



Gdański Uniwersytet Medyczny

Marta Krzyżanowska

**Aktywność transkrypcyjna rybosomalnego DNA badana
metodą AgNOR w neuronach jądra grzbietowego szwu
w schizofrenii, depresji i samobójstwie**

**Ribosomal DNA transcriptional activity in dorsal raphe
nucleus neurons evaluated by the AgNOR staining method
in schizophrenia, depression and suicide**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Gdańsk 2016

Wydano za zgodą
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Pracę zrealizowano w
Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:
dr hab. med. Tomasz Gos

*Składam podziękowania mojemu mentorowi oraz Promotorowi,
Panu dr. hab. med. Tomaszowi Gosowi za pomoc
oraz życzliwość przy powstaniu rozprawy doktorskiej.*

Serdecznie dziękuję Mojej Mamie za miłość, wsparcie i troskę.

*Dziękuję Kierownikowi Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
Panu dr. hab. med. Zbigniewowi Jankowskiemu,
oraz wszystkim współpracownikom zaangażowanym w pracę nad materiałem
do badań będących podstawą publikacji składających się
na niniejszą rozprawę doktorską.*

SPIS TREŚCI:

Wykaz publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej	7
Wykaz ważniejszych skrótów użytych w streszczeniu publikacji	8
Streszczenie w języku polskim	9
Streszczenie w języku angielskim	19
Piśmiennictwo cytowane w streszczeniu publikacji składających się na rozprawę doktorska	29

Wykaz publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej

1) Krzyżanowska Marta, Steiner Johann, Brisch Ralf, Mawrin Christian, Busse Stefan, Braun Katharina, Jankowski Zbigniew, Bernstein Hans-Gert, Bogerts Bernhard, Gos Tomasz. [Ribosomal DNA transcription in the dorsal raphe nucleus is increased in residual but not in paranoid schizophrenia](#). European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience 265 (2015): 117-126.

(punktacja: Impact Factor – 4,113, MNiSW – 30)

2) Krzyżanowska Marta, Steiner Johann, Brisch Ralf, Mawrin Christian, Busse Stefan, Braun Katharina, Jankowski Zbigniew, Bernstein Hans-Gert, Bogerts Bernhard, Gos Tomasz. [Ribosomal DNA transcription in dorsal raphe nucleus neurons is increased in residual schizophrenia compared to depressed patients with affective disorders](#). Psychiatry Research 230 (2015): 233-241.

(punktacja: Impact Factor – 2,467, MNiSW – 30)

3) Krzyżanowska Marta, Steiner Johann, Brisch Ralf, Karnecki Karol, Jankowski Zbigniew, Gos Tomasz. [Decreased ribosomal DNA transcription in dorsal raphe nucleus neurons is specific for suicide regardless of psychiatric diagnosis](#). Psychiatry Research 241 (2016): 43-46.

(punktacja: Impact Factor – 2,467, MNiSW – 30)

4) Krzyżanowska Marta, Steiner Johann, Karnecki Karol, Kaliszan Michał, Brisch Ralf, Wiergowski Marek, Braun Katharina, Jankowski Zbigniew, Gos Tomasz. [Decreased ribosomal DNA transcription in the dorsal raphe nucleus neurons differentiates between suicidal and non-suicidal deaths](#). European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience 226 (2016): 217-224.

(punktacja: Impact Factor – 4,113, MNiSW – 30)

(suma punktów: Impact Factor – **13,158**, MNiSW – **120**)

Wykaz ważniejszych skrótów użytych w streszczeniu publikacji

AgNOR – srebrochłonny organizator jąderkowy (ang. *argyrophilic nucleolar organiser*)

BD – choroba dwubiegunowa (ang. *bipolar disorder*)

DRN – jądro grzbietowe szwu (ang. *dorsal raphe nucleus*)

DSM IV i V – Diagnostyczny i Statystyczny Podręcznik Zaburzeń Psychiczych, Wydania IV i V (ang. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th and 5th Editions*)

GABA – kwas gamma-aminomasłowy (ang. *gamma-amino butyric acid*)

5-HT – 5-hydroksytryptamina (serotonina) (ang. *5-hydroxytryptamine, serotonin*)

LHb – boczna część uzdeczki (ang. *lateral habenula*)

MDD – duża depresja (ang. *major depressive disorder*)

NOR – organizator jąderkowy (ang. *nucleolar organizer*)

P – poziom znamienności (istotności) statystycznej (ang. *statistical significance level*)

PFC – kora przedczołowa (ang. *prefrontal cortex*)

rDNA – rybosomalny DNA (ang. *ribosomal DNA*)

ROC (krzywa) – (krzywa) charakterystyczno-operacyjna odbiornika (ang. *receiver operating characteristic curve*)

Streszczenie publikacji składających się na rozprawę doktorską

Wstęp

Zaburzenia ośrodkowego układu serotonergicznego implikują etiologię wielu zaburzeń psychicznych, w tym depresji (przegląd w: [3]) i schizofrenii (przegląd w: [18]). Implikują one także w sposób złożony zachowanie samobójcze (przegląd w: [9, 15]). W ostatniej, piątej edycji klasyfikacji zaburzeń psychicznych DSM V [4] przedstawiono długo oczekiwaną propozycję ujęcia tego zachowania jako odrębnego zaburzenia psychicznego, na co od lat wskazują badania neurobiologiczne (przegląd w: [9, 15]).

