



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Molecular pathology of suicide

A postmortem study

Zhang, L.

Publication date

2023

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Zhang, L. (2023). *Molecular pathology of suicide: A postmortem study*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

CHAPTER 11

SUMMARY (SAMENVATTING)

SUMMARY

Suicide is a major health problem as every year, it terminates approximately 700,000 documented human lives, while worldwide, many more people commit suicide. Individuals with a suicidal tendency have a 6 times higher chance to have a psychiatric illness compared to control subjects. The research in this thesis describes molecular alterations in the human brain in relation to suicide and we follow four novel points of view. First, we investigated the molecular signature of suicide, independent of the underlying psychiatric disorder. Second, we demonstrated that suicidality had distinct molecular features from completed suicide. Third, the classifications of suicide (i.e., suicidal ideations, suicide attempts and completed suicide), as well as the consequences of suicidality (non-fatal and fatal), are key topics to consider when studying the pathophysiology of suicide. Fourth, since brain samples with a short postmortem delay enable a better preservation of suicide-specific molecular fingerprints, we studied for the first time the molecular alterations in the brains of legal euthanasia donors from the Netherlands Brain Bank.

In **Chapter 1**, we provide a brief introduction to suicide, and its relation to underlying psychiatric disorders, age, gender, and the current limited efficacy of available treatments. Since the majority of antidepressants are not able to provide sound evidence in reversing suicidal thinking or behaviors, or even may trigger them under some specific circumstances, it is concluded that novel anti-suicide treatments are needed, preferably on the basis of the molecular mechanisms that are specific for suicide rather than for the pre-existing psychiatric disorders. We focused in our research on brain networks that are important for suicide, consisting of the prefrontal cortex (PFC), hypothalamus and hippocampus. Recent neuroimaging evidence has demonstrated that these three regions are involved in mood, impulsivity and predicting the subjective sensation of stress in humans. In the present thesis, we focused on the molecular changes in this potential circuit in relation to suicide. We further highlight the value of introducing brain samples from donors who died by legal euthanasia and review existing knowledge on the brain regions investigated in our studies. Individuals who died of legal euthanasia were subdivided into patients with mood disorders (MD) (to compare differences between suicide behaviors and suicidal thoughts) and controls (without neurological or psychiatric disorders, but who died of non-neuronal diseases such as cancer).

When studying the neurobiological underpinning of major depressive disorder (MDD) and suicide, our previous research had found aberrant expression of genes involved in neuron-glia interactions in the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) and anterior cingulate cortex (ACC). In **Chapter 2**, we investigated, therefore, the expression of glia-related genes in the DLPFC and ACC in MDD patients in relation to, suicide, and psychosis. We found that changes in gene expression in astrocytes, microglia, and oligodendrocytes in MDD were related to specific brain areas, suicide or psychotic features. It was proposed that these changed glial transcripts may relate to altered neuronal functions, including dopamine and gamma-aminobutyric acid

signaling, blood-brain barrier permeability, innate immune response and neuroinflammation, platelet coagulation, and myelin stability. Of interest, we found that *CD68*, a microglial gene that was functionally related to phagocytosis, was specifically elevated in the ACC of MDD patients who completed suicide.

Patients with bipolar disorder (BD) have higher risks of committing suicide than patients with other psychiatric disorders or physical diseases. Adequate treatments for BD are key to reduce the prevalence of suicide in this disorder. It has been clinical consensus that sex is a non-negligible confounder in designing BD therapies. However, the molecular basis of sex differences in BD was poorly understood. In **Chapter 3**, we compared suicidal and non-suicidal patients with BD and found differences in gene expression in the DLPFC, involving microglial phagocytosis and purinergic homeostasis. In addition, we demonstrated that the DLPFC is, so far, the only area that presented overall sex-biased characteristics in glial gene expression in BD patients. There were 14 glia-related genes that were expressed at significantly higher levels in males versus females, in all three glial cell types, particularly in patients with psychotic features. Therefore, in **Chapter 4**, we reviewed the broader literature for evidence of sex differences of BD in epidemiology, cognition, clinical manifestation, neuroimaging, neurobiological mechanisms, and highlight the DLPFC as a key niche in providing the molecular basis for these differences.

