różnica wartości dotyczyła tylko jednego parametru (liczby AgNOR) bez jakichkolwiek różnic w zakresie parametrów pozostałych. Zachowanie samobójcze z kolei było powiązane z obniżoną wartością wskaźnika AgNOR. Efekt ten, ograniczony do lewej półkuli, był bardziej wyraźny i rozprzestrzeniony niż zmiany spowodowane obustronnie przez depresję. Choć stwierdzono występowanie znamienych różnic pomiędzy porównywanymi grupami w zakresie wieku w chwili zgonu oraz w momencie wystąpienia zaburzenia afektywnego, zmienne te nie wykazywały korelacji z którymkolwiek z parametrów AgNOR w badanych regionach. Tak więc nie występowała konieczność, aby poddawać je ocenie w analizie kowariancji jako zmienne współzależne.

Zgodnie z wiedzą autora, jest to pierwsze badanie metodą AgNOR dotyczące AC i jak już wspomniano, jedno z bardzo nielicznych studiów, wykorzystujących tą metodę do badania zaburzeń psychicznych człowieka [33, 108, 109, 163]. Pacjenci z chorobą Alzheimera i osobnicy starsi wykazywali w porównaniu z młodymi osobnikami kontrolnymi zmniejszenie obszaru AgNOR, co przemawiało za związanym z wiekiem spadkiem aktywności transkrypcyjnej rDNA [163]. Wyniki te są do pewnego stopnia zgodne

z uzyskanymi przez autora w AC, szczególnie u samobójców (tabela 7). Z drugiej strony, jak już podkreślano, od dawna znane są badania kariometryczne struktur OUN innych niż DRN i obszary PFC, przeprowadzane przy użyciu metod wysrebrzania w różnych modelach zwierzęcych [21, 101-104, 107, 186, 225, 229, 236, 242, 245, 265]. Badania te wykazały w sposób niewątpliwy dodatnią korelację pomiędzy wielkością jądra komórkowego i aktywnością neuronalną. Jednakże wzajemna zależność pomiędzy wielkością jąderka i tą aktywnością nie została już potwierdzona tak jednoznacznie. Badania własne wykazały dodatnią korelację pomiędzy wielkością elementów AgNOR (będących synonimem jąderek) a stosowanymi lekami psychotropowymi. Wynik ten przemawia za związkiem pomiędzy wielkością jąderka a aktywnością neuronalną, ponieważ pogląd na wzrost aktywności syntetycznej neuronów pod wpływem tych leków jest ugruntowany [132, 166, 183, 197]. Jak już podano, zmiany wielkości i liczby elementów AgNOR w komórkach nie ulegających podziałowi (poza komórkami OUN) uznano za wyznacznik aktywności syntezy komórkowej białka pod warunkiem, że jej poziom był zwiększony przez dłuższy okres czasu (tygodnie – miesiące) [72, 136, 167, 237]. To samo sugerowano w odniesieniu do neuronów [186]. Jednakże zmiany wielkości elementów AgNOR nie mogą być jednoznacznie interpretowane jako wykładnik aktywności syntezy białka w komórce, ponieważ ciągle brakuje wyraźnych dowodów biochemicznych na poparcie tej sugestii.

W świetle przytoczonych publikacji, wykazane przez autora zmiany parametrów AgNOR wskazują, że w depresji występuje obniżona aktywność neuronów piramidowych warstwy III w lewej ACd i najprawdopodobniej także w prawej ACv. Neurony te jako ontogenetycznie młodsze od neuronów piramidowych głębszych warstw kory ulegają większemu wpływowi czynników środowiskowych [39, 226]. W przeciwieństwie do depresji, wpływ procesów prowadzących do samobójstwa był rozlany i ograniczony do strony lewej. Uzyskane wyniki podkreśliły zaburzenia funkcji neuronów warstwy V ACv u samobójców z depresją, co pozwala przypuszczać, że czynnik wywołujący je pojawia się we wcześniejszej fazie ontogenezy.

Neurony te są bardziej zaangażowane w przeciwdziałanie zaburzeniom czynnościowym struktur podkorowych, krytycznym dla powstawania zaburzeń afektywnych [96, 97, 184, 191, 226]. Dodatnia korelacja pomiędzy dawką leków przeciwdepresyjnych a wskaźnikiem AgNOR stwierdzona u nie-samobójców w porównaniu z samobójcami przemawia za tym, że obniżenie tego parametru rzeczywiście odzwierciedla odporną na leczenie zmianę patologiczną, powiązaną z samobójstwem. Jednakże szczegółowy charakter zależności pomiędzy tym parametrem i czynnością neuronów piramidowych AC pozostaje niejasny i wymaga wyjaśnienia w przyszłych badaniach.

Wyniki wskazujące na zaburzoną czynność neuronów piramidowych w depresji i samobójstwie są w pewnym zakresie zgodne z danymi uzyskanymi we wcześniejszych badaniach obrazowych i pośmiertnych [45, 62, 84]. W zaburzeniach afektywnych ustalone zostało zmniejszenie gęstości komórek glejowych w obu częściach AC [65, 256]. Czynnikiem wzrostowy neuronów pochodzący z linii komórek glejowych (ang. *glial-cell-line-derived neurotrophic factor*, GDNF) i pokrewne jemu czynniki wzrostowe regulują czynności neuronu związane z jego aktywnością syntetyczną [243]. W MDD wielkość ciał neuronów piramidowych ACd jest zmniejszona [65]. Ponieważ wiąże się ona z objętością i aktywnością aksonów i dendrytów, mniejsze ciała neuronów mogą pośrednio wskazywać również na zmiany w obrębie ich wypustek i zakończeń synaptycznych [122]. Na potwierdzenie tego, w zaburzeniach afektywnych stwierdzono obniżenie poziomu markerów synaptycznych w ACv [45, 89]. Cytowane doniesienia wskazywały na

zaburzenia czynności regionów AC z przewagą strony lewej, czemu odpowiadają wyniki autora. Inne dane neurobiologiczne wskazują, że pozytywny afekt może być powiązany z lewą półkulą mózgu a negatywny z prawą [202]. Uszkodzenia brzuszno-przyśrodkowej części PFC po stronie lewej powodują odhamowanie tej części PFC po stronie prawej, co w efekcie daje pobudzenie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA-axis) stwierdzane w zwierzęcych modelach doświadczalnych i obserwowane w depresji [82, 83, 253]. Z drugiej strony, dysregulacja osi HPA z przewlekłym podwyższonym w jej konsekwencji poziomem kortykosteroidów w surowicy krwi oraz z zaburzeniami w poziomach receptorów mineralo- i glikokortykoidowych struktur mózgu ma odgrywać rolę w zmianach morfologicznych PFC, obserwowanych w zaburzeniach afektywnych [181, 182, 226, 252].

W badaniach obrazowych mózgu chorych z MDD w porównaniu z grupą kontrolną obserwowano w sposób powtarzalny zwiększoną aktywność części afektywnej AC i obszarów OFC [5, 81-83]. Sugerowano, że nadmierna aktywność okolic PFC ważnych dla regulacji emocji może odzwierciedlać zwiększoną ich wrażliwość na konflikt afektywny [71]. Jednak ta regionalnie wzmożona aktywność AC ma stanowić zjawisko patologicznej adaptacji, właściwej dla dwóch podgrup pacjentów, tj. reagujących na leczenie (efekt widoczny przed jego wdrożeniem) [178, 179, 215], jak również najcięższych przypadków odpornych na terapię [177]. Ta druga grupa może być porównywalna z samobójcami z depresją w przedstawianych badaniach własnych. Z drugiej strony, podstawowy poziom metabolizmu mierzony przy pomocy pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) jest obniżony w obszarach afektywnych AC chorych z depresją a hiperaktywacja jest efektem wykazanim po komputerowej korekcie, uwzględniającej regionalne zmniejszenie objętości kory [81-83]. Także inny rodzaj badań obrazowych mózgu chorych z depresją z zastosowaniem spektroskopii protonowego rezonansu magnetycznego do oznaczania stężenia glutaminianu w strukturach mózgu *in vivo* wskazuje na zmniejszoną aktywność obszarów AC ważnych emocjonalnie [13, 214]. Podczas gdy przytoczone badania wykazały obniżony poziom tego aminokwasu w MDD, w modelach zwierzęcych wykazano jego podwyższony poziom w homogenatach i płynie pozakomórkowym PFC w następstwie krótkotrwałej, awersyjnej stymulacji [112, 192]. Natomiast poziom glutaminianu, będącego jednocześnie najważniejszym pobudzającym przekąźnikiem OUN, był obniżony wskutek przewlekłej stymulacji o awersyjnym charakterze [192]. Zestawienie tych wyników z wyżej cytowanymi [13, 214] może dodatkowo przemawiać za związkiem pomiędzy przewlekłym stresem i depresją.

Dane neurobiologiczne wskazują na powiązanie zachowań samobójczych z zaburzeniami przekąźnictwa serotonergicznego w AC [8, 57, 92, 170, 188, 204]. U samobójców z depresją stwierdzono w badaniach pośmiertnych ACv obniżoną ekspresję presynaptyczną transportera serotoninowego [8, 170], która występowała także w grzbietowo-bocznej części PFC [15] i była najbardziej wyrażona w głębokich warstwach kory. Badania pilotażowe przeprowadzone w mniejszych grupach [33, 109] jak również przedstawiane w rozprawie badania zbiorcze wykazały u tych chorych zaburzenia parametrów AgNOR w neuronach DRN, które zapewniają większość unerwienia serotonergicznego AC [263, 276]. U depresyjnych ofiar samobójstwa może występować wzajemne powiązanie pomiędzy zaburzeniami układu serotonergicznego i czynnością neuronów AC z udziałem obniżonej ekspresji neurotrofin [88, 113, 114, 133, 154, 272-274]. Ponadto w PFC samobójców z depresją stwierdzono zwiększoną ekspresję genu receptora serotonergicznego 5HT2A [8, 92], która może być następstwem przewlekłego podwyższonego poziomu kortykosteroidów [87]. Wykazano upośledzający plastyczność

synaptyczną efekt aktywacji tego receptora w połączeniu z aktywacją glutaminianergicznego receptora N-metylo-D-asparaginianowego [183]. Zaburzenia unerwienia serotoninergicznego zostały stwierdzone w AC, OFC, zespole hipokampa i w podkorowych strukturach limbicznych w modelach zwierzęcych wczesnorozwojowej, społecznej deprywacji emocjonalnej, która jest uważana za jeden z czynników usposabiających do depresji u człowieka [50, 110, 219]. Dane te wskazują na występowanie zaburzeń serotoninergicznych w neuronalnej sieci limbicznej, posiadającej decydujące znaczenie dla powstawania emocji także u człowieka [71].

Przytoczone informacje z piśmiennictwa i wyniki badań własnych AC przemawiają za odrębnością procesów prowadzących do samobójstwa u chorych z depresją. Przy pomocy barwienia metodą AgNOR wykazano odmienne dla samobójców i wszystkich chorych z depresją, odrębnie umiejscowione zmiany, wskazujące na obniżoną aktywność neuronów piramidowych AC. Nie stwierdzono, aby stanowiły one efekt przyjmowanych leków ani aby leki te przeciwdziałały zmianie patologicznej charakterystycznej dla samobójców.

3. *Badania kariometryczne neuronów piramidowych warstw III i V kory oczołowo-czołowej*

Uzyskane wyniki wskazują na występujące u chorych z depresją zaburzenia aktywności neuronów piramidowych warstwy V OFC obu półkul i warstwy III po stronie lewej. Dla chorych tych były statystycznie znamienne: powiększenie obszaru AgNOR w neuronach piramidowych warstwy V po stronie prawej, podwyższony wskaźnik AgNOR (będący następstwem powiększenia obszaru AgNOR) wykazany w warstwie III po stronie prawej oraz zwiększona liczba AgNOR (także z towarzyszącym powiększeniem obszaru AgNOR) wykazana w warstwie V po stronie lewej (tabela 8). Nie stwierdzono, aby efekty te były specyficzne dla samobójców bądź nie-samobójców. Jedynie dla grupy samobójców właściwy był natomiast brak znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy wartościami wskaźnika AgNOR w neuronach warstwy V po stronie prawej w porównaniu z lewą (tabela 9).

Silna i statystycznie znamienna, ujemna korelacja pomiędzy dawkami leków przeciwdepresyjnych i powierzchnią AgNOR, stwierdzona w neuronach piramidowych warstwy V prawej OFC (tabela 10) potwierdza przypuszczenie, że obserwowany wzrost tego parametru jest faktycznie związany z depresją jako stanem chorobowym a nie z działaniem leków psychotropowych. Ponieważ ta ujemna korelacja charakteryzowała jedynie chorych nie-samobójców można przyjąć, że leki przeciwdepresyjne posiadały większą skuteczność terapeutyczną w odniesieniu do tej grupy. Z drugiej strony nie można wykluczyć wpływu farmakoterapii w sytuacjach, gdy nie stwierdzono różnic parametrów AgNOR pomiędzy porównywanymi grupami a występowały korelacje pomiędzy tymi parametrami i dawkami leków psychotropowych.

Chociaż stwierdzono znamienne różnice w zakresie innych zmiennych wklajających, w porównywanych grupach nie zaobserwowano zgodnych ze sobą korelacji pomiędzy tymi zmiennymi a jakimkolwiek z parametrów AgNOR, który wykazał różnice. Tak więc omawiane zmienne (tj. wiek w chwili śmierci i w momencie wystąpienia zaburzenia, czas trwania zaburzenia oraz czas utrwalania mózgu) nie musiały być analizowane jako zmienne współzależne, oddziałujące na wyniki analizy statystycznej parametrów

AgNOR. Jest to równoznaczne ze stwierdzeniem, że nie musiały one być poddawane analizie kowariancji.

Zgodnie z wiedzą autora, jest to pierwsze studium badawcze OFC człowieka przeprowadzone metodą AgNOR. Przedstawione wcześniej badania neuronów piramidowych AC wskazują na możliwość występowania u chorych z depresją regionalnie zróżnicowanych zaburzeń czynności tych neuronów, odrębnych dla procesów prowadzących do samobójstwa [108].