Jak wykazały badania neuropatologiczne układu serotonergicznego w depresji i samobójstwie, jego zaburzenia mogą być zaakcentowane w specyficznej strukturze mózgu, jaką jest DRN, mające wpływ na złożone sieci neuronalne (przegląd w: [5]). Jest ono zasadniczym źródłem unerwienia serotonergicznego PFC [14]. Z kolei obszary limbiczne PFC (tj. kora przedniej części zakrętu obręczy i kora oczodołowo-czołowa) mogą oddziaływać zwrotnie na funkcję DRN poprzez eferentne połączenia piramidowe [20], zaburzone zarówno w depresji, jak i w schizofrenii (przegląd odpowiednio w: [3, 18]). W porównaniu z licznymi badaniami pośmiertnymi DRN w zaburzeniach afektywnych i samobójstwie (przegląd w: [5, 12]), badania DRN u schizofreników prezentują się skromnie [8, 16].

NORs są obszarami chromosomalnymi utworzonymi z rDNA i białek, z których część jest srebrochłonna. W komórkach ludzkich podczas interfazy te wysrebrzone obszary NORs (AgNORs) skupione w jąderku reprezentują miejsca aktywności transkrypcyjnej i syntezy rybosomalnego RNA, stanowiącej około połowę całkowitej aktywności transkrypcyjnej w komórce. Podczas oceny barwienia metodą AgNOR w mikroskopie świetlnym AgNORs są nierozróżnialne i tworzą obszar AgNOR umiejscowiony w jąderku, lecz mniejszy od niego (w porównaniu np. z barwieniami metodą Nissla czy hematoksyliną-eozyną). Jako

substytucyjny marker biosyntezy białek i miarodajny wskaźnik integralności genomu, bardzo wrażliwy na czynniki uszkodzające go, aktywność transkrypcyjna rDNA może być pośrednio oceniana przy pomocy pomiarów parametrów AgNOR. Są to: obszar AgNOR (reprezentujący jąderko w tej metodzie barwienia), liczba AgNOR (tj. liczba obszarów AgNOR w jądrze komórkowym) i wskaźnik AgNOR będący ilorazem sumy powierzchni obszarów AgNOR w jądrze i powierzchni przekroju poprzecznego jądra (przegląd w: [12]).

Kluczowa rola aktywności transkrypcyjnej rDNA w plastyczności neuronalnej została potwierdzona badaniami neuronalnych hodowli komórkowych [10], a badania molekularne wykazały zaburzenia tej aktywności w obszarach kory półkul mózgu w zaburzeniach psychicznych (przegląd w: [13]). Poprzednie badania metodą AgNOR przeprowadzone w neuronach DRN [11] i innych struktur mózgu (przegląd w: [12]) sugerowały zaburzoną (głównie obniżoną) transkrypcję rDNA u chorych na depresję, zwłaszcza samobójców, co potwierdzają badania molekularne [17]. W oparciu o badania dotychczasowe wysnuto hipotezę, że obniżona aktywność transkrypcyjna rDNA w neuronach DRN samobójców może stanowić wykraczające poza rozpoznania psychiatryczne zjawisko o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym dla różnicowania pomiędzy zgonem samobójczym i nie-samobójczym w trudnych przypadkach sądowo-lekarskich [11, 12].

Cele

Celami ogólnymi przedstawionych prac były:

- ocena wartości diagnostycznej badań neuronów DRN metodą AgNOR w zaburzeniach psychicznych;
- wgląd w patomechanizmy tych zaburzeń.

Zostały one osiągnięte poprzez realizację następujących celów cząstkowych:

- przeprowadzenie badań DRN u pacjentów ze schizofrenią paranoidalną i rezydualną;
- przeprowadzenie badań DRN u pacjentów z epizodem depresyjnym w MDD oraz BD;
- porównanie wyników pomiędzy pacjentami ze schizofrenią i depresją oraz odrębnie pomiędzy samobójcami a nie-samobójcami z tych grup diagnostycznych;
- przeprowadzenie badań DRN u samobójców bez znanego rozpoznania psychiatrycznego w porównaniu z nie-samobójcami.