Schizophrenia (SCZ) patients have a higher suicide rate compared to the general population, leading to an average decrease in life expectancy by at least 20 years. In **Chapter 5**, we studied glia-related gene expression in the DLPFC and ACC in relation to SCZ and suicide. We found differential changes in astrocyte and microglia genes in the prefrontal subregions in relation to SCZ and suicide, indicating possible disturbances of glia homeostasis in these conditions. The changes were related to glutamate-dopamine interaction, microglia phagocytosis, and purinergic metabolism. The expression of the purinergic receptor gene *P2RY12* was specifically increased in suicidal versus non-suicidal patients and controls.

Recent epidemiological studies have associated peripheral progesterone levels with the risk of suicide. In **Chapter 6**, we mapped the distribution of progesterone receptors (PR) in the human hypothalamus in relation to age and gender and characterized its (co-)expression in specific cell types. The infundibular nucleus (INF) appeared to be the primary hypothalamic structure via which progesterone modulates stress-related neural circuitry. Subsequently, we determined the relationship between PR co-labeled neurons in the INF and suicide, and we found that a high proportion (approximately 40%) of pro-opiomelanocortin (POMC) neurons that co-expressed PR, was related to accomplished suicide in patients with MD. There was a reciprocal relationship in control subjects between the numbers of PR co-expressing neurons in the INF, and peptidergic neurons (corticotropin-releasing hormone neurons and thyrotropin-releasing hormone neurons) in the paraventricular nucleus. In this study, brain samples from donors who died of legal euthanasia were for the first time embedded in a postmortem study to investigate the molecular signature related to suicidal ideations. The observations in this study indicate

the involvement of the sex hormones and endogenous opioid system in the pathophysiology of suicide.

In **Chapter 7**, we reviewed the current knowledge of molecular neuropathology in the hippocampus in suicide. We discussed the cognitive dysfunctions associated with suicide risk and several leading theories of suicide, including the involvement of the serotonergic system, Wnt pathway and brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin receptor kinase B signaling, and we showed evidence for their roles in suicide and treatment. The neurobiological changes exhibited by subjects who completed suicide are generally considered as strong molecular features of their underlying mental illnesses. To further investigate the molecular independence of suicide, we proposed to apply in the future advanced techniques, i.e., single-nucleus RNA sequencing and mass spectrometry histochemistry on hippocampal samples from donors who died by suicide or legal euthanasia. This may lead to further clarifying the etiology of suicide and develop the novel therapeutic strategies.

In **Chapter 8**, we demonstrated that the hippocampus encoded fatal suicidal ideations in the dentate gyrus (DG) by showing a large number of granule cell nuclei with a purinergic receptor gene *P2RX7* expression, notably independent of an underlying MD, i.e., MDD or BD. In comparison to the controls, patients with MD further showed a general microglial dyshomeostasis throughout their hippocampal formation. In addition, *P2RY12*⁺ microglia with segmented processes were remarkably present in the superficial layers of the medial entorhinal cortex, specifically in individuals with fatal suicidality. In the hypothalamic stress-related supraoptic nucleus, *P2RY12*⁺ microglia expression was elevated in MD and even higher when MD was accompanied by fatal suicidality. In the prefrontal cortex, *P2RX7* transcripts sharply dropped in suicidal individuals, which may represent a removal of the prefrontal inhibition on the hippocampus and hypothalamus. Another novel finding was that suicide-specific molecular features faded as the postmortem interval prolonged.