Cytowane obszernie w odniesieniu do DRN i AC dane z piśmiennictwa wskazywały na korelację pomiędzy wielkością jądra komórkowego oraz obszaru AgNOR a aktywnością neuronalną [21, 101-104, 107, 186, 225, 229, 236, 242, 245, 265]. Zwrócono także uwagę na brak możliwości jednoznacznej interpretacji zmiany wielkości i liczby elementów AgNOR jako wyznacznika aktywności komórkowej syntezy białka [72, 136, 167, 186, 237]. Zwiększony obszar AgNOR przy braku istotnych zmian wielkości jądra komórkowego hipotetycznie interpretowano jako wyraz próby utrzymywania przez jądro aktywności syntetycznej, wykazującej tendencję spadkową w zaburzonej neuronie [103, 104]. Efekt ten wykazano w warstwie III OFC po stronie prawej a w warstwie V obustronnie (tabela 8). Jednak stwierdzona znamienność statystyczna dotyczyła różnych parametrów: powierzchni, liczby i wskaźnika AgNOR. Neurobiologiczne znaczenie tej różnorodności pozostaje otwartą kwestią, której wyjaśnienie wymaga dalszych badań.

Będąc ontogenetycznie starszymi niż neurony warstw II/III, komórki piramidowe warstw V/VI OFC nie ulegają tak silnemu wpływowi czynników zewnętrznych. Są one natomiast bardziej zaangażowane w równoważenie zaburzonej aktywności tych struktur podkorowych, które posiadają decydujące znaczenie dla zaburzeń nastroju [71]. Rozważając hipotetycznie, zaangażowanie to mogłoby tłumaczyć, dlaczego efekt był obserwowany w warstwie V po obu stronach [96, 97, 184, 191, 226]. Oprócz powiększonego obszaru AgNOR, u chorych z depresją po stronie prawej stwierdzono także powiększenie jądra komórkowego w neuronach warstwy V. Chociaż nie była to zmiana statystycznie znamienna w odniesieniu do grupy kontrolnej, powodowała ona brak właściwej osobnikom kontrolnym różnicy wartości tego parametru pomiędzy neuronami warstwy V i III po stronie prawej oraz pomiędzy neuronami warstwy V po obu stronach. W sposób specyficzny jedynie dla samobójców występował względny wzrost wskaźnika AgNOR neuronów warstwy V po stronie prawej w odniesieniu do lewej (niezamienny, tabela 9). Ponieważ u chorych z depresją także neurony warstwy III wykazywały zmiany w prawej OFC można przyjąć, że zaburzenia aktywności neuronów piramidowych dominowały po stronie prawej. W świetle cytowanych uprzednio doniesień, najprawdopodobniej polegały one na patologicznie podwyższonej aktywności tych neuronów.

Jak już wspomniano w części pracy dotyczącej AC, znane są wyniki badań neurobiologicznych wskazujących, że pozytywny afekt może być przypisany półkuli lewej a negatywny prawej [37, 38, 121, 157, 201, 202, 208]. W myśl cytowanych już danych z piśmiennictwa, przewaga brzuszno-przyśrodkowych obszarów PFC powoduje patologiczne pobudzenie osi HPA [82, 83, 252, 253], które ma z kolei odgrywać rolę w powstawaniu zmian morfologicznych, obserwowanych w tych obszarach korowych [181, 182, 226, 252].

U chorych z MDD zostało stwierdzone w badaniach pośmiertnych przez Rajkowską i współpracowników [227] niewielkiego stopnia, lecz statystycznie znamienne zmniejszenie ciał neuronów głębszych warstw (V-VI) tylnej części OFC w otoczeniu bruzdy oczodołowo-czołowej po stronie lewej. Jednakże badana grupa chorych składała się głównie z ofiar samobójstwa, tak więc trudno ocenić, czy zaobserwowany efekt jest

właściwy dla wszystkich chorych z depresją. Wielkość ciała neuronu, powiązana z wielkością jego jądra [229] stanowi pośrednio wyraz zarówno wielkości jak i aktywności wypustek neuronalnych: aksonów i dendrytów [122]. Tak więc parametr ten może być wyznacznikiem zmian zachodzących w kompartmentach neuronalnych i ich synapsach [122]. W następstwie zmniejszenia neuronów może dojść do spadku objętości istoty szarej OFC, co stwierdzono badaniami obrazowymi metodą rezonansu magnetycznego u chorych z BD [164, 201]. Jednakże efekt ten nie był obserwowany w sposób stały [162]. W cytowanych badaniach [201, 227] zmniejszenie neuronów i spadek objętości OFC wskazywały na obniżenie aktywności OFC u chorych z epizodem depresyjnym zarówno w przebiegu MDD jak i BD ale badane obszary były zlokalizowane bardziej do przodu lub do boku w odniesieniu do badań własnych. Z drugiej strony, badania metodą czynnościowego rezonansu magnetycznego u zdrowych psychicznie osobników wykazały szybką i silną aktywację przyśrodkowej części OFC podczas doświadczania emocji negatywnych [200]. Sugerowano, że aktywacja OFC podczas epizodu depresyjnego może odzwierciedlać próbę przełamania negatywnego, autodeprecjonującego myślenia i anhedonii [83], przypuszczalnie związanych z zaburzeniami monoaminergicznymi [257, 269]. Z drugiej strony, pacjenci z najcięższymi objawami depresji mają wykazywać relatywnie najmniejszą aktywność OFC, na co wskazują badania metodą PET [83].

Podobnie jak w odniesieniu do AC, znane są dowody neurobiologiczne wiążące depresję i samobójstwo z zaburzeniami komponent układu serotonergicznego w OFC [8, 92, 170]. Zarówno w AC jak i OFC stwierdzono u samobójców z depresją zwiększoną ekspresję genu receptora serotonergicznego 5HT_{2A} [8, 92], która mogła być następstwem przewlekle podwyższonego poziomu kortykosterydów [87]. Aktywacja tego receptora wraz z aktywacją glutaminianergicznego receptora N-metylo-D-asparaginianowego wywiera efekt upośledzający neuronalną aktywność syntetyczną [183]. Jednakże badania własne nie wskazują w sposób jednoznaczny na obniżoną aktywność neuronów piramidowych OFC u samobójców z depresją. Stwierdzone jedynie w tej grupie chorych względne zmniejszenie wskaźnika AgNOR w warstwie V po stronie lewej w odniesieniu do prawej nie jest dowodem dostatecznie przekonującym w tym zakresie. Brak wyraźnych zmian właściwych dla samobójców może w sposób hipotetyczny wiązać się z farmakoterapią, ponieważ zwiększona aktywność syntetyczna neuronów pod wpływem leków psychotropowych została ustalona [183, 197]. Wyrazem tego mechanizmu może być korelacja dodatnia pomiędzy wielkością jądra komórkowego a dawką leków przeciwdepresyjnych stwierdzona u samobójców w neuronach warstwy V po stronie prawej (tabela 10). Z drugiej strony, zwiększone unerwienie serotonergiczne zostało wykazane w OFC i innych strukturach limbicznych w zwierzęcym modelu wczesnorozwojowej deprywacji społecznej, będącej jednym z czynników usposabiających do rozwoju depresji u człowieka [50, 110, 219]. Stwierdzony w OFC wzrost parametrów AgNOR u chorych z depresją jest zgodny z wynikami uzyskanymi w tym modelu z uwagi na ustaloną funkcję neurotroficzną serotoniny, pobudzającej aktywność syntezy w neuronach [113, 133].

Podsumowując, w oparciu o barwienie metodą AgNOR wykazano zaburzenia aktywności neuronów piramidowych przyśrodkowej OFC, w głównej mierze wspólne dla wszystkich chorych z depresją, z zaznaczeniem pewnej odrębności samobójców. Nie wykazano, aby był to efekt przyjmowanych leków; leki te przeciwdziałały mu ale go nie niwelowały.

W sposób interesujący zmiany parametrów AgNOR kształtowały się odmiennie w obrębie AC i OFC, wskazując w pierwszym regionie na patologiczne obniżenie a w drugim na wzrost aktywności badanych neuronów. Ponadto zmiany w AC wykazywały w większej mierze związek z samobójstwem. Wskazuje to, że postulowana odrębność czynnościowa obu tych limbicznych obszarów PFC może manifestować się także w warunkach chorobowych, co sugerują również inne badania mózgu.

4. *Badania liczby neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym*

Przeprowadzone badania wykazały, że liczba TH-reaktywnych neuronów LC jest podwyższona u samobójców z rozpoznany epizodem depresyjnym, wykazujących nasilony poziom autoagresywności. Efekt ten był specyficzny dla strony prawej. Z drugiej strony, nie stwierdzono znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy wszystkimi osobnikami z depresją i kontrolnymi oraz pomiędzy samobójcami, nie-samobójcami i osobnikami kontrolnymi. Spośród potencjalnie współzależnych zmiennych demograficznych, klinicznych i metodologicznych, jedynie wiek w chwili zgonu i w momencie wystąpienia zaburzenia afektywnego różniły się znamienne pomiędzy porównywanymi grupami. Jednak nie stwierdzono korelacji pomiędzy nimi oraz liczbą neuronów TH-reaktywnych, tak więc nie występowały zmienne, które należałoby traktować jako zmienne współzależne. Ponadto przyjęte procedury nieparametryczne wykluczały możliwość zastosowania analizy kowariancji, uwzględniającej podane zmienne. Szczególnie należy podkreślić, że nie stwierdzono zaburzającego wpływu czasu po śmierci (tym samym autolizy) i czasu utrwalania mózgu - jako zmiennych o charakterze metodologicznym oraz biegunowości zaburzenia afektywnego, czynników stresujących działających w dłuższym okresie czasu przed śmiercią czy statusu palenia tytoniu - jako zmiennych o charakterze klinicznym. Palenie papierosów powoduje bowiem spadek białka TH w neuronach LC [145]. Co więcej, różnica pomiędzy samobójcami agresywnymi i nie-agresywnymi nie może być przypisywana artefaktowi związanemu z przyczyną śmierci (tj. z przedawkowaniem leków w drugiej podgrupie), ponieważ nie znane są leki, które mogłyby zmniejszać poziom TH w LC bezpośrednio po ich podaniu [198, 205, 240, 268]. Ponadto żaden z chorych nie przyjmował atypowych neuroleptyków czy stabilizatorów nastroju, które podwyższają poziom TH wskutek przewlekłego stosowania [240, 268] ani nie był leczony elektrowstrząsami, mającymi podobne działanie [47, 174]. Kolejnym czynnikiem, którego potencjalnie wnikający wpływ należy rozważyć jest mechanizm śmierci i związana z nim bardziej nasilona ośrodkowa reakcja stresowa w podgrupie samobójców agresywnych. LC należy bowiem do kluczowych komponentów tej reakcji [29]. Dane eksperymentalne nie wskazują jednak, aby jednorazowy, krótkotrwały (tj. kilku- bądź kilkunastominutowy), silny stres działający bezpośrednio przed śmiercią mógł powodować równoczesne z nim i uchwytne *post mortem* podwyższenie poziomu TH w neuronach LC [58, 74, 124, 180, 207]. Podsumowując, efektu obserwowanego w podgrupie samobójców agresywnych nie należy wiązać z wymienionymi wyżej czynnikami.

Podwyższona liczba TH-reaktywnych neuronów LC u samobójców agresywnych odpowiada wynikom uzyskanym przez Ordway i współpracowników [206], którzy opisywali wzrost stężenia białka TH w LC samobójców w porównaniu z grupą kontrolną. Jest ona zgodna także z danymi Zhu i współpracowników [281], którzy wykazali wyższą

TH-immunoreaktywność w LC chorych z MDD. Większość samobójców w pierwszym z tych studiów badawczych i chorych z depresją w drugim stanowili samobójcy z wysokim poziomem autoagresywności. Natomiast przedstawiane wyniki własne nie odpowiadają stwierdzonej u samobójców przez Biegon i Fieldust [31] obniżonej TH-immunoreaktywności w LC. Te odmiennie wyniki mogą być tłumaczone zmiennością osobniczą stężenia białka enzymatycznego, różnicami pomiędzy badanymi grupami w zakresie: płci [17], pochodzenia etnicznego [267], szczegółowego rozpoznania psychiatrycznego, poziomu autoagresywności w działaniu samobójczym jak też wpływem farmakoterapii i odrębnościami metodologicznymi (pomiar intensywności barwienia neuronów a nie pomiar ich liczby).

Wyniki poprzednich badań wskazują, że zróżnicowana liczba neuronów TH-reaktywnych nie jest następstwem różnic w całkowitej liczbie neuronów LC zdolnych do syntezy NA ale raczej aktualnej zawartości TH w tych neuronach [10, 24, 40]. Może to z kolei sugerować, że liczba TH-reaktywnych neuronów w LC stanowi zależny od stanu psychicznego marker neurobiologiczny (ang. *state-dependent marker*) nasilonej autoagresywności u samobójców depresyjnych, nie będąc jednocześnie markerem tych zaburzeń (ang. *trait-dependent marker*). Wydaje się być przekonującą hipoteza, że ryzyko agresywnego samobójstwa jest ograniczone podczas epizodu depresyjnego do pewnych ram czasowych, określonych przez występowanie zaburzeń noradrenergicznych [144, 212, 270]. Jednakże badania wskazujące na występowanie związku pomiędzy poszczególnymi allelami genu TH i zachowaniem samobójczym [210] mogą wskazywać na ten gen jako potencjalny marker podwyższonego ryzyka samobójstwa, niezależnego od wahań czynnościowych układu noradrenergicznego.