Materiały i metodyka

Badania przedstawione w **trzech pierwszych publikacjach** zostały przeprowadzone na materiale pośmiertnym uzyskanym z Magdeburgskiego Banku Mózgów. DRN było badane u 44 chorych z rozpoznanymi przyżyciowo w oparciu o kryteria DSM IV epizodem depresyjnym w przebiegu MDD lub BD (n=27) albo schizofrenią (n=17) oraz 28 osobników kontrolnych bez rozpoznań psychiatrycznych. Żaden z chorych nie był uzależniony od alkoholu bądź narkotyków ani nie spełniał kryteriów aktualnego nadużywania tych substancji wg DSM IV. W ciągu ostatnich 90 dni życia mniejsza część chorych przyjmowała leki psychotropowe. Jakościowe badanie neuropatologiczne przeprowadzone w każdym z przypadków przez doświadczonego neuropatologa nie wykazało zmian charakterystycznych dla chorób zwyrodnieniowych mózgu, nowotworu, zapalenia, zmian naczyniopochodnych lub pourazowych.

W publikacji czwartej przedstawiono badania przeprowadzone na materiale uzyskanym podczas sądowo-lekarskich sekcji zwłok w Zakładzie macierzystym. Pochodził on z mózgow 27 samobójców bez znanych rozpoznań psychiatrycznych (sytuacja najczęściej spotykana w odniesieniu do sekcji sądowo-lekarskich) i 30 osobników kontrolnych zmarłych śmiercią nagłą.

Badania uzyskały aprobatę Komisji Etycznej Uniwersytetu w Magdeburgu oraz aprobatę Komisji Etycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego jako zgodne z Deklaracją Helsińską z 1989 roku i obowiązującym prawem.

Preparatyka materiału badawczego przedstawiona w publikacjach 1, 2 i 3 odpowiadała stosowanej uprzednio [11]. Jej istotą było utrwalanie mózgu całego, izolowanie pnia z mózgu utrwalonego i po zatopieniu w parafinie skrawanie go w całości na skrawki grubości 20 µm. Po dwa skrawki z części rostralnej i kaudalnej DRN były barwione metodą AgNOR. Do badań przedstawionych w pracy 4 pień był izolowany z mózgu podczas sekcji sądowo-

lekarskiej i utrwalany. Po utrwaleniu wycinano z niego blok tkankowy obejmujący w całości DRN i zatapiano go w parafinie a następnie skrawano w całości na skrawki grubości 5 μm . Co dwóchsetny skrawek był barwiony metodą AgNOR. Barwienie to było przeprowadzane we wszystkich przedstawianych pracach w sposób stosowany uprzednio (m. in. w: [11]).

W każdym z pięciu regionów DRN (ang. *dorsal*, *ventrolateral*, *ventral*, *interfascicular*, *caudal*) parametry AgNOR były mierzone dla łącznie 40 neuronów mających dobrze widoczne granice jądra i obszaru (obszarów) AgNOR. Tym samym w każdym z analizowanych przypadków mierzono parametry AgNOR w 200 neuronach DRN.

Oznaczano liczbę i całkowite pole powierzchni przekroju elementów AgNOR (obszaru AgNOR) oraz pole przekroju jądra komórkowego w każdym z poddawanych analizie neuronów posługując się mikroskopem świetlnym (powiększenie 400 \times), wyposażonym w system cyfrowej analizy obrazu z oprogramowaniem morfometrycznym (cellSens[®], Olympus). Wyniki pomiarów uśredniano w celu otrzymania u badanego osobnika pojedynczego zestawu wartości parametrów kariometrycznych dla każdego z regionów DRN, dla jego części rostralnej i kaudalnej oraz dla całego DRN jako pojedynczej struktury anatomicznej.

Wszystkie elementy analizy statystycznej wykonywano przy pomocy pakietu statystycznego STATISTICA wersja 10 (StatSoft[®]). W pracy 4 zastosowano moduł automatycznych sieci neuronalnych tego programu zawierający procedurę ROC, pozwalającą na ocenę wartości diagnostycznej metody do różnicowania pomiędzy zgonem samobójczym i nie-samobójczym.

Wyniki i dyskusja

We wszystkich przedstawianych pracach znamienności statystyczne uzyskiwano przy uwzględnieniu DRN jako całości, tj. dla wszystkich badanych neuronów tej struktury. Obserwowany efekt może wynikać z uwarunkowań anatomicznych, ponieważ obszary unerwienia przez poszczególne regiony DRN w dużym stopniu nakładają się wzajemnie [14] pomimo zaznaczonej specjalizacji [26].

Efekty stwierdzone u schizofreników (praca 1)

Badania przeprowadzone w tej grupie diagnostycznej wykazały znamienne statystycznie powiększenie obszaru AgNOR wskazujące na wzrost aktywności transkrypcyjnej rDNA w DRN, przy czym z dalszej analizy statystycznej wynikało, że był to efekt właściwy dla podgrupy rezydualnej, na który nie miały wpływu zmienne wnikające, w tym dobowe dawki neuroleptyków oraz samobójstwo.