When comparing suicide with its comorbid psychiatric disorders, we could distinguish four types of neurobiological features: First, fatal suicidality had distinct molecular characteristics, which were independent of the psychiatric background. Second, when a neuropsychiatric disorder is comorbid, the suicide/suicidality-associated molecular alterations occurred as signs of disease progression. Third, specific sets of molecules were sensitive to both suicide and psychiatric disorders. Fourth, completed suicide, or the development of suicidality, does not confound the molecular changes linked to comorbid psychiatric disorders. We highlight the significance of the hippocampal dentate gyrus and entorhinal cortex in this respect for future research.

We realize that genetic and epigenic risk factors that provide a vulnerability for specific psychiatric disorders cannot all be seamlessly integrated as therapeutic targets for suicide treatment. Exploring the specific molecular basis of suicide remains the most urgent topic for

research. In **Chapter 9**, we have disclosed the significance of using brain samples from donors who died by legal euthanasia as novel potent research materials in suicide research. These samples can provide the biological signatures of suicide without psychiatric disturbance. Their short and precise PMDs allow the preservation of molecular clues that were ignored in previous studies. Importantly, the major population of suicide, worldwide, often lack mental health care, which has impeded anti-suicidal treatments. Unraveling the molecular basis specific to suicide, therefore, can enable a better therapeutic design for suicidal individuals with or without psychiatric diagnosis.

In conclusion (**Chapter 10**), we propose that specific biological indicators in key brain areas, as described in this thesis, appear strongly involved in, and likely decisive for fatal suicidality. The molecular alterations related to the different stages of suicide may be either independent or (partially) overlapping with the alterations observed in the underlying psychiatric disorders. Following this line of research, we will further dissect the neuropathology of suicide on the basis of its severity and outcome in key regions, and thereby for the first time profile a comprehensive neurobiological landscape that could help provide a basis for novel therapies.

SAMENVATTING

Zelfdoding (suicide) is een wereldwijd gezondheidsprobleem. Het maakt per jaar een einde aan ongeveer 700.000 registreerde mensenlevens, terwijl een veelvoud hiervan een poging tot zelfdoding doen en/of niet geregistreerd worden. Suïcidale neiging komen 6 maal vaker voor bij mensen met een psychiatrische ziekte dan bij controle personen. Het onderzoek in dit proefschrift betreft moleculaire veranderingen bij zelfdoding vanuit vier nieuwe gezichtspunten. Ten eerste onderzochten wij of de moleculaire veranderingen bij suïcide onafhankelijkheid waren van de onderliggende psychiatrische stoornis. Ten tweede toonden wij aan dat suïcidaliteit andere moleculaire kenmerken had dan een voltooide suïcide. Ten derde werd de pathofysiologie van suïcide bestudeerd in relatie tot de verschillende classificaties/fases; suïcidale gedachten, suïcidepogingen en voltooide suïcide, en de gevolgen van suïcidaliteit (niet-dodelijk en dodelijk). Ten vierde bestudeerden wij voor het eerst de moleculaire veranderingen in de hersenen van donoren van de Nederlandse Hersenbank die overleden na legale euthanasie. Hersenmateriaal met een korte postmortem tijd maakt het beter mogelijk om suïcide-specifieke moleculaire veranderingen te kunnen bestuderen.