Uwzględniając fakt, że TH jest kluczowym enzymem w syntezie NA, przedstawiane wyniki mogłyby wskazywać na zwiększoną produkcję tego przekąźnika i w konsekwencji na nasilone przekąźnictwo noradrenergiczne u tych chorych z epizodem depresyjnym, którzy są najbardziej narażeni na zachowania autoagresywne. Interpretacja ta byłaby zgodna z licznymi danymi doświadczalnymi uzyskanymi w modelach zwierzęcych stresu i agresji (przegląd w: [29, 120]). Jednakże pomiędzy liczbą TH-reaktywnych neuronów LC i przekąźnictwem noradrenergicznym nie występuje prosta zależność. Przeciwnie, dane eksperymentalne wskazują, że podwyższony poziom TH w LC może być spowodowany wyczerpaniem rezerwuarów NA w synapsach, któremu towarzyszy obniżone powinowactwo do NA transportera noradrenergicznego w LC [69, 185]. Wyniki badań pośmiertnych LC u samobójców i chorych depresyjnych były zbliżone do wyżej cytowanych a ponadto przypadki samobójstw z wyższym poziomem autoagresywności przeważały w tych badaniach [146, 206, 281]. Obniżone stężenie najważniejszego metabolitu NA, metoksy-4-hydroksyfenyloglikolu, zostało stwierdzone w płynie mózgowo-rdzeniowym i w osoczu chorych z depresją, którzy wykazywali tendencję do działań samobójczych cechujących się wyższym poziomem autoagresywności [2, 264]. Wiele badań połączonych z wyczerpaniem rezerwuarów synaptycznych NA (na przykład pod wpływem rezerpiny) wskazuje, że czynnik ten sam w sobie może spowodować ciężki epizod depresyjny u niektórych osobników [6, 230]. Niezależnie od tego, jakie znaczenie dla przekąźnictwa noradrenergicznego posiadała obserwowana w badaniach własnych podwyższona ekspresja genu TH w LC, efekt ten mógł być spowodowany aktywującym LC działaniem CRH [15, 29, 34, 135, 262].

Ponieważ neurony LC odpowiadają za unerwienie PFC w głównej mierze po tej samej stronie [29], odchylenie stwierdzone w prawym LC koresponduje z przytoczonymi już doniesieniami na temat związku afektu negatywnego z półkulą prawą [37, 121, 157,

201, 202, 208] i patologicznego pobudzenia z odhamowaniem brzuszno-przyśrodkowej części PFC po stronie prawej [253]. Ta sama lateralizacja zaburzeń czynności LC i PFC może więc wynikać z połączeń między nimi.

Występująca u samobójców korelacja ujemna pomiędzy średnią dawką dobową leków przeciwdepresyjnych przyjmowanych w ciągu ostatnich 90 dni przed zgonem i liczbą neuronów TH-reaktywnych może być postrzegana w świetle badań doświadczalnych jako następstwo stosowania tych leków [48, 115, 147, 185, 199, 205, 261]. Jednakże stwierdzone działanie leków przeciwdepresyjnych nie zapobiegało aktowi samobójczemu. Co więcej, u samobójców z depresją w porównaniu z nie-samobójcami stwierdzono tendencję do występowania wyższej dawki leków przeciwdepresyjnych, przyjmowanych na krótko przed zgonem. To niekorzystne zjawisko może być częściowo wytłumaczone działaniem leków przeciwdepresyjnych na układ serotonergiczny, o czym już wspomniano [4, 248]. Jednak pierwsze dni czy tygodnie po wdrożeniu leków przeciwdepresyjnych mogą być generalnie obciążone podwyższonym ryzykiem samobójstwa u części chorych, także wskutek działania na układ noradrenergiczny [123, 126, 195, 254].

Podsumowując, stwierdzono wzrost liczby neuronów TH-reaktywnych u chorych z epizodem depresyjnym, popełniających samobójstwo cechujące się wyższym poziomem autoagresywności. Jednocześnie nie stwierdzono zmian u samobójców mniej autoagresywnych jak również u nie-samobójców oraz u rozpatrywanych łącznie wszystkich chorych w porównaniu z kontrolą. Wyniki te wskazują na zaburzenia czynności LC charakterystyczne dla nasilonej autoagresywności u chorych z depresją. Leki przeciwdepresyjne najprawdopodobniej wpływają na normalizację liczby neuronów TH-reaktywnych w LC, jednakże nie jest to efekt zapobiegający samobójstwu. Ponadto uzyskane wyniki wskazują w sposób niezależny od zmian stwierdzonych w DRN, że poziom autoagresywności może wiązać się z zaburzeniami układów aktywujących pnia mózgu.

5. Badania gęstości neuropilu GABAergicznego w regionach kory przedczołowej i w wybranych strukturach limbicznych płata skroniowego

Wyniki przedstawianych badań wykazały znamienne statystycznie różnice w gęstości neuropilu GAD 65/67-ir pomiędzy samobójcami i nie-samobójcami z depresją oraz osobnikami kontrolnymi obustronnie w obrębie EC, DG i CA1. Jedynie po stronie lewej stwierdzono znamienne różnice pomiędzy analizowanymi grupami w obrębie warstwy V DLC. Nie wykazano znamienych różnic w limbicznych regionach PFC i wzgórza. Jedynie w warstwie III EC po stronie lewej występowała znamienna statystycznie różnica pomiędzy obiema grupami chorych i grupą kontrolną. Jednak w przeciwieństwie do dominującej hipotezy stwierdzono przeważnie większą gęstość neuropilu GAD-ir, przy czym efekt ten był zaakcentowany w szczególny sposób u samobójców. W związku z wyraźną przewagą liczebną w tej grupie samobójców agresywnych (11 z 14), czynnikiem, którego wpływ należy dodatkowo rozważyć jest mechanizm śmierci i związana z nim bardziej nasilona reakcja stresowa. Należy liczyć się z nią zwłaszcza w przypadkach powieszenia (7 z 14), ponieważ asfiksja jest czynnikiem silnie aktywującym ośrodkową reakcję lękową [111], która z kolei prowadzi do aktywacji osi HPA [155]. Wobec zaangażowania hipokampa w hamowanie reakcji stresowej, w którym uczestniczą neurony GABAergiczne [46, 73], ewentualny wpływ stresu związanego z mechanizmem zgonu

należałoby rozważyć szczególnie w odniesieniu do tej struktury. Z danych eksperymentalnych nie wypływają jednak przesłanki do przypuszczenia, aby krótkotrwały (tj. kilkunastominutowy), nawet silny stres działający bezpośrednio przed śmiercią powodował równoczesny z nim i uchwytany *post mortem* wzrost ekspresji genów GAD 65 i 67 w neuronach [46, 73]. Dane te wskazują natomiast, że efekt ów może być obserwowany po czasie dłuższym jak również w następstwie stresu przewlekłego. Rola tego czynnika jest z kolei podkreślana w patogenezie depresji, gdy m.in. dochodzi do utraty przez hipokamp funkcji hamującej oś HPA, co wiąże się z zaburzeniami receptorów gliko- i mineralokortykoidowych w tej strukturze [71, 197, 252]. Nie można więc wykluczyć roli stresu przewlekłego w zmianach obserwowanych w zespole hipokampa.

Warstwa V DLC po stronie lewej była jedynym z badanych obszarów, w którym stwierdzono obniżoną gęstość neuropilu u nie-samobójców w porównaniu z samobójcami i osobnikami kontrolnymi. Efekt ten oraz wyższa wartość badanego parametru, obserwowana w warstwie III EC po stronie lewej stanowiły najprawdopodobniej zmiany specyficzne dla zaburzenia dwubiegunowego, ponieważ prawie wszystkie przypadki (6 z 7) nie-samobójców należały do tej grupy diagnostycznej. Przedstawiane dane wskazują na zaburzenia regulacji układu GABAergicznego u chorych z zaburzeniami afektywnymi i w odniesieniu do DLC są zgodne z wynikami uzyskanymi w badaniach pośmiertnych PFC zarówno u tych chorych [49], jak i schizofreników [3, 158].

Zaburzenia ekspresji genów GAD na poziomie zarówno transkrypcji jak i translacji odnotowano niejednokrotnie u chorych z podanych grup diagnostycznych zaburzeń psychicznych. Poziomy GAD 65- i 67-kDa były znamienne obniżone w mózdku chorych z BD i MDD w porównaniu z kontrolą, jednak nie uwzględniono wpływu samobójstwa [94]. Obniżona gęstość neuronów zawierających mRNA dla GAD 67 została stwierdzona w AC w zaburzeniu dwubiegunowym, jednak nie-samobójcy przeważali w tych badaniach [277]. Podobny skład występował w badaniach Benes i współpracowników [27], którzy stwierdzili obniżoną gęstość zakończeń GAD-ir w PFC, w tym w AC, u schizofreników i w małej grupie (n=5) chorych z epizodem maniakałnym w przebiegu BD. Poziomy mRNA i białka GAD 67 w PFC i w mózdku były znamienne obniżone u schizofreników i chorych z BD bez objawów psychotycznych, natomiast pozostawały niezmiennione u chorych z MDD bez objawów psychotycznych w porównaniu z kontrolą. Ponadto izoforma GAD 65 nie wykazywała zmian pomiędzy porównywanymi grupami [117]. Aktywność GAD była obniżona w kilku regionach mózgu, takich jak kora czołowa, potyliczna i jądra podstawy [209]. Cytowane wyniki są zgodne z wynikami autora w obrębie DLC nie-samobójców, którzy byli prawie wyłącznie chorymi z BD. Jednak badania poprzednie są trudno porównywalne z własnymi z powodu odmienności metodycznych oraz w składzie diagnostycznym grup i w przyczynie śmierci (samobójstwo/inna). Ostatnio stwierdzono specyficzny dla chorych z MDD i BD wzrost gęstości neuronów GAD 65/67 – immunoreaktywnych w OFC oraz specyficzny tylko dla pacjentów z MDD w DLC i w hipokampie. W badanej grupie chorych występowała zrównoważona liczba samobójców i nie-samobójców [32]. Jest to pierwsza praca, w której zwrócono uwagę na możliwość podwyższonej ekspresji genów GAD w zaburzeniach afektywnych, co odpowiada wynikom prezentowanym.

mRNA GAD 65 i 67 jako marker interneuronów GABAergicznym były znamienne obniżone w zespole hipokampa chorych z BD – pierwszy z nich w polu CA2/3 i w DG, drugi w CA4 [125]. Nie stwierdzono natomiast zmian w polu CA1 hipokampa a ponadto w badanej grupie dominowali nie-samobójcy. Molnar ze współpracownikami [194] wykazali brak jakichkolwiek zmian w mRNA GAD 67 w DLC chorych z BD i MDD w

porównaniu z grupą kontrolną. Występowała przy tym tendencja do raczej podwyższonego niż obniżonego poziomu tego mRNA. W odniesieniu do mRNA GAD zmiany podobnie odmienne od powszechnie stwierdzanych wykazano w studium badawczym poświęconym starszym schizofrenikom [80]. W schizofrenii większość przeprowadzonych badań dostarczyła dowody na obniżenie aktywności GABAergiczej w obszarach PFC, lecz nie w zespole hipokampa (przeгляд w: [116, 158]). Dracheva ze współpracownikami [80] wykazali u starszych schizofreników znamienne wzrost w DLC mRNA kodującego obie izoformy GAD. Autorzy ci postulowali, że odchylenia GABAergiczne podlegają w przebiegu schizofrenii znacznym zmianom kształtującym się w ten sposób, że ekspresja genów GAD jest mniejsza we wcześniejszych fazach choroby, lecz zwiększa się w późniejszym okresie życia. Jednak w przedstawianych badaniach własnych zaburzeń afektywnych nie wykryto korelacji pomiędzy gęstością neuropilu GAD-ir i czasem trwania choroby ani wiekiem w chwili zgonu w żadnym z badanych regionów, zarówno u chorych z BD jak i MDD. Rozbieżności pomiędzy poziomem mRNA i białka są znane z innych badań nad depresją [280]. Tak więc wyniki badań dotyczących mRNA GAD powinny być wykorzystywane w sposób ostrożny w interpretacji wyników dotyczących białka GAD.

W badaniach własnych stwierdzono znamienne, ujemne korelacje pomiędzy gęstością neuropilu GABAergicznego a średnią dawką dobową przyjmowanych leków psychotropowych (tabela 13) u samobójców z depresją. Efekt ten przeważał w obszarach, w których nie stwierdzono różnic w gęstości unerwienia GABAergicznego, co wskazywało, że te ujemne wyniki mogły być następstwem działania przyjmowanych leków. Korelacja ujemna pomiędzy dawkami leków psychotropowych a badanym parametrem wskazuje ponadto, że stwierdzona wyższa gęstość neuropilu GAD-ir w istocie odzwierciedla zaburzenie neuronów GABAergicznych powiązane z procesami prowadzącymi do samobójstwa a nie ze stosowanym leczeniem. Co więcej, ten przypuszczalnie pozytywny efekt farmakoterapii na zaburzenia przekąźnictwa GABAergicznego był regionalnie zróżnicowany i nie występował w strukturach zasadniczych dla przyswajania nowych informacji, takich jak kora śródwęchowa, zakręt zębaty i hipokamp [247]. Zakładając hipotetycznie, brak lub niedostateczność tego działania mogłyby tłumaczyć, dlaczego stosowane leczenie było niewystarczalne w zapobieganiu aktowi samobójczemu.

Badania kliniczne wykazały, że leczenie pacjentów depresyjnych przy pomocy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny podwyższa całkowity poziom GABA w korze płatów potylicznych [30, 32, 238], co wskazywało, że leki przeciwdepresyjne posiadają zdolność do zwiększania jego produkcji. Podawanie leków przeciwdepresyjnych u zwierząt zwiększa poziom neurogenyzy, migracji i różnicowania komórek w warstwie subgranularnej DG i w brzeźnej strefie okółokomorowej, tj. w miejscach udokumentowanej doświadczalnie neurogenyzy w mózgu dorosłym [86]. Zgodnie z najnowszymi doniesieniami GABA jest zaangażowany w tych procesach [105]. Przedstawiane studium badawcze dostarcza pośrednie dowody na regulujący aktywność GABAergiczną efekt leków psychotropowych, wśród nich przeciwdepresyjnych. Działając w warunkach chorobowych, leki te mogą powodować wzrost obniżonego i spadek podwyższonego przekąźnictwa GABAergicznego.