Było to pierwsze studium badawcze, które wykazało zmiany w DRN w schizofrenii. Ponadto było ono pierwszym przeprowadzonym w schizofrenii metodą AgNOR. Interpretacja uzyskanych wyników nie jest jednoznaczna z uwagi na skomplikowany charakter regulacji aktywności DRN (przegląd w: [22]). Jak wynika z badań neuroanatomicznych, limbiczne obszary PFC i uzdeczka (ewolucyjnie stara struktura łącząca przodomózgowie i międzymózgowie) stanowią najważniejsze źródła unerwienia DRN, wysyłające do niego glutaminianergiczne połączenia pobudzające [20]. Efektem wyjściowym aktywności tych połączeń jest hamowanie neuronów DRN, ponieważ w głównej mierze aktywują one lokalne interneurony GABAergiczne [22]. Oznacza to, że zaburzone przekąźnictwo pobudzające w tych połączeniach i/albo jego miejscowe przetwarzanie w DRN odgrywają najprawdopodobniej istotną rolę w różnicy obserwowanej pomiędzy schizofrenią rezydualną

i paranoidalną (podobnie jak pomiędzy innymi grupami porównywanymi w przedstawianych pracach).

Obniżona gęstość receptorów 5HT2A neuronów piramidowych w obszarach limbicznych PFC w schizofrenii rezydualnej [1] prowadząc do zmniejszenia aktywności tych neuronów [22], może w konsekwencji powodować obniżoną transkrypcję rDNA w neuronach DRN. Przedstawione wyniki przemawiają za występowaniem takiego efektu w badanej podgrupie pacjentów rezydualnych.

Różnice pomiędzy schizofrenią a depresją oraz samobójstwem i nie-samobójstwem w tych grupach diagnostycznych (praca 2 i 3)

Przeprowadzone badania wykazały powiększenie obszaru AgNOR w neuronach DRN wskazujące na wzrost aktywności transkrypcyjnej rDNA w schizofrenii rezydualnej w porównaniu z epizodem depresyjnym zarówno w MDD jak i BD (praca 2). Na efekt ten nie miały najprawdopodobniej wpływu inne zmienne, między innymi dawki leków psychotropowych, jak również samobójstwo. Podobnie jak w pierwszej z przedstawianych prac w odniesieniu do badania samej schizofrenii, było to nowatorskie zastosowanie metody AgNOR do porównania pomiędzy tą jednostką diagnostyczną a depresją.

Zaobserwowana różnica mogła mieć także związek z odmiennie wyrażonymi zaburzeniami receptora serotoninowego 5HT2A w obszarach limbicznych PFC, będących źródłem większości połączeń aferentnych do DRN [20]. W depresji stwierdzano przeważnie wzrost gęstości receptorów 5HT2A w limbicznych obszarach PFC, co może być związane z procesami prowadzącymi do samobójstwa (przegląd w: [24]), podczas gdy przeciwny efekt wykazano u schizofreników (przegląd w: [1]).

Liczne, bezpośrednie połączenia do DRN wysyła oprócz PFC także LHb [20], w której stwierdzono różnice morfologiczne pomiędzy depresją i schizofrenią [21]. W świetle badań

neuroobrazowych LHb jest nadmiernie aktywna w depresji [2], a ma obniżoną aktywność w schizofrenii [23]. Może to w różny sposób wpływać na aktywność transkrypcyjną rDNA w neuronach DRN. DRN otrzymuje także czynnościowo ważne połączenia z podwzgórza boczne i jądra guzowo-suteczkowate, zaangażowane w regulację snu i pobudzenia. Tym samym nieprawidłowy napływ bodźców z podwzgórza, który prawdopodobnie jest upośledzony w odmienny sposób w obu zaburzeniach [6, 7], może być jedną z przyczyn różnicy w aktywności transkrypcyjnej rDNA stwierdzonej pomiędzy depresją i schizofrenią.

Dodatkowa analiza statystyczna obu kohort wykazała zmniejszenie obszaru AgNOR i powierzchni przekroju jądra komórkowego w neuronach DRN samobójców w porównaniu z nie-samobójcami (praca 3). Pomimo tego, że efekty obserwowane u samobójców były niezależne od rozpoznania psychiatrycznego (tzn. niezależne od współchorobowości), były one bardziej zaakcentowane w depresji niż schizofrenii. Zjawisko to mogło być związane zarówno ze wspomnianymi różnicami neurobiologicznymi pomiędzy tymi jednostkami chorobowymi, jak również z mniejszą liczbą badanych schizofreników w porównaniu z pacjentami z epizodem depresyjnym (odpowiednio 17 i 27).

Zmiany zaobserwowane u samobójców bez znanego rozpoznania psychiatrycznego (praca 4)

W pracy 4 wykazano wysoce znamienne statystycznie (test U, $P < 0,00001$) zmniejszenie obszaru AgNOR wskazujące na obniżoną aktywność transkrypcyjną rDNA w neuronach DRN u samobójców bez znanego rozpoznania psychiatrycznego w porównaniu z kontrolnymi nie-samobójcami. Na efekt ten nie miały wpływu inne zmienne, w tym czas po śmierci.