In **Hoofdstuk 1** hebben we een korte inleiding gegeven over zelfdoding en de relatie met onderliggende psychiatrische stoornissen, leeftijd, geslacht en de beperkte effectiviteit van huidige behandelingsopties. Aangezien de meeste antidepressiva niet in staat zijn om de suïcidale gedachten of gedragingen te keren, en deze in sommige omstandigheden suïcide zelfs kunnen uitlokken, wordt geconcludeerd dat nieuwe behandelingen van suïcide moeten worden gevonden. Idealiter gebeurt dit op basis van de moleculaire mechanismen die specifiek zijn voor suïcide in plaats van voor de onderliggende psychiatrische stoornissen. Wij hebben ons in ons onderzoek gericht op een hersen-netwerk dat belangrijk is voor suïcide en dat bestaat uit de prefrontale cortex (PFC), de hypothalamus en de hippocampus. Recente neuroimaging studies tonen aan dat het neurale netwerk van deze drie regio's een rol spelen bij stemming, impuls controle en de subjectieve sensatie van stress bij mensen voorspelt. In dit proefschrift bestudeerden we de moleculaire veranderingen bij zelfdoding in dit circuit. We benadrukken het belang van hersenweefsel van donoren die stierven door legale euthanasie en bespreken de beschikbare kennis over de hersengebieden die werden onderzocht in onze studies. Personen die stierven door legale euthanasie werden onderverdeeld in patiënten met stemmingsstoornissen (MD) (om de verschillen tussen zelfdodingsgedrag en suïcidale gedachten te vergelijken) en controles (patiënten zonder neurologische of psychiatrische stoornissen die stierven aan lichamelijke ziekten zoals kanker).

Ons eerdere onderzoek heeft zich gericht op de dorsolaterale prefrontale cortex (DLPFC) en de anterieure cingulaire cortex (ACC), hierin vonden we dat de genexpressie van moleculen betrokken bij neuron-glia interacties veranderd was specifiek in relatie tot depressie (MDD) en suïcide. In **Hoofdstuk 2** onderzochten wij daarom de expressie van glia-gerelateerde genen in

de DLPFC en ACC bij MDD-patiënten maar nu in relatie tot suïcide en psychose. Wij vonden veranderingen in de genexpressie van astrocyten, microglia en oligodendrocyten bij MDD, die gerelateerd waren aan specifieke hersengebieden, suïcide en psychotische kenmerken. We stellen voor dat deze veranderde glia transcriptwaarden gerelateerd zijn aan veranderde neuronale functies zoals dopamine en gamma-aminoboterzuur neurotransmissie, doorlaatbaarheid van de bloed-hersenbarrière, schade aan het centrale zenuwstelsel, de immuunrespons en neuro-inflammatie, stolling door bloedplaatjes en myeline stabiliteit. Interessant is dat *CD68*, een microglia-gen betrokken bij fagocytose, specifiek verhoogd was in de ACC van MDD-patiënten na zelfdoding.

Patiënten met een bipolaire stoornis (BD) lopen een groter risico op zelfdoding dan patiënten met andere psychiatrische stoornissen of lichamelijke medische aandoeningen. Adequate behandeling van BD en de suicidaliteit is essentieel om de prevalentie van suïcide bij deze stoornis te verminderen. Er bestaat klinische consensus dat het geslacht van de patiënt een niet te verwaarlozen confounder is bij het zoeken naar BD-therapieën. De moleculaire basis van sekseverschillen bij BD wordt echter slecht begrepen. In **Hoofdstuk 3** vonden wij in de DLPFC verschillen in genexpressie tussen suïcidale en niet-suïcidale patiënten met BD die gerelateerd waren aan microgliale fagocytose en purinerge homeostase. Bovendien toonden wij aan dat de DLPFC tot dusver het enige gebied is dat algemene geslachts-gebonden kenmerken vertoont in glia genexpressie bij BD-patiënten. Veertien glia-gerelateerde genen kwamen hoger tot expressie bij mannen versus vrouwen, en in alle drie de glia celtypes, in het bijzonder bij patiënten met psychotische kenmerken. In **Hoofdstuk 4** geven we een breder overzicht van de sekseverschillen bij BD mbt epidemiologie, cognitie, klinische manifestaties, neuroimaging en neurobiologische mechanismen, en belichten we de rol van moleculaire veranderingen in de DLPFC als belangrijke hub bij de mogelijke basis voor deze verschillen.