Badania ostatnich lat wskazują na potencjalnie szkodliwe następstwa patologicznie wzmożonego unerwienia GABAergicznego, które mogą występować także w strukturach mózgu ludzkiego. To zjawisko patologiczne może przyczyniać się do zaburzeń neurogenyzy w mózgu dorosłym [105], do zaburzeń plastyczności [93] i do paradoksalnie wzmożonej pobudliwości neuronów postsynaptycznych [25, 241]. Ponieważ badania

własne wykazały wzrost unerwienia GABAergicznego głównie w korze śródwęchowej i strukturach zespołu hipokampa, wskazuje to na możliwość zaburzeń przepływu informacji, niezbędnego dla funkcji uczenia się i zapamiętywania [159, 247]. Zaburzenia pamięci deklaratywnej przy niewykazującej większych odchyień pamięci operacyjnej mają stanowić objaw właściwy dla depresji [55]. Zgodnie z obowiązującymi współcześnie poglądami, pierwsza z nich jest zależna od struktur płata skroniowego [247], w których stwierdzono nasilone odchylenia w badaniach własnych a druga od PFC [158], gdzie odchylenia były względnie niewielkie. Tak więc przedstawione wyniki badań pośmiertnych korespondują z objawami klinicznymi występującymi u chorych z depresją nawet wtedy, gdy osiągają oni stan eutyinii [55]. Stwierdzone odchylenie było najbardziej nasilone u samobójców z depresją, co może odpowiadać zaproponowanej wcześniej hipotezie [132]. Stosownie do niej, upośledzone powstawanie nowych treści w świadomości związane z zaburzeniami pamięci deklaratywnej zaostrza epizod depresyjny, ponieważ chory nie potrafi wytworzyć alternatywy wobec negatywistycznych, przymusowo nawracających wspomnień.

Unerwienie GABAergiczne zespołu hipokampa zapewniane przez lokalne interneurony posiada wysoki stopień organizacji [99]. Interneurony te podlegają złożonym regulacjom przez włókna systemów monoaminoergicznych, w tym pochodzące z neuronów jądra grzbietowego szwu i miejsca sinawego [100, 189]. Zaburzenia unerwienia zespołu hipokampa przez włókna serotonergiczne i TH-immunoreaktywne stwierdzono w zwierzęcym modelu wczesnorozwojowej deprivacji społecznej, stanowiącego jeden z modeli powstawania zaburzeń psychicznych u człowieka [110]. Badania przedstawione w rozprawie wykazały odchylenia w obrębie neuronów DRN i LC charakterystyczne dla autoagresywności. Oznacza to, że na obserwowane zmiany gęstości neuropilu GABAergicznego w CA1 i DG mogły wpłynąć zaburzenia funkcji układów serotonergicznego i noradrenergicznego.

Interneurony wykazujące ekspresję wiążącego wapń białka parwalbuminy czy neuropeptydu cholecystokininy zostały sklasyfikowane jako interneurony perisomatyczne (ang. *perisomatic interneurons*) [99]. Z uwagi na lokalizację analizowanych obszarów (warstwa ziarnista DG i warstwa piramidowa CA1), zakończenia aksonalne interneuronów perisomatycznych stanowią najprawdopodobniej większość elementów GAD-ir, ocenianych w przedstawionych badaniach. Połączone z pączkowaniem (ang. *sprouting*) rozprzestrzenianie się tych zakończeń występuje podobnie jak w przypadku interneuronów dendrytowych (ang. *dendritic interneurons*) zarówno w DG jak i w CA1, co stwierdzono w zwierzęcych modelach padaczki [25]. Ogniskowy wzrost unerwienia GABAergicznego stwierdzono także w uległym sklerotyzacji hipokampie chorych na padaczkę [11]. Oprócz pączkowania zakończeń aksonalnych interneuronów perisomatycznych w zespole hipokampa, w padaczce może dochodzić także do zwiększonej ekspresji GAD w tych zakończeniach [25].

Znane są zarówno kliniczne jak i neurobiologiczne dowody przemawiające za tym, że padaczka i depresja to zbliżone stany chorobowe [106, 119, 138]. W obu z nich, wzmożone unerwienie GABAergiczne zespołu hipokampa może być rozpatrywane jako wyraz mechanizmu kompensującego nadmierne pobudzenie, związane z nasilonym w sposób patologiczny przekazywaniem glutaminianergicznym, połączonym z aktywacją osi HPA [11, 25, 183]. Podczas gdy powszechnie uważa się, że pączkowanie zakończeń aksonalnych w sieciach GABAergicznych służy równoważeniu tego pobudzenia, pojawiają się również informacje wskazujące, że może ono również uczestniczyć w powstawaniu patologicznie wzmożonej aktywności neuronalnej [25, 241]. To paradoksalne

zjawisko może posiadać znaczenie etiologiczne zarówno w padaczce jak i depresji, ponieważ interneurony perisomatyczne odgrywają zasadniczą rolę w kształtowaniu zjawisk oscylacji i synchronizacji aktywności sieci neuronalnych [99].

Czynnikiem utrudniającym interpretację wyników badań morfometrycznych dotyczących zarówno depresji jak i padaczki może być zmniejszenie objętości zespołu hipokampa [25, 55], w którym przedstawiane badania wykazały wyraźny wzrost gęstości neuropilu GABAergicznego. Jednak w zaburzeniach afektywnych zmniejszenie objętości stwierdzono również w regionach PFC [82, 164, 201] lecz badania własne nie wykazały w nich wzrostu ocenianego parametru. Przemawia to przeciwko przyjęciu redukcji objętości struktur mózgu jako potencjalnego źródła zaobserwowanych zmian.

Podsumowując, u chorych z depresją stwierdzono odchylenia w gęstości neuropilu GAD-ir, nasilone zwłaszcza w limbicznych obszarach korowych płata skroniowego, w sposób szczególnie zaznaczone u samobójców. Przedstawione wyniki przemawiają za występowaniem w zaburzeniach afektywnych nieprawidłowości w obrębie układu GABAergicznego. Podlegają one przypuszczalnie normalizującemu wpływowi leków psychotropowych, lecz nie jest to efekt zapobiegający samobójstwu.

6. Dyskusja podsumowująca

W myśl coraz powszechniej prezentowanego poglądu, procesy prowadzące do samobójstwa i depresja są ściśle powiązanymi lecz jednocześnie odrębnymi zjawiskami patologicznymi, dotyczącymi złożonych sieci neuronalnych. W obu z nich badania naukowe koncentrują się w głównej mierze na zaburzeniach struktur układu limbicznego oraz modulujących jego czynność układów monoaminergicznych, zwłaszcza serotonergicznego. Stanowiło to także przedmiot badań przedstawianych w pracy.

Wykazały one powiązane ze sobą, ilościowe odchylenia parametrów neurohistologicznych w obrębie komponent układu limbicznego i układów aktywujących pnia mózgu. Odchylenia te wskazywały na upośledzenie czynności struktur ważnych dla kontroli emocji, powstawania pamięci i uczenia się, kształtowania nastroju, odczuwania przyjemności, pobudzenia OUN i regulacji ośrodkowej reakcji na stres. Wymienione procesy ulegają zaburzeniu zarówno w depresji jak i w procesach prowadzących do samobójstwa.

Przeprowadzone badania potwierdzają, że depresji towarzyszą zmiany morfologiczne, uchwytnie w ilościowych badaniach neurohistologicznych struktur OUN. Jednocześnie wskazują one, że procesy prowadzące do samobójstwa można różnicować w oparciu o te badania. Uzyskane wyniki nie wykluczają jednocześnie, że procesy te i depresja posiadają cechy wspólne. Badania wniosły więc przyczynek do lepszego zrozumienia obu tych zjawisk patologicznych. Wśród wyników na szczególną uwagę wydają się zasługiwać te, które wskazują na odrębność zaburzeń limbicznych obszarów kory przedczołowej w depresji, na wzrost przekąźnictwa GABAergicznego w korze śródwchowej i zespole hipokampa w procesach prowadzących do samobójstwa oraz na zaburzenia badanych jąder pnia mózgu, narastające wraz z poziomem autoagresywności u chorych z depresją.

Nie stwierdzono, aby zaobserwowane zmiany ilościowe wybranych parametrów neurohistologicznych były następstwem stosowanych leków psychotropowych. W niektórych sytuacjach wykazano natomiast, że farmakoterapia stosowana przez dłuższy

czas przed zgonem przeciwdziałała tym zmianom. Był to dodatkowy, pośredni argument na potwierdzenie związku stwierdzonych odchyleń ze stanem chorobowym. Z przeprowadzonej analizy mogło ponadto wynikać, że stosowane leki pomimo uchwytne, przeciwdziałającego zmianom chorobowym efektu nie były w stanie zapobiec samobójstwu.

Co szczególnie ważne z punktu widzenia diagnostyki sądowo-lekarskiej, nie wykazano, aby badane parametry ulegały takim wpływom przemian pośmiertnych w rozpatrywanym przedziale czasowym, że mogłyby to rzutować na zaobserwowane różnice. Stwierdzenie to dotyczy także innych czynników, określanych mianem zmiennych wnikających (ang. *confounding variables*), poddanych szczegółowej analizie. Wykazane różnice wartości badanych parametrów osiągnęły w niektórych porównaniach między- i wewnątrzgrupowych wysoką znamienność statystyczną. Podane fakty przemawiałyby za możliwością wybiórczego wprowadzenia neurohistologicznych badań ilościowych OUN do diagnostyki pośmiertnej. Z drugiej jednak strony, wielkość stwierdzonych różnic nie osiągnęła powszechnie przyjętego poziomu diagnostycznego, rozumianego jako średnia \pm dwukrotna wartość odchylenia standardowego. Nie można tego jednak traktować jako argumentu wykluczającego potencjalną możliwość zastosowania niektórych z przedstawionych badań w diagnostyce pośmiertnej. Aby wypowiedzieć się odnośnie takiej możliwości w sposób bardziej jednoznaczny, należałoby przeprowadzić dalsze badania, obejmujące większą liczbę przypadków, także z innych grup zaburzeń psychicznych.

WNIOSKI

1. W depresji występują powiązane ze sobą, ilościowe odchylenia parametrów neurohistologicznych pod postacią zmian kariometrycznych komórek piramidowych przedniej części zakrętu obręczy (AC), kory oczodołowo-czołowej (OFC) i neuronów jądra grzbietowego szwu (DRN), liczby neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym (LC) i gęstości neuropilu GABAergicznego.
2. Odchylenia te wykazują znaczące różnice charakterystyczne dla badanych grup samobójców, co przemawia za tym, że procesy prowadzące do samobójstwa mogą być związane z odrębnymi zmianami w morfologii badanych struktur a tym samym zmiany te mogą być podstawą do późniejszego różnicowania samobójstwa u chorych z depresją.
3. Zmiany parametrów kariometrycznych neuronów piramidowych AC i OFC wskazują na zaburzenia ich aktywności u chorych z depresją, odmienne dla każdej z tych okolic i odrębne dla procesów prowadzących do samobójstwa.
4. Odrębność tych procesów podkreślają badania układu GABAergicznego, w którym jedynie u samobójców obserwuje się znaczące zmiany wskazujące na wzrost przewodności GABAergicznego w zespole hipokampa.
5. Poziom autoagresywności manifestujący się w akcie samobójczym znajduje odzwierciedlenie w zmianach kariometrycznych neuronów DRN i liczby neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym LC, które wskazują na nasilające się wraz z nim zaburzenia aktywności serotoninerdycznej (DRN) i noradrenergicznej (LC).
6. Stosowane leki psychotropowe nie miały wpływu na zaobserwowane zmiany morfologiczne struktur OUN; stwierdzenie to dotyczy także innych zmiennych wnikających, takich jak czas po śmierci i czas utrwalania mózgu, współczynnik obkurczenia mózgu pod wpływem zatapiania w parafinie, płeć, wiek, masa mózgu oraz czas trwania i biegunowość zaburzenia afektywnego.
7. Na obecnym etapie badań nie można wypowiedzieć się w sposób jednoznaczny, czy mogłyby one znaleźć zastosowanie w diagnostyce późniejszej; wymagałoby to przebadania większej liczby przypadków w celu lepszej oceny zmienności badanych parametrów oraz uwzględnienia innych grup zaburzeń psychicznych w celu ustalenia, czy zaobserwowane zmiany stanowią cechę wspólną samobójstwa niezależną od podstawowego zaburzenia.

PIŚMIENICTWO

1. Abe H, Mehraein P, Weis S: A modified NOR-silver impregnation technique for amyloid plaques and neurofibrillary tangles: comparative assessment. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994, 20: 478.
2. Agren H: Symptom patterns in unipolar and bipolar depression correlating with monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid: II. Suicide. *Psychiatry Res.* 1980, 3: 225.
3. Akbarian S, Huang HS: Molecular and cellular mechanisms of altered GAD1/GAD67 expression in schizophrenia and related disorders. *Brain Res Rev.* 2006, 52: 293.
4. Albert PR, Lemonde S: 5-HT1A receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist.* 2004, 10: 575.
5. Anand A, Li Y, Wang Y, Wu J, Gao S, Bukhari L, Mathews VP, Kalnin A, Lowe MJ: Activity and connectivity of brain mood regulating circuit in depression: a functional magnetic resonance study. *Biol Psychiatry.* 2005, 57: 1079.
6. Anand A, Charney DS: Norepinephrine dysfunction in depression. *J Clin Psychiatry.* 2000, 61 Suppl 10: 16.
7. Arango V, Huang YY, Underwood MD, Mann JJ: Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. *J Psychiatr Res.* 2003, 37: 375.
8. Arango V, Underwood MD, Mann JJ: Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Prog Brain Res.* 2002, 136:443.
9. Arango V, Underwood MD, Boldrini M, Tamir H, Kassir SA, Hsiung S, Chen JJ, Mann JJ Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology.* 2001, 25: 892.
10. Arango V, Underwood MD, Mann JJ: Fewer pigmented locus coeruleus neurons in suicide victims: preliminary results. *Biol Psychiatry.* 1996, 39: 112.
11. Arellano JI, Munoz A, Ballesteros-Yanez I, Sola RG, DeFelipe J: Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain.* 2004, 127: 45.
12. Arranz B, Blennow K, Eriksson A, Mansson JE, Marcusson J: Serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic measures in suicide brains. *Biol Psychiatry.* 1997, 41: 1000.
13. Auer DP, Putz B, Kraft E, Lipinski B, Schill J, Holsboer F: Reduced glutamate in the anterior cingulate cortex in depression: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry.* 2000, 47: 305.
14. Aufmkolk M, Voggenreiter G, Majetschak M, Neudeck F, Schmit-Neuerburg KP, Obertacke U: Injuries due to falls from a great height. A comparative analysis of injuries and their outcome following suicide-related and accidental falls. *Unfallchirurg.* 1999, 102: 525.
15. Austin MC, Janosky JE, Murphy HA: Increased corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in monoamine-containing pontine nuclei of depressed suicide men. *Mol Psychiatry.* 2003, 8: 324.