Wyniki są zgodne z poprzednio opublikowanymi, które wskazywały na zmniejszoną transkrypcję rDNA u ofiar samobójstwa z depresją [11]. Wyniki uzyskane u schizofreników sugerowały podobny efekt u samobójców w porównaniu z nie-samobójcami. Oznacza to,

że zarówno poprzednie jak i obecne badania wskazują na obniżenie transkrypcji rDNA w neuronach DRN samobójców niezależnie od współchorobowości psychiatrycznej. Tym samym są one zgodne z ustalonym poglądem na osłabienie aktywności serotoninerdycznej jako wykraczające poza rozpoznania psychiatryczne zjawisko neurobiologiczne właściwe dla zachowania samobójczego (przeгляд w: [9, 5, 15]). Obniżenie aktywności transkrypcyjnej rDNA w neuronach DRN może odgrywać zasadniczą rolę w zaburzeniach plastyczności aksonów serotoninerdycznych w PFC, co stwierdzono w samobójstwie [25]. Zaburzenia te stanowią substrat morfologiczny zaburzonego przekąźnictwa serotoninerdycznego w PFC, mającego głębokie negatywne znaczenie dla regulacji behawioralnej.

Wielkość pola pod krzywą ROC większa niż 80% oraz podobne wartości czułości i specyficzności metody wskazywały na jej przydatność diagnostyczną do różnicowania pomiędzy zgonem samobójczym i nie-samobójczym [19]. Ostateczne potwierdzenie tej przydatności wymaga kontynuacji badań w celu zwiększenia liczebności porównywanych grup.

Wnioski

1. W schizofrenii rezydualnej w porównaniu z paranoidalną występuje wzrost aktywności transkrypcyjnej rDNA w neuronach DRN. Zaobserwowane zjawisko może być pomocne do różnicowania pomiędzy odrębnymi endofenotypami chorobowymi w obrębie spektrum zaburzeń psychotycznych, klasyfikowanych obecnie jako schizofrenia.
2. Wzrost aktywności transkrypcyjnej rDNA w neuronach DRN charakteryzował także schizofrenię rezydualną w porównaniu z epizodem depresyjnym w MDD i BD. Efekt ten może mieć potencjalne znaczenie diagnostyczne dla różnicowania pomiędzy schizofrenią z dominującymi objawami negatywnymi a epizodem depresyjnym w zaburzeniach afektywnych.
3. Obniżona aktywność transkrypcyjna rDNA w neuronach DRN jest specyficzna dla zgonu samobójczego w porównaniu z nie-samobójczym. Zastosowana metoda badawcza może być pomocna dla różnicowania pomiędzy nimi w medycynie sądowej w przypadkach, gdy metody tradycyjne nie pozwalają na rozstrzygnięcie.

The summary of presented studies

Introduction

The central serotonergic system is implicated in the aetiology of numerous mental disorders, including depression (for a review see: [3]) and schizophrenia (for a review see: [18]). Disturbances of the central serotonergic system are also implicated in a multifaceted way in suicidal behaviour (for reviews see: [9, 15]), which has been proposed to be an independent mental disorder in the fifth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM V [4] in accordance with numerous neurobiological research data (for reviews see: [9, 15]).

As revealed by neuropathological research on depression and suicide, abnormalities in the serotonergic system may be accentuated in a specific brain region, the DRN, which affects brain circuits (for a review see: [5]). DRN neurons provide the major serotonergic innervation to the PFC [14]. Limbic regions of the PFC (i.e. the anterior cingulate cortex and the orbitofrontal cortex) in turn may reciprocally regulate DRN function through direct pyramidal input [20] disturbed in both depression and schizophrenia (for reviews see: [3] and [18], respectively). Compared to the number of postmortem studies on the DRN in affective disorders and suicide (for reviews see: [5, 12]), reports on the DRN in schizophrenia are scanty [8, 16].

NORs are genetic loci on chromosomes that are composed of ribosomal rDNA and proteins, some of which are argyrophilic. In human interphase cells, silver-stained NORs (AgNORs) clustered together in the nucleolus represent the site of transcriptionally active NORs and ribosomal RNA synthesis, which constitutes approximately one half of entire transcriptional activity in the cell. In the AgNOR staining evaluated by light microscopy, AgNORs are indistinguishable from each other and form the AgNOR area, located in the nucleolar area but smaller than this area (compared, for instance, with haematoxylin-eosin and Nissl stainings).

As a surrogate marker of protein biosynthesis and an important sensor of cellular stress of different nature, the transcriptional activity of rDNA can be assessed by measuring AgNOR parameters. These are: AgNOR area (representing the nucleolus), AgNOR number (i.e. the number of AgNOR areas within one nucleus) and AgNOR ratio defined as the quotient of total AgNOR area in the nucleus and nuclear area (for a review see: [12]).

A key role of rDNA transcriptional activity in neuronal plasticity has been proven in neuronal culture [10] and molecular studies have revealed that this activity is disturbed in cortical areas in mental disorders (for a review see: [13]). Previous AgNOR studies of the DRN [11] and other brain structures (for a review see: [12]) in depression have suggested disturbed (predominantly decreased) rDNA transcription in neurons specifically in suicidal patients, which is consistent with molecular results [17].

