

# effects of prenatal benzodiazepine exposure on opioid systems of the male rat brain

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Inderbitzin-Köhler, Silvio

**Publication date:**

1995

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001441015>

**Rights / license:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

**EFFECTS OF PRENATAL BENZODIAZEPINE  
EXPOSURE ON OPIOID SYSTEMS OF THE  
MALE RAT BRAIN**

A dissertation submitted to the

**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
ZURICH**

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by

**Silvio Inderbitzin-Köhler**  
eidg. dipl. pharm.  
born june 3<sup>rd</sup>, 1965  
citizen of Morschach (SZ)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. H. Möhler, examiner  
Prof. Dr. W. Lichtensteiger, co-examiner

1995

# 1 SUMMARY

---

Despite the introduction of modern benzodiazepines with short elimination half-lives, the slowly eliminated benzodiazepine diazepam still plays an important role in worldwide benzodiazepine use. During pregnancy, diazepam is taken for therapeutic indications e.g. in case of epilepsy, but also misused by drug addicted pregnant women.

Prenatal exposure to diazepam has been shown to produce various dysfunctions in both humans and laboratory animals. Neurochemically, interactions between diazepam and brain opioid systems have been reported in adolescent and adult animals as well as humans. Among these endogenous opioid systems,  $\kappa$ -opioid receptors and their endogenous agonists, the prodynorphin (PD) peptides, appear to be involved in modulation of motor activation and reward mechanisms.

The aim of the present study was to investigate whether low dose prenatal diazepam exposure induces alterations in the  $\kappa$ -opioid system in the offspring. The study focussed on basal ganglia and midbrain, i.e., regions that are part of a circuitry that plays a key role in sensori-motor integration and reward. Neurons co-expressing GABA and dynorphin form one of the major output pathways of the basal ganglia; they terminate in substantia nigra. In order to test the effect of prenatal low dose diazepam exposure on  $\kappa$ -opioid systems, the development of  $\kappa$ -opioid receptors and the expression of mRNA encoding for the precursor (prodynorphin) of the endogenous  $\kappa$ -agonist dynorphin were measured in brain regions of rat offspring.

$\kappa$ -opioid binding sites were labeled with ( $^3\text{H}$ )U-69593 in membrane fractions prepared from regions of the basal ganglia and from midbrain of male and female rat offspring at different postnatal ages. Chronic prenatal administration of diazepam at a comparatively low dose (1.25 mg/kg daily s.c.) from gestational day 14 to 20 significantly decreased the  $\kappa$ -opioid receptor density (maximum binding

capacity  $B_{max}$ ) in the nucleus accumbens/olfactory tubercle region and the affinity ( $K_D$ ) for ( $^3H$ )U-69593 in the caudate putamen of adult male offspring. Female offspring did not show differences in  $B_{max}$  and  $K_D$  for ( $^3H$ )U-69593 at the various ages examined. The same is true for male offspring studied at postnatal day 14 (PN 14) and PN 28.

In an additional series of experiments, the influence of *in utero* exposure to diazepam on striatal  $\mu$ -opioid receptors, which mediate rewarding effects of morphine and heroine, was examined in preweaning male and female rats. ( $^3H$ )DAGO binding to  $\mu$ -opioid receptors in the striatum of male and female offspring was not affected by *in utero* exposure to diazepam, when studied at PN 14 and PN 28.

Since prenatal diazepam exposure caused a significant decrease in the number of  $\kappa$ -opioid receptors in male offspring only, regional expression of prodynorphin (PD) mRNA was analyzed in male offspring by *in situ* hybridization using a  $^{33}P$ -labeled 60 mer oligonucleotide. Subtle dysfunctions due to developmental drug actions often become manifest after functional or pharmacological challenge. Therefore, PD mRNA expression was studied under baseline conditions as well as after acute injection of d-amphetamine.

Basal PD mRNA levels were not significantly altered in the brain regions investigated by *in utero* diazepam exposure. In contrast, prenatal diazepam exposure significantly attenuated amphetamine-induced PD mRNA expression in the olfactory tubercle, the ventromedial and both dorsal caudate putamen regions of male offspring. Although the amphetamine-induced increase in PD mRNA levels in the nucleus accumbens and the ventrolateral caudate putamen were also inhibited after prenatal diazepam administration, the effect was not significant in those regions.

In conclusion, this study provides evidence for prenatal diazepam effects on PD systems in male rat brain that form the direct output pathway of the basal ganglia

and are involved in regulating mesolimbic and nigrostriatal dopamine pathways. While  $\kappa$ -opioid binding sites in the nucleus accumbens/olfactory tubercle were decreased under baseline conditions, the prenatal diazepam effects on PD mRNA expression became evident only under conditions stimulating PD systems. This suggests that prenatally diazepam exposed male rats might have a decreased ability to control reward and facilitation of motor activation under conditions of PD system stimulation such as stress.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

---

Trotz der Einführung moderner Benzodiazepine mit kurzer Halbwertszeit spielt das langsam eliminierte klassische Benzodiazepin Diazepam weltweit weiterhin eine bedeutende Rolle. Während der Schwangerschaft kommt Diazepam auch heute noch zur Anwendung, beispielsweise bei Patientinnen mit gewissen Epilepsieformen. Häufig wird aber Diazepam auch missbräuchlich von toxikomanen Frauen während der Schwangerschaft eingenommen.