16. Austin MC, Whitehead RE, Edgar CL, Janosky JE, Lewis DA: Localized decrease in serotonin transporter-immunoreactive axons in the prefrontal cortex of depressed subjects committing suicide. *Neuroscience*. 2002, 114: 807.
17. Babstock D, Malsbury CW, Harley CW: The dorsal locus coeruleus is larger in male than in female Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett*. 1997, 224: 157.
18. Bach-Mizrachi H, Underwood MD, Kassir SA, Bakalian MJ, Sibille E, Tamir H, Mann JJ, Arango V: Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacology*. 2006, 31: 814.
19. Bajanowski T, Varro A, Sepulchre MA: Death caused by sharp injury. Criminologic and criminalistic aspects. *Arch Kriminol*. 1991, 187: 65.
20. Baker KG, Halliday GM, Tork I: Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*. 1990, 301: 147.
21. Bandaranayake RC: Karyometric study of hypothalamic neurosecretory neurones under different conditions. *Acta Anat (Basel)*. 1974, 90: 431.
22. Barbas H, Pandya DN: Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 1989, 286: 353.
23. Baumann B, Biela H, Krell D, Agelink MW, Diekmann S, Wurthmann C, Trübner K, Bernstein HG, Danos P, Bogerts B: Circumscribed numerical deficit of dorsal raphe neurons in mood disorders. *Psychol Med*. 2002, 32: 93.
24. Baumann B, Danos P, Diekmann S, Krell D, Biela H, Geretsegger C, Wurthmann C, Bernstein HG, Bogerts B: Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the locus coeruleus is reduced in depressed non-suicidal patients but normal in depressed suicide patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1999, 249: 212.
25. Bausch SB: Axonal sprouting of GABAergic interneurons in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2005, 7: 390.
26. Beasley CL, Zhang ZJ, Patten I, Reynolds GP: Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biol Psychiatry*. 2002, 52: 708.
27. Benes FM, Todtenkopf MS, Logiotatos P, Williams M: Glutamate decarboxylase(65)-immunoreactive terminals in cingulate and prefrontal cortices of schizophrenic and bipolar brain. *J Chem Neuroanat*. 2000, 20: 259.
28. Berghaus G: Mathematic-statistical discrimination between suicide and accident in falls from height. *Z Rechtsmed*. 1978, 80: 273.
29. Berridge CW, Waterhouse BD: The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev*. 2003, 42: 33.
30. Bhagwagar Z, Wylezinska M, Taylor M, Jezard P, Matthews PM, Cowen PJ: Increased brain GABA concentrations following acute administration of a selective serotonin reuptake inhibitor. *Am J Psychiatry*. 2004, 161: 368.
31. Biegon A, Fieldust S: Reduced tyrosine hydroxylase immunoreactivity in locus coeruleus of suicide victims. *Synapse*. 1992, 10: 79.
32. Biela H, Steiner J, Mawrin C, Trübner K, Brisch R, Meyer-Lotz G, Brodhun M, Dobrowolny H, Baumann B, Gos T, Bernstein HG, Bogerts B: Dysregulation of GABAergic neurotransmission in mood disorders: a postmortem study. *Ann N Y Acad Sci*. 2007, 1096: 157.

33. Bielau H, Mawrin C, Krell D, Agelink MW, Trübner K, Davis R, Gos T, Bogerts B, Bernstein HG, Baumann B: Differences in activation of the dorsal raphe nucleus depending on performance of suicide. *Brain Res.* 2005, 1039: 43.
34. Bissette G, Klimek V, Pan J, Stockmeier C, Ordway G: Elevated concentrations of CRF in the locus coeruleus of depressed subjects. *Neuropsychopharmacology.* 2003, 28: 1328.
35. Bligh-Glover W, Kolli TN, Shapiro-Kulnane L, Dilley GE, Friedman L, Balraj E, Rajkowska G, Stockmeier CA: The serotonin transporter in the midbrain of suicide victims with major depression. *Biol Psychiatry.* 2000, 47: 1015.
36. Bloch-Bogusławska E, Wolska E, Engelgardt P, Pufal E: Przypadki samobójstw poagresywnych w materiale Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej w Bydgoszczy. *Arch Med Sąd Krym.* 2006, 56: 169.
37. Blumberg HP, Leung HC, Skudlarski P, Lacadie CM, Fredericks CA, Harris BC, Charney DS, Gore JC, Krystal JH, Peterson BS: A functional magnetic resonance imaging study of bipolar disorder: state- and trait-related dysfunction in ventral prefrontal cortices. *Arch Gen Psychiatry.* 2003, 60: 601.
38. Blumberg HP, Stern E, Ricketts S, Martinez D, de Asis J, White T, Epstein J, Isenberg N, McBride PA, Kemperman I, Emmerich S, Dhawan V, Eidelberg D, Kocsis JH, Silbersweig DA: Rostral and orbital prefrontal cortex dysfunction in the manic state of bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 1999, 156: 1986.
39. Bock J, Gruss M, Becker S, Braun K: Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows. *Cereb Cortex.* 2005, 15: 802.
40. Bogerts B: A brainstem atlas of catecholaminergic neurons in man, using melanin as a natural marker. *J Comp Neurol.* 1981, 197: 63.
41. Bohnert M, Pollak S: Complex suicides-a review of the literature. *Arch Kriminol.* 2004, 213: 138.
42. Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V: More tryptophan hydroxylase in the brainstem dorsal raphe nucleus in depressed suicides. *Brain Res.* 2005, 1041: 19.
43. Bonkale WL, Turecki G, Austin MC: Increased tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the dorsal raphe nucleus of alcohol-dependent, depressed suicide subjects is restricted to the dorsal subnucleus. *Synapse.* 2006, 60: 81.
44. Bonkale WL, Murdock S, Janosky JE, Austin MC: Normal levels of tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the dorsal raphe of depressed suicide victims. *J Neurochem.* 2004, 88: 958.
45. Bouras C, Kovari E, Hof PR, Riederer BM, Giannakopoulos P: Anterior cingulate cortex pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Neuropathol (Berl).* 2001, 102: 373.
46. Bowers G, Cullinan WE, Herman JP: Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci.* 1998, 18: 5938.
47. Brady LS, Lynn AB, Glowa JR, Le DQ, Herkenham M: Repeated electroconvulsive shock produces long-lasting increases in messenger RNA expression of corticotropin-releasing hormone and tyrosine hydroxylase in rat brain. Therapeutic implications. *J Clin Invest.* 1994, 94: 1263.

48. Brady LS, Whitfield HJ, Jr., Fox RJ, Gold PW, Herkenham M: Long-term antidepressant administration alters corticotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase, and mineralocorticoid receptor gene expression in rat brain. Therapeutic implications. *J Clin Invest.* 1991, 87: 831.
49. Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC: GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry.* 2003, 8: 721.
50. Braun K, Lange E, Metzger M, Poeggel G: Maternal separation followed by early social deprivation affects the development of monoaminergic fiber systems in the medial prefrontal cortex of *Octodon degus*. *Neuroscience.* 2000, 95: 309.
51. Brinkmann B: *Ersticken.* W: Brinkmann B, Madea B (wyd.) *Handbuch gerichtliche Medizin.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 2004, s. 699-824.
52. Bush G, Vogt BA, Holmes J, Dale AM, Greve D, Jenike MA, Rosen BR: Dorsal anterior cingulate cortex: A role in reward-based decision making. *PNAS.* 2002, 99: 523.
53. Bush G, Luu P, Posner MI: Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn Sci.* 2000, 4: 215.
54. Büttner A, Weis S, Mall G, Gall C, Eisenmenger W: The diagnostic relevance of cerebral amyloid angiopathy in the setting of forensic pathology - a report of two cases and review of the literature. *Leg Med (Tokyo).* 2001, 3: 141.
55. Campbell S, MacQueen G: The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psychiatry Neurosci.* 2004, 29: 417.
56. Cavalieri B: *Geometria degli Indivisibili.* Unione Tipografica Editrice, Torino. 1966.
57. Cannon DM, Ichise M, Fromm SJ, Nugent AC, Rollis D, Gandhi SK, Klaver JM, Charney DS, Manji HK, Drevets WC: Serotonin transporter binding in bipolar disorder assessed using [¹¹C]DASB and positron emission tomography. *Biol Psychiatry.* 2006, 60: 207.
58. Chang MS, Sved AF, Zigmond MJ, Austin MC: Increased transcription of the tyrosine hydroxylase gene in individual locus coeruleus neurons following foot-shock stress. *Neuroscience.* 2000, 101: 131.
59. Cheetham SC, Crompton MR, Czudek C, Horton RW, Katona CL, Reynolds GP: Serotonin concentrations and turnover in brains of depressed suicides. *Brain Res.* 1989, 502: 332.
60. Choudary PV, Molnar M, Evans SJ, Tomita H, Li JZ, Vawter MP, Myers RM, Bunney WE, Jr., Akil H, Watson SJ, Jones EG: Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005, 102: 15653.
61. Coggeshall RE, Lekan HA: Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol.* 1996, 364: 6.
62. Coryell W, Nopoulos P, Drevets W, Wilson T, Andreasen NC: Subgenual prefrontal cortex volumes in major depressive disorder and schizophrenia: diagnostic specificity and prognostic implications. *Am J Psychiatry.* 2005, 162: 1706.
63. Cotter D, Hudson L, Landau S: Evidence for orbitofrontal pathology in bipolar disorder and major depression, but not in schizophrenia. *Bipolar Disord.* 2005, 7: 358.

64. Cotter D, Landau S, Beasley C, Stevenson R, Chana G, MacMillan L, Everall I: The density and spatial distribution of GABAergic neurons, labelled using calcium binding proteins, in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2002, 51: 377.
65. Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I: Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2001, 58: 545.
66. Craven RM, Priddle TH, Crow TJ, Esiri MM: The locus coeruleus in schizophrenia: a postmortem study of noradrenergic neurones. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2005, 31: 115.
67. Cremniter D, Jamain S, Kollenbach K, Alvarez JC, Lecrubier Y, Gilton A, Jullien P, Lesieur P, Bonnet F, Spreux-Varoquaux O: CSF 5-HIAA levels are lower in impulsive as compared to nonimpulsive violent suicide attempters and control subjects. *Biol Psychiatry*. 1999, 45: 1572.
68. Cuellar AK, Johnson SL, Winters R: Distinctions between bipolar and unipolar depression. *Clin Psychol Rev*. 2005, 25: 307.
69. Cubells JF, Kim KS, Baker H, Volpe BT, Chung Y, Houpt TA, Wessel TC, Joh TH: Differential in vivo regulation of mRNA encoding the norepinephrine transporter and tyrosine hydroxylase in rat adrenal medulla and locus ceruleus. *J Neurochem*. 1995, 65: 502.
70. Dahlstrom A, Fuxe K: Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*. 1964, 20: 398.
71. Davidson RJ, Lewis DA, Alloy LB, Amaral DG, Bush G, Cohen JD, Drevets WC, Farah MJ, Kagan J, McClelland JL, Nolen-Hoeksema S, Peterson BS: Neural and behavioral substrates of mood and mood regulation. *Biol Psychiatry*. 2002, 52: 478.
72. Dayan D, Vered M, Sivor S, Hiss Y, Buchner A: Age-related changes in proliferative markers in labial salivary glands: a study of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki-67. *Exp Gerontol*. 2002, 37: 841.
73. Dent G, Choi DC, Herman JP, Levine S: GABAergic circuits and the stress hyporesponsive period in the rat: ontogeny of glutamic acid decarboxylase (GAD) 67 mRNA expression in limbic-hypothalamic stress pathways. *Brain Res*. 2007, 1138: 1.
74. Dent GW, Smith MA, Levine S: Stress-induced alterations in locus coeruleus gene expression during ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res*. 2001, 127: 23.
75. De Paermentier F, Crompton MR, Katona CL, Horton RW: beta-adrenoceptors in brain and pineal from depressed suicide victims. *Pharmacol Toxicol*. 1992, 71 Suppl 1: 86.
76. De Paermentier F, Cheetham SC, Crompton MR, Katona CL, Horton RW: Brain beta-adrenoceptor binding sites in antidepressant-free depressed suicide victims. *Brain Res*. 1990, 525: 71.
77. de Wolde H, Pruijm J, Mastik MF, Koudstaal J, Molenaar WM: Proliferative activity in human brain tumors: comparison of histopathology and L-[1-(11)C]tyrosine PET. *J Nucl Med*. 1997, 38: 1369.
78. Derenzini M: The AgNORs. *Micron*. 2000, 31: 117.

79. Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ: Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc.* 2001, 204: 232.
80. Dracheva S, Elhakem SL, McGurk SR, Davis KL, Haroutunian V: GAD67 and GAD65 mRNA and protein expression in cerebrocortical regions of elderly patients with schizophrenia. *J Neurosci Res.* 2004, 76: 581.
81. Drevets WC: Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2003, 985: 420.
82. Drevets WC: Neuroimaging studies of mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2000, 48: 813.
83. Drevets WC: Prefrontal cortical-amygdalar metabolism in major depression. *Ann N Y Acad Sci.* 1999, 877: 614.
84. Drevets WC, Price JL, Simpson JR, Jr., Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME: Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature.* 1997, 386: 824.
85. Druid H: Site of entrance wound and direction of bullet path in firearm fatalities as indicators of homicide versus suicide. *Forensic Sci Int.* 1997, 88: 147.
86. Duman RS, Nakagawa S, Malberg J: Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology.* 2001, 25: 836.
87. Dwivedi Y, Mondal AC, Payappagoudar GV, Rizavi HS: Differential regulation of serotonin (5HT)_{2A} receptor mRNA and protein levels after single and repeated stress in rat brain: role in learned helplessness behavior. *Neuropharmacology.* 2005a, 48: 204.
88. Dwivedi Y, Mondal AC, Rizavi HS, Conley RR: Suicide brain is associated with decreased expression of neurotrophins. *Biol Psychiatry.* 2005b, 58: 315.
89. Eastwood SL, Harrison PJ: Synaptic pathology in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and mood disorders. A review and a Western blot study of synaptophysin, GAP-43 and the complexins. *Brain Res Bull.* 2001, 55: 569.
90. Ebmeier KP, Donaghey C, Steele JD: Recent developments and current controversies in depression. *Lancet.* 2006, 367: 153.
91. Eisenmenger W: Spitze, scharfe und halbscharfe Gewalt. Rekonstruktion. *Eigene Hand/Fremde Hand.* W: Brinkmann B, Madea B (wyd.) *Handbuch gerichtliche Medizin.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 2004, s. 577-82.
92. Escriba PV, Ozaita A, Garcia-Sevilla JA: Increased mRNA expression of alpha_{2A}-adrenoceptors, serotonin receptors and mu-opioid receptors in the brains of suicide victims. *Neuropsychopharmacology.* 2004, 29: 1512.
93. Fagiolini M, Hensch TK: Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. *Nature.* 2000, 404: 183.
94. Fatemi SH, Sary JM, Earle JA, Araghi-Niknam M, Eagan E: GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and Reelin proteins in cerebellum. *Schizophr Res.* 2005, 72: 109.
95. Figarella-Branger D, Gambarelli D, Dollo C, Devictor B, Perez-Castillo AM, Genitori L, Lena G, Choux M, Pellissier JF: Infratentorial ependymomas of childhood. Correlation between histological features, immunohistological pheno-

- type, silver nucleolar organizer region staining values and post-operative survival in 16 cases. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1991, 82: 208.
96. Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R: Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol*. 2001, 432: 307.
 97. Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R: Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol*. 2000, 422: 556.
 98. Freedman LJ, Insel TR, Smith Y: Subcortical projections of area 25 (subgenual cortex) of the macaque monkey. *J Comp Neurol*. 2000, 421: 172.
 99. Freund TF: Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci*. 2003, 26: 489.
 100. Freund TF, Gulyas AI, Acsady L, Gorcs T, Toth K: Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87: 8501.
 101. Garcia-Moreno LM, Conejo NM, Gonzalez-Pardo H, Aller MA, Nava MP, Arias J, Arias JL: Evaluation of two experimental models of hepatic encephalopathy in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2005, 38: 127.
 102. Garcia-Moreno LM, Angeles Aller M, Conejo NM, Gomez MA, Martin FR, Arias J, Arias JL: Brain AgNOR activity in cholestatic rats with hepatic encephalopathy. *Hepato Res*. 2002, 24: 275.
 103. Garcia-Moreno LM, Conejo NM, Pardo HG, Gomez M, Martin FR, Alonso MJ, Arias JL: Hippocampal AgNOR activity after chronic alcohol consumption and alcohol deprivation in rats. *Physiol Behav*. 2001, 72: 115.
 104. Garcia Moreno LM, Cimadevilla JM, Gonzalez Pardo H, Zahonero MC, Arias JL: NOR activity in hippocampal areas during the postnatal development and ageing. *Mech Ageing Dev*. 1997, 97: 173.
 105. Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H: GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci*. 2007, 30: 1.
 106. Gilliam FG, Santos J, Vahle V, Carter J, Brown K, Hecimovic H: Depression in epilepsy: ignoring clinical expression of neuronal network dysfunction? *Epilepsia*. 2004, 45 Suppl 2: 28.
 107. Gonzalez-Gonzalez S, Diaz F, Vallejo G, Arias JL: Functional sexual dimorphism of the nucleolar organizer regions in the tuberomamillary nucleus. *Brain Res*. 1996, 736: 1.
 108. Gos T, Krell D, Brisch R, Bielau H, Trübner K, Bernstein H-G, Bogerts B: The changes of AgNOR parameters of anterior cingulate pyramidal neurons are region-specific in suicidal and non-suicidal depressive patients. *World J Biol Psychiatry*. 2007, 8: 1.
 109. Gos T, Krell D, Brisch R, Bielau H, Trubner K, Bernstein HG, Bogerts B: The changes in AgNOR parameters of dorsal raphe nucleus neurons are related to suicide. *Leg Med (Tokyo)*. 2007, 9: 251.
 110. Gos T, Becker K, Bock J, Malecki U, Bogerts B, Poeggel G, Braun K: Early neonatal and postweaning social emotional deprivation interferes with the maturation of serotonergic and tyrosine hydroxylase-immunoreactive afferent fiber systems in the rodent nucleus accumbens, hippocampus and amygdala. *Neuroscience*. 2006, 140: 811.

111. Gos T, Hauser R, Krzyżanowski M: Regional distribution of glutamate in the central nervous system of rat terminated by carbon dioxide euthanasia. *Lab Anim-UK*. 2002, 36: 127.
112. Gos T, Hauser R, Krzyżanowski M: The post-mortem concentration of glutamate in the structures of rat brain as an exponent of short aversive sensory stimulation preceding death. *Forensic Sci Int*. 2001, 123: 130.
113. Gould E, Gross CG: Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci*. 2002, 22: 619.
114. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG: Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*. 1999, 286: 548.
115. Grant MM, Weiss JM: Effects of chronic antidepressant drug administration and electroconvulsive shock on locus coeruleus electrophysiologic activity. *Biol Psychiatry*. 2001, 49: 117.
116. Guidotti A, Auta J, Davis JM, Dong E, Grayson DR, Veldic M, Zhang X, Costa E: GABAergic dysfunction in schizophrenia: new treatment strategies on the horizon. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005, 180: 191.
117. Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E: Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry*. 2000, 57: 1061.
118. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ: The new stereological tools, disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *AMPIS*. 1988, 96: 857.
119. Hajszan T, MacLusky NJ: Neurologic links between epilepsy and depression in women: is hippocampal neuroplasticity the key? *Neurology*. 2006, 66 Suppl 3: 13.
120. Haller J, Kruk MR: Neuroendocrine stress responses and aggression. W: Mattson MP (wyd.) *Neurobiology of aggression*. Humana Press, Totowa. 2003, s. 93-118.
121. Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Fera F, Weinberger DR: Neocortical modulation of the amygdala response to fearful stimuli. *Biol Psychiatry*. 2003, 53: 494.
122. Harrison PJ: The neuropathology of primary mood disorder. *Brain*. 2002, 125: 1428.
123. Healy D, Whitaker C: Antidepressants and suicide: risk-benefit conundrums. *J Psychiatry Neurosci*. 2003, 28: 331.
124. Hebert MA, Serova LI, Sabban EL: Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus. *J Neurochem*. 2005, 95: 484.
125. Heckers S, Stone D, Walsh J, Shick J, Koul P, Benes FM: Differential hippocampal expression of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 messenger RNA in bipolar disorder and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2002, 59: 521.
126. Hegerl U: Antidepressants and suicidality. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2006, 256: 199.

127. Heym C, Addicks K, Wedel C: Effect of intermittent immobilization on the ultrastructure of the rat superior cervical ganglion. *J Auton Nerv Syst.* 1981, 4: 283.
128. Hornak J, Bramham J, Rolls ET, Morris RG, O'Doherty J, Bullock PR, Polkey CE: Changes in emotion after circumscribed surgical lesions of the orbitofrontal and cingulate cortices. *Brain.* 2003, 126: 1691.
129. Hornung JP: The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat.* 2003, 26: 331.
130. Ishikawa M, Mizukami K, Iwakiri M, Asada T: Immunohistochemical and immunoblot analysis of gamma-aminobutyric acid B receptor in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Lett.* 2005, 383: 272.
131. Ishikawa M, Mizukami K, Iwakiri M, Hidaka S, Asada T: Immunohistochemical and immunoblot study of GABA(A) alpha1 and beta2/3 subunits in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Res.* 2004, 50: 77.
132. Jacobs BL, Praag H, Gage FH: Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry.* 2000, 5: 262.
133. Jacobs BL, Azmitia EC: Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.* 1992, 72: 165.
134. Janczukowicz J: The prognostic role of proliferation activity in human CNS tumours: the determination of AgNOR, PCNA and Ki-67 expression. Part 1: AgNOR expression in CNS tumours. *Folia Neuropathol.* 2003, 41: 97.
135. Jedema HP, Grace AA: Corticotropin-releasing hormone directly activates noradrenergic neurons of the locus ceruleus recorded in vitro. *J Neurosci.* 2004, 24: 9703.
136. Jozsa L, Kannus P, Jarvinen M, Isola J, Kvist M, Lehto M: Atrophy and regeneration of rat calf muscles cause reversible changes in the number of nucleolar organizer regions. Evidence that also in nonproliferating cells the number of NORs is a marker of protein synthesis activity. *Lab Invest.* 1993, 69: 231.
137. Kamali M, Oquendo MA, Mann JJ: Understanding the neurobiology of suicidal behavior. *Depress Anxiety.* 2001, 14: 164.
138. Kanner AM: Is major depression a neurologic disorder with psychiatric symptoms? *Epilepsy Behav.* 2004, 5: 636.
139. Karger B, DuChesne A: Who fired the gun? A casuistic contribution to the differentiation between self-inflicted and non-self-inflicted gunshot wounds. *Int J Legal Med.* 1997, 110: 33.
140. Karger B: Schussverletzungen. Differenzierung von Suizid, Homizid und Unfall. W: Brinkmann B, Madea B (wyd.) *Handbuch gerichtliche Medizin.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 2004, s. 660-8.
141. Karlsson T: Multivariate analysis ('forensimetrics') - a new tool in forensic medicine. Differentiation between firearm-related homicides and suicides. *Forensic Sci Int.* 1999, 101: 131.
142. Karlsson T: Multivariate analysis ('forensimetrics') - a new tool in forensic medicine. Differentiation between sharp force homicide and suicide. *Forensic Sci Int.* 1998, 94: 183.

143. Kirby LG, Rice KC, Valentino RJ: Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*. 2000, 22: 148.
144. Kitayama I, Yaga T, Kayahara T, Nakano K, Murase S, Otani M, Nomura J: Long-term stress degenerates, but imipramine regenerates, noradrenergic axons in the rat cerebral cortex. *Biol Psychiatry*. 1997, 42: 687.
145. Klimek V, Zhu MY, Dilley G, Konick L, Overholser JC, Meltzer HY, May WL, Stockmeier CA, Ordway GA: Effects of long-term cigarette smoking on the human locus coeruleus. *Arch Gen Psychiatry*. 2001, 58: 821.
146. Klimek V, Stockmeier C, Overholser J, Meltzer HY, Kalka S, Dilley G, Ordway GA: Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression. *J Neurosci*. 1997, 17: 8451.
147. Komori T, Nomura J, Inoue K, Kitayama I: Tyrosine hydroxylase activity in discrete brain regions of depression model rats. *Jpn J Psychiatry Neurol*. 1990, 44: 747.
148. Konopka T, Bolechała F, Strona M: Porównanie ran kłutych klatki piersiowej w samobójstwach i zabójstwach. *Arch Med Sąd Krym*. 2003, 53: 117.
149. Kornau HC: GABA(B) receptors and synaptic modulation. *Cell Tissue Res*. 2006, 326: 517.
150. Krzyżanowski M, Jankowski Z, Pieśniak D, Wilmanowska A: Przypadki powieszeń ze skrepowanymi kończynami – samobójstw, zabójstwo czy wypadek. *Arch Med Sąd Krym*. 2002, 52: 371.
151. Kunz J, Strona M: Nietypowe przypadki samobójstw. *Arch Med Sąd Krym*. 2003, 53: 185.
152. Kunz J, Bolechała F, Kaliszczak P: Sądowo-lekarska problematyka zabójstwa z samobójstwem sprawcy ("dyadic death"). *Arch Med Sąd Krym*. 2002, 52: 163.
153. Laprade N, Soghomonian JJ: Gene expression of the GAD67 and GAD65 isoforms of glutamate decarboxylase is differentially altered in subpopulations of striatal neurons in adult rats lesioned with 6-OHDA as neonates. *Synapse*. 1999, 33: 36.
154. Lauder JM, Liu J: Glial heterogeneity and developing neurotransmitter systems. *Perspect Dev Neurobiol*. 1994, 2: 239.
155. LeDoux JE: *The emotional brain*. Simon & Schuster, New York. 1998.
156. Lemonde S, Turecki G, Bakish D, Du L, Hrdina PD, Bown CD, Sequeira A, Kushwaha N, Morris SJ, Basak A, Ou XM, Albert PR: Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci*. 2003, 23: 8788.
157. Levesque J, Eugene F, Joannette Y, Paquette V, Mensour B, Beaudoin G, Leroux JM, Bourgouin P, Beaugard M: Neural circuitry underlying voluntary suppression of sadness. *Biol Psychiatry*. 2003, 53: 502.
158. Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW: Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*. 2005, 6: 312.
159. Lisman JE, Otmakhova NA: Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus*. 2001, 11: 551.