Therefore, it has been hypothesised that the decreased transcriptional activity of rDNA in DRN neurons in suicide could represent a diagnosis-overreaching phenomenon of possible relevance in forensic differential diagnostics between suicidal and non-suicidal death in unclear cases [11, 12].

Objectives

General aims of presented studies were:

- the evaluation of diagnostic relevance of AgNOR staining method in DRN neurons in mental disorders;
- the research of pathomechanisms of mental disorders.

These general aims were achieved by the realization of following partial aims:

- the investigation of the DRN of paranoid and residual schizophrenia patients;
- the investigation of the DRN of depressed patients from both MDD and BD diagnostic groups;
- the comparisons between results in depressed and schizophrenia patients, and in suicide and non-suicide groups containing cases from both diagnostic cohorts;
- the investigation of the DRN of suicide victims with unknown psychiatric diagnosis compared to non-suicidal cases.

Material and methods

The material from mentally healthy controls (n=28) and patients with established diagnoses of depressive episode in MDD and BD (n=27) or paranoid and residual schizophrenia (n=17) according to DSM IV criteria, and no history of substance abuse, was obtained from the Magdeburg Brain Bank (Germany) (**studies presented in papers 1, 2 and 3**). During the last 90 days prior to death a minority of patients was treated with psychotropic medication. Qualitative neuropathological changes suggestive of vascular, traumatic, inflammatory, neoplastic and neurodegenerative processes were excluded by an experienced neuropathologist.

Brainstems of suicide victims (n=27) with unknown psychiatric comorbidity (typical for most of suicide cases autopsied in the Department of Forensic Medicine) and sudden death controls (n=30) were obtained during routine forensic autopsies (**the study presented in paper 4**).

The studies has been approved by the local ethics committees of the University of Magdeburg and the Medical University of Gdańsk as performed in accordance with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki of 1989.

The tissue preparation in studies presented in papers 1, 2 and 3 was performed as previously described [11], i.e. the entire brain was fixated, the brainstem subsequently was isolated, embedded in paraffin and cut along the entire rostrocaudal axis in 20- μ m thick transverse sections. Two sections from the rostral and two sections from the caudal part of DRN were stained for AgNOR. For the study presented in paper 4, brainstem was isolated from the brain on forensic autopsy. After being fixated, tissue block containing the entire DRN was isolated from the brainstem and embedded in paraffin. Subsequently, serial 5- μ m thick transverse sections were cut along the entire rostrocaudal axis of the DRN. Every 200th section was mounted and stained for AgNOR. The AgNOR staining in all studies was performed as previously described [11].

In each of the five DRN subnuclei (i.e. the dorsal, ventrolateral, ventral, interfascicular and caudal) AgNOR parameters were determined in 40 neurons with clearly visible borders of the nucleus and AgNOR areas. Thus, the AgNOR parameters of 200 DRN neurons were investigated in each of the cases. The number of investigated neurons was established arbitrarily in accordance with the guidelines on quantitative evaluation and the diagnostic and research studies employing the AgNOR method. The AgNOR areas (composed of clustered AgNORs and representing the nucleoli), their number and the nuclear area within a single neuron (sampled by 400× magnification) were determined using a light microscope attached to a computer image analysis system (cellSens[®] Standard, Olympus, Japan). The sampled measures were averaged to derive single values for each DRN subnucleus, rostral and caudal subdivisions of the DRN and the entire DRN as a single anatomical structure in the investigated individual.

Statistical analyses were performed with the data analysis software system STATISTICA version 10 (StatSoft[®]). In the study of forensic autopsy material (paper 4), STATISTICA automatic neuronal networks module containing ROC procedure was applied for the evaluation of potential diagnostic value of the method for the differentiation between suicidal and non-suicidal death.

Results and discussion

In all presented studies statistical significance was shown in the cumulative analysis of all the DRN subnuclei. This phenomenon could be related to the characteristics of DRN efferents, which overlap in target structures [14] in spite of the accentuated specialisation [26].

Effects observed in schizophrenia (paper 1)

The first study has revealed a significantly increased AgNOR area in DRN neurons suggestive of their increased rDNA transcriptional activity in schizophrenia patients versus controls, particularly in the subgroup of patients with residual schizophrenia. The observed effect was not confounded by other variables, including antipsychotic medication and suicide.

The present AgNOR study of the DRN is the first one which has revealed abnormalities in this structure specific for schizophrenia. It is also the first one, which has implemented this staining method in schizophrenia. However, the interpretation of results is not unequivocal due to the very sophisticated nature of DRN activity regulation (for a review see: [22]). Tracing studies consistently reveal that the limbic PFC and the habenula, an evolutionarily conserved link between the forebrain and the midbrain, are the main sources of DRN afferents [20]. However, the net effect of their excitatory glutamatergic inputs consists in the inhibition of DRN neurons, as they activate predominantly local GABAergic neurons [22]. Therefore, the disturbed inputs from both regions and/or their disturbed local transformation in the DRN play most probably an important role in the observed difference between residual and paranoid patients (similarly as between other groups compared in presented studies).