In vergelijking met de algemene bevolking, plegen naast BD, ook schizofrenie patiënten (SCZ) vaak suïcide, en hun levensverwachting is dientengevolge minstens 20 jaar lager. In **Hoofdstuk 5** bestudeerden wij glia-gerelateerde genexpressie in de DLPFC en ACC in relatie tot SCZ en suïcide. Wij vonden differentiële veranderingen in astrocyt- en microglia-genen in de prefrontale subregio's in relatie tot SCZ en suïcide, wat wijst op mogelijke verstoringen van de glia homeostase in deze condities. Deze veranderingen waren gerelateerd aan glutamaat-dopamine interactie, microglia fagocytose, en purinerge stofwisseling. Ook hier was de expressie van het purinerge receptorgen *P2RY12* specifiek verhoogd bij suïcidale patiënten in vergelijking met niet-suïcidale patiënten en controles.

Recente epidemiologische studies hebben perifere progesteron niveaus in verband gebracht met het risico op zelfdoding. In **Hoofdstuk 6** bestudeerden we daarom de distributie van progesteron-receptoren (PR) in de menselijke hypothalamus in relatie tot leeftijd en geslacht, en karakteriseerden wij de (co-)expressie ervan in specifieke celtypes. De infundibulaire kern (INF) bleek de primaire hypothalamische structuur te zijn die rijk is aan PR en via welke progesteron

stress-gerelateerde neurale circuits kan moduleren. Vervolgens bepaalden wij de relatie tussen neuronen in de INF die PR tot co-expressie brachten en zelfdoding, en we vonden dat een hoog aandeel (ongeveer 40%) van de pro-opiomelanocortine (POMC) neuronen de PR tot co-expressie brachten bij patiënten met MD na een voltooide zelfdoding. Bij controlepersonen was er een reciproke omgekeerd evenredige relatie tussen neuronen die PR tot co-expressie brachten in de INF en peptiderge neuronen in de paraventriculaire kern. In deze studie werd voor het eerst post-mortem hersenweefsel opgenomen van donoren die door legale euthanasie overleden waren, om de moleculaire veranderingen bij suïcidale gedachten te onderzoeken. De waarnemingen in deze studie wezen op de betrokkenheid van geslachtshormonen en het endogene opioïde systeem bij de pathofysiologie van zelfdoding.

Hoofdstuk 7 geeft een overzicht van de huidige kennis van de moleculaire neuropathologie van de hippocampus bij suïcide. We bespreken de cognitieve stoornissen die in verband worden gebracht met het risico op zelfdoding en verschillende toonaangevende theorieën over zelfdoding, waaronder het serotoninerge systeem, Wnt-signalering en de brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin receptor kinase B signalering, en bespreken hun rol bij zelfdoding en behandeling. De neurobiologische veranderingen die zich voordoen bij personen na zelfdoding, worden over het algemeen beschouwd als sterke moleculaire kenmerken van de onderliggende psychiatrische ziekte. Om de moleculaire onafhankelijkheid van zelfdoding verder te onderzoeken stelden wij voor om in de toekomst geavanceerde technieken toe te passen, zoals single-nucleus RNA sequencing en massaspectrometrie histochemie op hippocampaal weefsel van donoren die stierven door zelfdoding of na legale euthanasie, om zo de etiologie en mechanismes van zelfdoding verder te verduidelijken en op termijn nieuwe therapeutische strategieën te kunnen ontwikkelen.

In **Hoofdstuk 8** ontdekten wij dat in de hippocampus van mensen met fatale suïcidale gedachten, de granulaire celkernen van de gyrus dentatus (DG) een sterke toename laten zien van de expressie van het purinerge receptor gen *P2RX7*, onafhankelijk van de onderliggende MD, d.w.z. MDD of BD. In vergelijking met de controles vertoonden patiënten met MD een algemene verstoorde homeostase van microglia genen in de gehele hippocampus. Bovendien waren *P2RY12*⁺ microglia met gesegmenteerde processen opvallend veel aanwezig in de oppervlakkige lagen van de mediale entorhinale cortex bij personen met fatale suïcidaliteit. In de hypothalamus, stressgerelateerde supraoptische kern kwamen *P2RY12*⁺ microglia meer tot expressie bij MD en de expressie werd zelfs hoger wanneer MD gepaard ging met fatale suïcidaliteit. In de prefrontale cortex daalden *P2RX7* transcripten sterk bij suïcidale personen, wat zou kunnen wijzen op een mogelijke remming van de prefrontale inhibitie op de hippocampus en hypothalamus. Een andere nieuwe bevinding was dat suïcide specifieke moleculaire kenmerken minder groot werden naarmate het postmortem interval langer werd.