160. Little KY, Clark TB, Ranc J, Duncan GE: Beta-adrenergic receptor binding in frontal cortex from suicide victims. *Biol Psychiatry*. 1993, 34: 596.
161. Lloyd KG, Farley IJ, Deck JH, Hornykiewicz O: Serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in discrete areas of the brainstem of suicide victims and control patients. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1974, 11: 387.
162. Lopez-Larson MP, DelBello MP, Zimmerman ME, Schwiers ML, Strakowski SM: Regional prefrontal gray and white matter abnormalities in bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2002, 52: 93.
163. Lu W, Tang H, Fan M, Mi R, Wang L, Jia J: Research on nucleolar organizer regions of hippocampal neuron in Alzheimer's disease. *Chin Med J*. 1998, 111: 282.
164. Lyoo IK, Sung YH, Dager SR, Friedman SD, Lee JY, Kim SJ, Kim N, Dunner DL, Renshaw PF: Regional cerebral cortical thinning in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2006, 8: 65.
165. Mai JK, Assheuer J, Paxinos G: Atlas of the human brain. Academic Press, San Diego. 1997.
166. Malberg JE: Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neurosci*. 2004, 29: 196.
167. Mamaev NN, Gudkova AY, Amineva KK: AgNORs in the myocardium in ischaemic heart disease complicated by heart failure: a postmortem study. *Mol Pathol*. 1998, 51: 102.
168. Mann JJ: Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2003, 4: 819.
169. Mann JJ, Brent DA, Arango V: The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: a focus on the serotonergic system. *Neuropsychopharmacology*. 2001, 24: 467.
170. Mann JJ, Huang YY, Underwood MD, Kassir SA, Oppenheim S, Kelly TM, Dwork AJ, Arango V: A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and prefrontal cortical binding in major depression and suicide. *Arch Gen Psychiatry*. 2000, 57: 729.
171. Mann JJ, Malone KM: Cerebrospinal fluid amines and higher-lethality suicide attempts in depressed inpatients. *Biol Psychiatry*. 1997, 41: 162.
172. Mann JJ, Malone KM, Psych MR, Sweeney JA, Brown RP, Linnoila M, Stanley B, Stanley M: Attempted suicide characteristics and cerebrospinal fluid amine metabolites in depressed inpatients. *Neuropsychopharmacology*. 1996, 15: 576.
173. Mann JJ, Stanley M, McBride PA, McEwen BS: Increased serotonin₂ and beta-adrenergic receptor binding in the frontal cortices of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry*. 1986, 43: 954.
174. Masserano JM, Takimoto GS, Weiner N: Electroconvulsive shock increases tyrosine hydroxylase activity in the brain and adrenal gland of the rat. *Science*. 1981, 214: 662.
175. Mattig W: Stumpfe Gewalt. Eigene/fremde Hand, Unfall. W: Brinkmann B, Maeda B (wyd.) Handbuch gerichtliche Medizin. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 2004, s. 542-7.
176. Matsubara S, Arora RC, Meltzer HY: Serotonergic measures in suicide brain: 5-HT_{1A} binding sites in frontal cortex of suicide victims. *J Neural Transm Gen Sect*. 1991, 85: 181.

177. Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, Schwab JM, Kennedy SH: Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*. 2005, 45: 651.
178. Mayberg HS: Modulating dysfunctional limbic-cortical circuits in depression: towards development of brain-based algorithms for diagnosis and optimised treatment. *Br Med Bull*. 2003, 65: 193.
179. Mayberg HS, Brannan SK, Mahurin RK, Jerabek PA, Brickman JS, Tekell JL, Silva JA, McGinnis S, Glass TG, Martin CC, Fox PT: Cingulate function in depression: a potential predictor of treatment response. *Neuroreport*. 1997, 8: 1057.
180. McDougall SJ, Widdop RE, Lawrence AJ: Differential gene expression in WKY and SHR brain following acute and chronic air-puff stress. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005, 133: 329.
181. McEwen BS: Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism*. 2005, 54: 20.
182. McEwen BS: Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry*. 2003, 54: 200.
183. McEwen BS, Magarinos AM, Reagan LP: Structural plasticity and tianeptine: cellular and molecular targets. *Eur Psychiatry*. 2002, 17 Suppl 3: 318.
184. McGeorge AJ, Faull RL: The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*. 1989, 29: 503.
185. Melia KR, Nestler EJ, Duman RS: Chronic imipramine treatment normalizes levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus of chronically stressed rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1992, 108: 23.
186. Mennel HD, Müller I: Morphometric investigation on nuclear and nucleolar arrangement and AgNOR content in the rat hippocampus under normal and ischemic conditions. *Exp Toxicol Pathol*. 1994, 46: 491.
187. Merali Z, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Anisman H: Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J Neurosci*. 2004, 24: 1478.
188. Meyer JH, Houle S, Sagrati S, Carella A, Hussey DF, Ginovart N, Goulding V, Kennedy J, Wilson AA: Brain serotonin transporter binding potential measured with carbon 11-labeled DASB positron emission tomography: effects of major depressive episodes and severity of dysfunctional attitudes. *Arch Gen Psychiatry*. 2004, 61: 1271.
189. Milner TA, Bacon CE: Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*. 1989, 281: 479.
190. Milroy CM: The epidemiology of homicide-suicide (dyadic death). *Forensic Sci Int*. 1995, 71: 117.
191. Mitrofanis J, Mikuletic L: Organisation of the cortical projection to the zona incerta of the thalamus. *J Comp Neurol*. 1999, 412: 173.
192. Moghaddam B: Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol Psychiatry*. 2002, 51: 775.
193. Mohler H: GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res*. 2006, 326: 505.

194. Molnar M, Potkin SG, Bunney WE, Jones EG: mRNA expression patterns and distribution of white matter neurons in dorsolateral prefrontal cortex of depressed patients differ from those in schizophrenia patients. *Biol Psychiatry*. 2003, 53: 39.
195. Montgomery SA, Montgomery DB, Green M, Bullock T, Baldwin D: Pharmacotherapy in the prevention of suicidal behavior. *J Clin Psychopharmacol*. 1992, 12 Suppl 2: 27.
196. Musshoff F, Menting T, Madea B: Postmortem serotonin (5-HT) concentrations in the cerebrospinal fluid of medicolegal cases. *Forensic Sci Int*. 2004, 142: 211.
197. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM: Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002, 34: 13.
198. Nestler EJ, Alreja M, Aghajanian GK: Molecular control of locus coeruleus neurotransmission. *Biol Psychiatry*. 1999, 46: 1131.
199. Nestler EJ, McMahon A, Sabban EL, Tallman JF, Duman RS: Chronic antidepressant administration decreases the expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87: 7522.
200. Northoff G, Richter A, Gessner M, Schlagenhaut F, Fell J, Baumgart F, Kaulisch T, Kotter R, Stephan KE, Leschinger A, Hagner T, Bargel B, Witzel T, Hinrichs H, Bogerts B, Scheich H, Heinze HJ: Functional dissociation between medial and lateral prefrontal cortical spatiotemporal activation in negative and positive emotions: a combined fMRI/MEG study. *Cereb Cortex*. 2000, 10: 93.
201. Nugent AC, Milham MP, Bain EE, Mah L, Cannon DM, Marrett S, Zarate CA, Pine DS, Price JL, Drevets WC: Cortical abnormalities in bipolar disorder investigated with MRI and voxel-based morphometry. *Neuroimage*. 2006, 30: 485.
202. Ochsner KN, Bunge SA, Gross JJ, Gabrieli JD: Rethinking feelings: an FMRI study of the cognitive regulation of emotion. *J Cogn Neurosci*. 2002, 14: 1215.
203. Ongür D, Price JL: The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex*. 2000, 10: 206.
204. Oquendo MA, Placidi GP, Malone KM, Campbell C, Keilp J, Brodsky B, Kegeles LS, Cooper TB, Parsey RV, van Heertum RL, Mann JJ: Positron emission tomography of regional brain metabolic responses to a serotonergic challenge and lethality of suicide attempts in major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2003, 60: 14.
205. Ordway GA, Szebeni K: Effect of repeated treatment with olanzapine or olanzapine plus fluoxetine on tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004, 7: 321.
206. Ordway GA, Smith KS, Haycock JW: Elevated tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus of suicide victims. *J Neurochem*. 1994, 62: 680.
207. Pardon MC, Gould GG, Garcia A, Phillips L, Cook MC, Miller SA, Mason PA, Morilak DA: Stress reactivity of the brain noradrenergic system in three rat strains differing in their neuroendocrine and behavioral responses to stress: implications for susceptibility to stress-related neuropsychiatric disorders. *Neuroscience*. 2002, 115: 229.
208. Perico CA, Skaf CR, Yamada A, Duran F, Buchpiguel CA, Castro CC, Soares JC, Busatto GF: Relationship between regional cerebral blood flow and separate symptom clusters of major depression: a single photon emission computed tomography study using statistical parametric mapping. *Neurosci Lett*. 2005, 384: 265.

209. Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE: Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci.* 1977, 34: 247.
210. Persson ML, Wasserman D, Geijer T, Jonsson EG, Terenius L: Tyrosine hydroxylase allelic distribution in suicide attempters. *Psychiatry Res.* 1997, 72: 73.
211. Petroff OA: GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist.* 2002, 8: 562.
212. Petty F, Kramer G, Wilson L, Chae YL: Learned helplessness and in vivo hippocampal norepinephrine release. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993, 46: 231.
213. Petty F, Sherman AD: GABAergic modulation of learned helplessness. *Pharmacol Biochem Behav.* 1981, 15: 567.
214. Pfleiderer B, Michael N, Erfurth A, Ohrmann P, Hohmann U, Wolgast M, Fiebich M, Arolt V, Heindel W: Effective electroconvulsive therapy reverses glutamate/glutamine deficit in the left anterior cingulum of unipolar depressed patients. *Psychiatry Res.* 2003, 122: 185-92.
215. Pizzagalli D, Pascual-Marqui RD, Nitschke JB, Oakes TR, Larson CL, Abercrombie HC, Schaefer SM, Koger JV, Benca RM, Davidson RJ: Anterior cingulate activity as a predictor of degree of treatment response in major depression: evidence from brain electrical tomography analysis. *Am J Psychiatry.* 2001, 158: 405.
216. Ploton D: Structure and molecular organization of the nucleolus. *Zentralbl Pathol.* 1994, 140: 3.
217. Ploton D, Visseaux-Coletto B, Canellas JC, Bourzat C, Adnet JJ, Lechki C, Bonnet N: Semiautomatic quantification of silver-stained nucleolar organizer regions in tissue sections and cellular smears. *Anal Quant Cytol Histol.* 1992, 14: 14.
218. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J.* 1986, 18: 5.
219. Poeggel G, Nowicki L, Braun K: Early social deprivation alters monoaminergic afferents in the orbital prefrontal cortex of *Octodon degus*. *Neuroscience.* 2003, 116: 617.
220. Pollak S: Forensic aspects of suicide. *Rechtsmedizin.* 2005, 15: 235.
221. Pollak S: Joint suicides. *Beitr Gerichtl Med.* 1978, 36: 53.
222. Purselle DC, Nemeroff CB: Serotonin transporter: a potential substrate in the biology of suicide. *Neuropsychopharmacology.* 2003, 28: 613.
223. Püschel K, Holtz W, Hildebrand E, Naeve W, Brinkmann B: Hanging: suicide or homicide? *Arch Kriminol.* 1984, 174: 141.
224. Pużyński S: Depresje i zaburzenia afektywne. PZWŁ, Warszawa. 2002.
225. Qü M, Lu Z, Zilles K: Aging of nucleolar organizer region in rat basal forebrain neurons related to learning and memory. *Ann Anat.* 1994, 176: 39.
226. Rajkowska G: Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry.* 2000, 48: 766.
227. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA: Morphometric evidence for neuronal

- and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry*. 1999, 45: 1085.
228. Rebolledo Godoy M, Rebolledo Godoy AP, Oehmichen M: AgNORs during the process of wound healing. Time dependency as evaluated in vital and postmortem biopsy. *Int J Legal Med*. 2000, 113: 244.
229. Reinhardt HF, Henning LC, Rohr HP: Morphometric ultrastructural studies of the supraoptic nucleus of the rat after dehydration. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1969, 102: 172.
230. Ressler KJ, Nemeroff CB: Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry*. 1999, 46: 1219.
231. Reusche E: Silver staining of senile plaques and neurofibrillary tangles in paraffin sections. A simple and effective method. *Pathol Res Pract*. 1991, 187: 1045.
232. Rolls ET, O'Doherty J, Kringelbach ML, Francis S, Bowtell R, McGlone F: Representations of pleasant and painful touch in the human orbitofrontal and cingulate cortices. *Cereb Cortex*. 2003, 13: 308.
233. Rolls ET: The orbitofrontal cortex and reward. *Cereb Cortex*. 2000, 10: 284.
234. Rolls ET: The orbitofrontal cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996, 351: 1433.
235. Romanski LM, Goldman-Rakic PS: An auditory domain in primate prefrontal cortex. *Nat Neurosci*. 2002, 5: 15.
236. Rubio S, Begega A, Santin LJ, Arias JL: Changes in the nucleolar organizer regions in the tuberomammillar region after dehydration. *Arch Physiol Biochem*. 1997, 105: 560.
237. Rüschoff J, Elsasser HP, Adler G: Correlation of nucleolar organizer regions with secretory and regenerative process in experimental cerulein-induced pancreatitis in the rat. *Pancreas*. 1995, 11: 154.
238. Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Krystal JH: Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. *Am J Psychiatry*. 2002, 159: 663.
239. Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Petroff OA, Berman RM, Charney DS, Krystal JH: Reduced cortical gamma-aminobutyric acid levels in depressed patients determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry*. 1999, 56: 1043.
240. Sands SA, Guerra V, Morilak DA: Changes in tyrosine hydroxylase mRNA expression in the rat locus coeruleus following acute or chronic treatment with valproic acid. *Neuropsychopharmacology*. 2000, 22: 27.
241. Santhakumar V, Soltesz I: Plasticity of interneuronal species diversity and parameter variance in neurological diseases. *Trends Neurosci*. 2004, 27: 504.
242. Santin LJ, Rubio S, Begega A, Gonzalez-Pardo H, Garcia-Moreno LM, Cuesta M, Arias JL: Effects of ethanol and diazepam treatments on silver-stained nucleolar organiser regions in mammillary bodies. *Med Sci Res*. 1996, 24: 707.
243. Sariola H, Saarma M: Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci*. 2003, 116: 3855.
244. Sass H, Wittchen H-U, Zaudig M, Houben I: Diagnostische Kriterien des Diagnostischen und Statistischen Manuals Psychischer Störungen DSM-IV-TR. Hogrefe-Verlag, Göttingen Bern Toronto Seattle. 2003.