The decreased 5HT_{2A} receptors on pyramidal neurons in the limbic PFC in residual schizophrenia [1] with subsequent hypoactivity of these neurons [22] might lead to the increased rDNA transcription in DRN neurons. The presented results suggest that this effect occurred in the investigated subgroup of residual patients.

Differences observed between schizophrenia and depressed patients and between suicidal and non-suicidal patients from these diagnostic groups (papers 2 and 3)

The second study revealed a significantly increased AgNOR area in DRN neurons suggestive of their increased rDNA transcriptional activity in residual schizophrenia versus depressive episode in both MDD and BD (paper 2). The observed effect was most probably not confounded by other variables, among them suicide and medication. To the best of author's knowledge, the present AgNOR study of the DRN is the first one performed on human material, which implemented this staining method to the comparison between depression and schizophrenia.

Also this effect may be related to the differentially accentuated disturbances in 5HT_{2A} receptors in limbic PFC areas, which provide the most afferents to the DRN [20]. The post-mortem studies on depression revealed predominately an increased density of these receptors in the limbic PFC, which may be related to the impact of suicide (for a review see: [24]), whereas the opposite effect was suggested by schizophrenia studies (for a review see: [1]). Apart from the PFC, the LHb provides another extensive afferent input to the DRN [20]. A significant difference in habenular morphology between depression and schizophrenia was found previously [21]. In the view of neuroimaging data, the LHb is hyperactive in depression [2] and hypoactive in schizophrenia [23]. This could differentially influence the rDNA transcriptional activity in DRN neurons. The DRN receives also functionally important inputs from the lateral hypothalamus and tuberomamillary nucleus, involved in sleep and arousal regulation. Therefore, an abnormal input from the hypothalamus, which seems to be disturbed in different ways in both disorders [6, 7], may be also involved in the observed difference regarding rDNA transcription between them.

Additional statistical analysis of both diagnostic cohorts revealed significantly decreased AgNOR and nuclear areas in DRN neurons suggestive of decreased rDNA transcriptional activity in suicidal compared to non-suicidal patients (paper 3). The effects were observed in suicidal patients regardless of their underlying psychiatric diagnosis (i.e. independent on psychiatric comorbidity). However, they were more accentuated in affective disorders than in schizophrenia, which may be related to their different neurobiology and the smaller number of schizophrenia patients compared to depressed ones (n=17 and 27, respectively).

Effects observed in suicide victims with unknown psychiatric diagnosis (paper 4)

This study revealed a highly significant decrease (U-test $P < 0,00001$) of AgNOR area in DRN neurons suggestive of their decreased rDNA transcriptional activity in suicide victims versus non-suicidal controls. The observed effect was not confounded by other variables, among them postmortem interval.

The results are in line with previously published findings, which suggested a decreased rDNA transcription in DRN neurons specific for depressed suicide completers [11]. The findings in schizophrenia suggest a similar effect in suicidal compared to non-suicidal patients. Therefore, our both previous and present results may suggest that the decreased rDNA transcription in DRN neurons is accentuated in suicide regardless of psychiatric comorbidity. In this way they correspond also with the well-established view on serotonergic hypofunction as a diagnose-overreaching neurobiological phenomenon symptomatic of suicidal behaviour (for reviews see: [5, 9, 15]).

The deteriorated rDNA activity in DRN neurons might play a fundamental role in the disturbed plasticity of serotonergic terminals in the PFC observed in suicide [25]. This abnormality provides a morphological substrate for the disturbed serotonergic neurotransmission in the PFC with profound consequences for the behavioural regulation.

The area under ROC curve higher than 80% with similar sensitivity and specificity values suggest a diagnostic value of present AgNOR technique for the differentiation between suicidal and non-suicidal death [19]. However, the confirmation of diagnostic relevance of the method needs further study of more numerous cohorts.

Conclusions

1. Increased rDNA transcriptional activity in DRN neurons is specific for patients with residual compared to paranoid schizophrenia. The observed phenomenon might be useful to identify distinct disease endophenotypes within the spectrum of psychotic disorders, which are currently classified as schizophrenia.
2. Increased rDNA transcriptional activity in DRN neurons is also specific for residual schizophrenia compared to MDD and BD depressed patients. The observed effect could have a potential diagnostic value for the differentiation between schizophrenia with predominant negative symptoms and depressive episodes in affective disorders.
3. Decreased rDNA transcriptional activity in DRN neurons is specific for suicidal compared to non-suicidal death. Therefore, the presented method could aid forensic differentiation diagnostics between them in cases where traditional methods do not allow to solve this problem.