Er waren verder vier soorten neurobiologische kenmerken als we zelfdoding en co-morbide psychiatrische stoornissen vergelijken: ten eerste heeft fatale suïcidaliteit aparte moleculaire

kenmerken, onafhankelijk van de psychiatrische achtergrond. Ten tweede, wanneer er sprake is van een co-morbide neuropsychiatrische stoornis, worden de suïcide/suïcidaliteit-geassocieerde moleculaire veranderingen vooral gevonden in relatie tot ziekteprogressie. Ten derde waren er moleculen die veranderd waren voor bij zowel suïcide als bij een psychiatrische stoornis. Ten vierde, voltooide zelfdoding of de ont-wikkeling van suïcidaliteit zijn geen confounder voor de moleculaire veranderingen bij de co-morbide psychiatrische stoornissen. Wij benadrukken dan ook het belang van de gyrus dentatus van de hippocampus en de entorhinale cortex voor toekomstig onderzoek naar suïcide.

Wij beseffen dat genetische en epigenetische kwetsbaarheden die het risico op psychiatrische stoornissen beïnvloeden, niet direct kunnen worden gebruikt als mogelijke therapeutische doelwitten voor de behandeling van suïcide, omdat dit complex is, en bv ook vroege levenservaringen een rol spelen. Echter, een beter begrip van de moleculaire basis van zelfdoding blijft van urgent belang voor onderzoek. In **Hoofdstuk 9** hebben we de betekenis besproken van het gebruik van hersenmonsters van donoren na legale euthanasie als nieuw, waardevol onderzoeksmateriaal voor onderzoek naar zelfdoding. Dit weefsel kan helpen een moleculaire ‘signatuur’ van zelfdoding per se op te leveren, zonder een verstoring door bv de postmortem tijd of de onderliggende psychiatrische aandoening. Hun korte en nauwkeurige postmortem tijd maakt het mogelijk moleculaire veranderingen te zien die in eerdere studies over het hoofd werden gezien. Nog belangrijker is dat de grote populatie suïcidale mensen wereldwijd vaak geen toegang heeft tot de geestelijke gezondheidszorg, wat anti-suïcidale behandelingen of therapie belemmert. Beter begrip van de specifieke moleculaire basis voor zelfdoding zou op termijn nieuwe therapie mogelijk kunnen maken voor suïcidale personen met of zonder psychiatrische diagnose.

Als conclusie (**Hoofdstuk 10**) stellen wij dat biologische indicatoren in de belang-rijkste hersengebieden die in dit proefschrift zijn beschreven, bepalend lijken te zijn voor het in gang zetten van suïcide. De moleculaire veranderingen, gerelateerd aan de verschillende stadia van suïcide, kunnen onafhankelijk of (gedeeltelijk) overlappend zijn met de veranderingen die veroorzaakt worden door de onderliggende psychiatrische stoornissen. Volgens deze lijn van onderzoek, waarbij de specifieke moleculaire signatuur voor suïcide in kaart gebracht wordt, zullen wij in de toekomst de neuropathologie van suïcide verder kunnen ontleden op basis van de ernst en het resultaat in belangrijke hersengebieden, en zo mogelijk een meer compleet neurobiologisch ‘landschap’ kunnen verkrijgen wat gebruikt kan worden voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën om suïcide te voorkomen.