245. Schwarzacher HG, Mikelsaar AV, Schnedl W: The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Electron- and light-microscopic studies on human cells in interphase, mitosis, and meiosis. *Cytogenet Cell Genet.* 1978, 20: 24.
246. Soghomonian JJ, Martin DL: Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci.* 1998, 19: 500.
247. Squire LR, Stark CE, Clark RE: The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci.* 2004, 27: 279.
248. Stamford JA, Davidson C, McLaughlin DP, Hopwood SE: Control of dorsal raphe 5-HT function by multiple 5-HT(1) autoreceptors: parallel purposes or pointless plurality? *Trends Neurosci.* 2000, 23: 459.
249. Stockmeier CA: Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter. *J Psychiatr Res.* 2003, 37: 357.
250. Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G: Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci.* 1998, 18: 7394.
251. Strakowski SM, Delbello MP, Adler CM: The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Mol Psychiatry.* 2005, 10: 105.
252. Ströhle A, Holsboer F: Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry.* 2003, 36 Suppl 3: 207.
253. Sullivan RM, Gratton A: Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J Neurosci.* 1999, 19: 2834.
254. Teicher MH, Glod CA, Cole JO: Antidepressant drugs and the emergence of suicidal tendencies. *Drug Saf.* 1993, 8: 186.
255. Torrey EF, Barci BM, Webster MJ, Bartko JJ, Meador-Woodruff JH, Knable MB: Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biol Psychiatry.* 2005, 57: 252.
256. Torrey EF, Webster M, Knable M, Johnston N, Yolken RH: The Stanley Foundation brain collection and neuropathology consortium. *Schizophr Res.* 2000, 44: 151.
257. Tremblay LK, Naranjo CA, Graham SJ, Herrmann N, Mayberg HS, Hevenor S, Busto UE: Functional neuroanatomical substrates of altered reward processing in major depressive disorder revealed by a dopaminergic probe. *Arch Gen Psychiatry.* 2005, 62: 1228.
258. Trübner K, Püschel K: Fatalities in the bathtub. *Arch Kriminol.* 1991, 188: 35.
259. Underwood MD, Mann JJ: The neurochemical genetics of serotonin in aggression, impulsivity and suicide. W: Mattson M (wyd.) *Neurobiology of aggression: understanding and preventing violence.* Totowa: Humana Press. 2003, s. 65-72.
260. Underwood MD, Khaibulina AA, Ellis SP, Moran A, Rice PM, Mann JJ, Arango V: Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. *Biol Psychiatry.* 1999, 46: 473.
261. Valentino RJ, Curtis AL, Parris DG, Wehby RG: Antidepressant actions on brain noradrenergic neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990, 253: 833.

-
262. Van Bockstaele EJ, Bajic D, Proudfit H, Valentino RJ: Topographic architecture of stress-related pathways targeting the noradrenergic locus coeruleus. *Physiol Behav.* 2001, 73: 273.
 263. Van Bockstaele EJ, Biswas A, Pickel VM: Topography of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus that send axon collaterals to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res.* 1993, 624: 188.
 264. van Heeringen K, Audenaert K, Van de Wiele L, Verstraete A: Cortisol in violent suicidal behaviour: association with personality and monoaminergic activity. *J Affect Disord.* 2000, 60: 181.
 265. Vargas JP, Rodriguez F, Lopez JC, Arias JL, Salas C: Spatial learning-induced increase in the argyrophilic nucleolar organizer region of dorsolateral telencephalic neurons in goldfish. *Brain Res.* 2000, 865: 77.
 266. Vennemann B, Brinkmann B: Death occurring in water. *Rechtsmedizin.* 2003, 13: 201.
 267. Venter CP, Joubert PH: Ethnic differences in response to beta 1-adrenoceptor blockade by propranolol. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984, 6: 361.
 268. Verma V, Lim EP, Han SP, Nagarajah R, Dawe GS: Chronic high-dose haloperidol has qualitatively similar effects to risperidone and clozapine on immediate-early gene and tyrosine hydroxylase expression in the rat locus coeruleus but not medial prefrontal cortex. *Neurosci Res.* 2007, 57: 17.
 269. Völlm B, Richardson P, McKie S, Elliott R, Deakin JF, Anderson IM: Serotonergic modulation of neuronal responses to behavioural inhibition and reinforcing stimuli: an fMRI study in healthy volunteers. *Eur J Neurosci.* 2006, 23: 552.
 270. Weiss JM, Simson PG: Neurochemical basis of stress-induced depression. *Psychopharmacol Bull.* 1985, 21: 447.
 271. West MJ: Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci.* 1999, 22: 51.
 272. Whitaker-Azmitia P, Zhou F, Hobin J, Borella A: Isolation-rearing of rats produces deficits as adults in the serotonergic innervation of hippocampus. *Peptides.* 2000, 21: 1755.
 273. Whitaker-Azmitia PM, Druse M, Walker P, Lauder JM: Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res.* 1996, 73: 19.
 274. Whitaker-Azmitia PM, Shemer AV, Caruso J, Molino L, Azmitia EC: Role of high affinity serotonin receptors in neuronal growth. *Ann N Y Acad Sci.* 1990, 600: 315.
 275. Williams ZM, Bush G, Rauch SL, Cosgrove GR, Eskandar EN: Human anterior cingulate neurons and the integration of monetary reward with motor responses. *Nat Neurosci.* 2004, 7: 1370.
 276. Wilson MA, Molliver ME: The organization of serotonergic projections to cerebral cortex in primates: retrograde transport studies. *Neuroscience.* 1991, 44: 555.
 277. Woo TU, Walsh JP, Benes FM: Density of glutamic acid decarboxylase 67 messenger RNA-containing neurons that express the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 2004, 61: 649.
 278. World Health Organisation Report. 2004.

279. Zhang ZJ, Reynolds GP: A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2002, 55: 1.
280. Zhou JN, Riemersma RF, Unmehopa UA, Hoogendijk WJ, van Heerikhuize JJ, Hofman MA, Swaab DF: Alterations in arginine vasopressin neurons in the suprachiasmatic nucleus in depression. *Arch Gen Psychiatry.* 2001, 58: 655.
281. Zhu MY, Klimek V, Dilley GE, Haycock JW, Stockmeier C, Overholser JC, Meltzer HY, Ordway GA: Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression. *Biol Psychiatry.* 1999, 46: 1275.
282. Zill P, Büttner A, Eisenmenger W, Moller HJ, Bondy B, Ackenheil M: Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims. *Biol Psychiatry.* 2004, 56: 581.

STRESZCZENIE

Za powstawanie bogatych i różnorodnych objawów depresji odpowiadają najpewniej zaburzenia licznych struktur mózgu, wśród nich w głównej mierze kory przedczołowej (PFC), zespołu hipokampa, prążkowiec, ciała migdałowatego i wzgórza oraz komponent układów aktywujących pnia mózgu, zwłaszcza serotoninergecznego. Zgodnie z wynikami współczesnych badań neurobiologicznych, procesy prowadzące do samobójstwa stanowią odrębne zjawisko patologiczne u chorych z depresją. Jednak kryteria diagnostyczne jednoznaczne dla tych procesów nie zostały dotychczas opracowane a mogłyby one posiadać znaczenie zarówno dla psychiatrii jak i medycyny sądowej. Możliwość rozpoznania samobójstwa na podstawie badań pośmiertnych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) posiadałaby bowiem duże znaczenie dla diagnostyki różnicowej w medycynie sądowej. W celu oceny ewentualnej przydatności takich badań dla rozpoznania procesów prowadzących do samobójstwa przeprowadzono ilościowe badania neurohistologiczne wybranych struktur OUN, głównie komponent układu limbicznego i układów aktywujących pnia mózgu. Struktury te pełnią kluczową rolę w kontroli emocji, powstawaniu pamięci i uczeniu się, kształtowaniu nastroju, odczuwaniu przyjemności, pobudzeniu OUN i regulacji ośrodkowej reakcji na stres. Procesy te ulegają zaburzeniu w depresji. Badania dotyczyły zatopionych w parafinie mózgow, pobranych od chorych z rozpoznaniem epizodem depresyjnym, który występował w przebiegu dużej depresji oraz zaburzenia dwubiegunowego, zgodnie z kryteriami diagnostycznymi DSM IV. Część z tych chorych stanowili samobójcy, pozostali zmarli z przyczyn chorobowych. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia, depresja stanowi najczęstszą przyczynę samobójstw (ok. 50% przypadków), co uzasadniało dokonany wybór. Grupę kontrolną stanowili osobnicy bez rozpoznawanych przyżyciowo zaburzeń psychicznych. Zastosowano różne metody ilościowej oceny neurohistologicznej. O wyborze parametrów neurohistologicznych zadecydowały możliwości pośredniej oceny zaburzeń aktywności neuronalnej (w badaniach kariometrycznych) oraz przekazywania (w badaniach immunohistochemicznych). Barwienie metodą AgNOR (ang. *argyrophilic nucleolar organizer*, srebrochłonny organizator jąderkowy) posłużyło do badań kariometrycznych neuronów jądra grzbietowego szwu (DRN) oraz neuronów piramidowych warstw III i V kory przedniej części zakrętu obręczy (AC) i kory oczodołowo-czołowej (OFC). W miejscu sinawym (LC) mostu dokonano pomiarów liczby neuronów wykazujących dodatnią reakcję immunohistochemiczną na hydroksylazę tyrozynową (TH), enzymu kluczowego w syntezie noradrenaliny. Z kolei w obszarach PFC jak również w wybranych strukturach limbicznych płata skroniowego dokonano oceny gęstości neuropilu GAD-immunoreaktywnego (GAD – dekarboksylaza kwasu glutaminowego, enzym kluczowy w syntezie kwasu gamma-aminomasłowego). Te różnorodne badania potwierdziły, że procesy prowadzące do samobójstwa stanowią u chorych z depresją odrębne zjawisko patologiczne, zaznaczające się w odmienny sposób w różnych strukturach mózgu. Samobójcy wykazali swoją odrębność neurobiologiczną zarówno wobec kontroli jak również innych chorych z epizodem depresyjnym w badaniach przeprowadzonych metodą AgNOR w obrębie DRN i AC oraz metodą immunohistochemiczną GAD w zespole hipokampa. Szczególnie interesujące z punktu widzenia medycyny sądowej wydaje się być stwierdzenie zmian właściwych dla nasilenia stopnia autoagresywności w akcie samobójczym. Wykazały to w sposób niezależny badania struktur pnia mózgu (DRN i LC). Obserwowane różnice między- i wewnątrzgrupowe były niezależne od stosowa-

nych leków psychotropowych oraz innych zmiennych wikłających, w tym od czasu po śmierci. Dla niektórych porównań osiągnęły one wysoką znamienność statystyczną. Mimo podanych właściwości, na obecnym etapie badań nie można wypowiedzieć się jednoznacznie, czy mogłyby one znaleźć zastosowanie w diagnostyce pośmiertnej. W tym celu koniecznym byłoby przebadanie większej liczby przypadków samobójstw i poszerzenie badań o inne grupy zaburzeń psychicznych.

SUMMARY

It is likely that many brain regions mediate the diverse symptoms of depression, including regions of the prefrontal cortex (PFC), hippocampus, striatum, amygdala, and the thalamus as well as the components of brain activating systems of the brain stem, especially serotonergic. The recent neurobiological studies suggest that processes leading to suicide constitute distinct pathological phenomenon in depressive patients. Nevertheless, diagnostic criteria that would be unequivocal for each of them have not been developed so far, although they could be important for both psychiatry and forensic medicine. The possibility of suicide diagnosis just on base of postmortem study of central nervous system (CNS) would considerably matter for differential diagnostics in forensic medicine. To evaluate the usefulness of such research for the diagnosis of processes leading to suicide, the quantitative neurohistological investigations of chosen CNS structures was performed, mostly the components of limbic system and the components of brain activating systems of the brain stem. Those structures play a crucial role in the control of emotions, the memory and learning functions, the generation of mood, the experience of pleasure, the stimulation of CNS and the regulation of central stress reaction. Above mentioned processes are subject to disorders in depression. The study was performed on paraffin-embedded brains from patients with depressive episode in both major depressive disorder and bipolar disorder, in accordance with diagnostic criteria of DSM IV. Some of the patients were suicide victims, whereas the others died of disease. The study focused on depression regarding the data of the World Health Organization pointing that it is the most common cause of suicide (ca. 50% of cases). Control brains were collected from patients without a record of psychiatric disorders during their lifetime. Different methods of quantitative neurohistological evaluation were performed. The choice of neurohistological parameters was made regarding possibilities of indirect estimate of neuronal activity disorders (in karyometric studies) and neurotransmission disorders (in immunohistochemical studies). The argyrophilic nucleolar organiser (AgNOR) staining method made it possible to evaluate karyometric parameters of the dorsal raphe nucleus (DRN) neurons and of the layers III and V pyramidal neurons of the anterior cingulate cortex (AC) and orbitofrontal cortex (OFC). In the locus coeruleus (LC) of the brain stem was evaluated the number of neurons immunoreactive for the tyrosine hydroxylase (TH), the key enzyme in noradrenaline synthesis. On the other hand, in PFC areas as well as in chosen limbic structures of the temporal lobe the evaluation of GAD-immunoreactive neuropil density (GAD – glutamic acid decarboxylase, the key enzyme in gamma-amino butyric acid synthesis) was carried out. Those various studies confirmed that processes that lead to suicide constitute distinct pathological phenomenon in depressive patients and appear in different ways in various brain structures. Suicide patients demonstrated their neurobiological distinctness both from controls and other patients with depressive episode in the AgNOR studies of DRN and AC as well as by GAD-immunostaining method in the hippocampal formation. The finding of abnormalities that correspond with self aggression level in the suicidal act seems to be particularly interesting for forensic medicine. This was independently proved by the studies on brain stem structures (DRN and LC). The inter- and intra-group differences were not influenced by psychotropic medication applied and other confounding variables, including the time after death. For some of the comparisons they reached a high statistical significance. Apart from the given characteristics, it is impossible by now to state explic-

itly if the presented investigations could become useful in postmortem diagnostics. To this end, it would be advisable to examine more suicidal patients and extend the study on other groups of mental disorders.