Piśmiennictwo cytowane w streszczeniu publikacji składających się na rozprawę doktorską

1. Abi-Dargham, A. Alterations of serotonin transmission in schizophrenia. *International Review of Neurobiology* 78 (2007): 133-164.
2. Aizawa, H., Ciu, W., Tanaka, K., Okamoto, H. Hyperactivation of the habenula as a link between depression and sleep disturbance. *Frontiers in Human Neuroscience* 7 (2013): 1-6.
3. Altieri S.C., Singh Y.S., Sibille E., Andrews A.M.: Serotonergic pathways in depression. W: Álamo, C. and López-Muñoz, F. (wyd.) *Neurobiology of Depression*, s. 143-170. New York, CRC Press, 2013.
4. American Psychiatric Association.: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed. Arlington: American Psychiatric Publishing, 2013.
5. Bach H., Arango V.: Neuroanatomy of serotonergic abnormalities in suicide. W: Dwivedi, Y. (wyd.) *The Neurobiological Basis of Suicide*, s. 11-27. New York, CRC Press, 2012.
6. Bernstein, H.G., Krause, S., Krell, D., Dobrowolny, H., Wolter, M., Stauch, R., Ranft, K., Danos, P., Jirikowski, G.F., Bogerts, B. Strongly reduced number of Parvalbumin-Immunoreactive projection neurons in the mammillary bodies in schizophrenia: further evidence for limbic neuropathology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1096 (2007): 120-127.
7. Bernstein, H.G., Klix, M., Dobrowolny, H., Brisch, R., Steiner, J., Bielau, H., Gos, T., Bogerts, B. A postmortem assessment of mammillary body volume, neuronal number and densities, and fornix volume in subjects with mood disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 262 (2012): 637-646.

8. Craven, R.M., Priddle, T.H., Crow, T.J., Esiri, M.M. The locus coeruleus in schizophrenia: a postmortem study of noradrenergic neurones. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 31 (2005): 115-126.
9. Ernst, C., Mechawar, N., Turecki, G. Suicide neurobiology. *Progress in Neurobiology* 89 (2009): 315-333.
10. Gomes, C., Smith, S.C., Youssef, M.N., Zheng, J.J., Hagg, T., Hetman, M. RNA polymerase 1-driven transcription as a mediator of BDNF-induced neurite outgrowth. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (2011): 4357-4363.
11. Gos, T., Krell, D., Brisch, R., Bielau, H., Trübner, K., Steiner, J., Bernstein, H.G., Bogerts, B. Demonstration of decreased activity of dorsal raphe nucleus neurons in depressed suicidal patients by the AgNOR staining method. *Journal of Affective Disorders* 111 (2008): 251-260.
12. Gos, T., Steiner, J., Krell, D., Bielau, H., Mawrin, C., Krzyżanowski, M., Brisch, R., Pieśniak, D., Bernstein, H.G., Jankowski, Z., Braun, K., Bogerts, B. Ribosomal DNA transcription in the anterior cingulate cortex is decreased in unipolar but not bipolar depression. *Psychiatry Research* 210 (2013): 338-345.
13. Hetman, M., Pietrzak, M. Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends in Neuroscience* 35 (2012): 305-314.
14. Jacobs, B.L., Azmitia, E.C. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews* 72 (1992): 165-229.
15. Mann, J.J. The serotonergic system in mood disorders and suicidal behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 368 (2013): 20120537. doi:10.1098/rstb.2012.0537
16. Matthews, P.R., Harrison, P.J. A morphometric, immunohistochemical, and in situ hybridization study of the dorsal raphe nucleus in major depression, bipolar disorder,

- schizophrenia, and suicide. *Journal of Affective Disorders* 137 (2012): 125-134.
17. McGowan, P.O., Szyf, M. The epigenetics of social adversity in early life: implications for mental health outcomes. *Neurobiology of Disease* (2010): 66-72.
18. Meltzer, H.Y., Massey, B.W. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Current Opinion in Pharmacology* 11 (2011): 59-67.
19. Perlis, R.H. Translating biomarkers to clinical practice. *Molecular Psychiatry* 16 (2011): 1076-1087.
20. Peyron, C., Petit, J.M., Rampon, C., Jouvet, M., Luppi, P.H. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 82 (1998): 443-468.
21. Ranft, K., Dobrowolny, H., Krell, D., Biela, H., Bogerts, B., Bernstein, H.G. Evidence for structural abnormalities of the human habenular complex in affective disorders but not in schizophrenia. *Psychological Medicine* 40 (2010): 557-567.
22. Sharp, T., Boothman, L., Raley, J., Qu  r  e, P. Important messages in the 'post': recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *Trends in Pharmacological Sciences* 28 (2007): 629-636.
23. Shepard, P.D., Holcomb, H.H., Gold, J.M. The presence of absence: habenular regulation of dopamine neurons and the encoding of negative outcomes. *Schizophrenia Bulletin* 32 (2006): 417-421.
24. Stockmeier, C.A. Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter. *Journal of Psychiatric Research* 37 (2003): 357-373.
25. Underwood, M.D., Kassir, S.A., Bakalian, M.J., Galfalvy, H., Mann, J.J., Arango, V. Neuron density and serotonin receptor binding in prefrontal cortex in suicide. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 15 (2012): 435-447.

26. Vasudeva, R.K., Lin, R.C.S, Simpson, K.L., Waterhouse, B.D. Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitregeric cell groups. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 41 (2011): 281-293.