Von früheren Studien her ist bekannt, dass chronische pränatale Diazepam-Expositionen vielfältige Effekte bei Menschen und Tieren hervorrufen können. Unter anderem wurden auch Interaktionen zwischen Diazepam und Opioidsystemen im Hirn beobachtet. Von den bekannten Opioidsystemen scheinen  $\kappa$ -Opioid-Rezeptoren und deren endogene Agonisten, die prodynorphinergen Peptide, an der Modulation von Bewegungsaktivierung und Belohnungsmechanismen beteiligt zu sein.

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, die Auswirkung einer pränatalen, niedrig-dosierten chronischen Diazepam-Exposition auf  $\kappa$ -Opioidsysteme im Rattenhirn zu studieren. Speziell untersucht wurden die Basalganglien und das Mittelhirn, da diese Regionen eine Schlüsselrolle in einem Kreislauf spielen, welcher an sensori-motorischer Integration und Belohnung beteiligt ist. Dabei sind auch Neuronen, welche GABA und Dynorphin exprimieren, involviert. Diese Neuronen haben ihren Ursprung in den Basalganglien und enden in der Substantia nigra. Um mögliche Einflüsse einer pränatalen, niedrig-dosierten chronischen Diazepam-Exposition auf  $\kappa$ -Opioidsysteme untersuchen zu können, wurden die Dichte der  $\kappa$ -Opioidrezeptoren während der Entwicklung und die Expression von Prodynorphin mRNA, dem Vorläufer des endogenen  $\kappa$ -Agonisten Dynorphin im Hirn von Nachkommen von Diazepam-exponierten Rattenmüttern gemessen.

$\kappa$ -Opioid-Rezeptoren von Membranfraktionen aus den Basalganglien und dem Mittelhirn von männlichen und weiblichen Ratten verschiedenen Alters wurden mit ( $^3\text{H}$ )U-69593 markiert. Chronische, relativ niedrig dosierte pränatale Diazepam-Exposition (1.25 mg/kg pro Tag s.c.) von Schwangerschaftstag 14-20 bewirkte eine signifikante Erniedrigung der mit ( $^3\text{H}$ )U-69593 markierten  $\kappa$ -Opioidrezeptoren ( $B_{\max}$ ) in der nucleus accumbens/olfaktorischer Tuberkel Region und der Affinitätskonstante  $K_D$  im caudate putamen von adulten (8 Wochen alten) Männchen. Weibliche Ratten und auch 14 und 28 Tage alte Männchen (PN 14, PN 28) wiesen keine  $B_{\max}$  und  $K_D$  Unterschiede nach pränataler Diazepamverreichung auf.

Striatale  $\mu$ -Opioid Rezeptoren sind auch an der Übertragung belohnender Effekte zum Beispiel von Heroin beteiligt. Deshalb wurde zusätzlich auch der Einfluss pränataler Diazepam-Exposition auf  $\mu$ -Opioid Rezeptoren im Striatum von PN 14 und PN 28 Jungtieren beider Geschlechter studiert. Es stellte sich heraus, dass die pränatale Diazepamexposition keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl mit ( $^3\text{H}$ )DAGO markierten Bindungsstellen und die Affinität von ( $^3\text{H}$ )DAGO an striatale  $\mu$ -Opioidrezeptoren von PN 14 und PN 28 Ratten beiderlei Geschlechts hatte.

Da die Dichte der  $\kappa$ -Opioidrezeptoren in 8 Wochen alten männlichen Ratten nach pränataler Diazepamexposition erniedrigt war, wurde in dieser Gruppe noch die regionale Expression von Prodynorphin (PD) mRNA durch in situ Hybridisierung mit einem 60 mer Oligonucleotid ( $^{33}\text{P}$  markiert) untersucht. Weil Störungen durch Substanz-Exposition während der Entwicklung häufig erst nach pharmakologischer oder funktioneller Stimulation manifest werden, wurde die PD mRNA Expression auch nach akuter Amphetamingabe gemessen.

Unter basalen Bedingungen hatte die pränatale Diazepamexposition keinen Einfluss auf die Prodynorphin mRNA Expression. Jedoch wurde eine statistisch signifikante Erniedrigung der Amphetamin-induzierten Prodynorphin mRNA

Expression im olfaktorischen Tuberkel, im ventromedialen und beiden dorsalen caudate putamen Regionen nach pränataler Diazepamgabe festgestellt. Auch im nucleus accumbens und im ventrolateralen caudate putamen wurde eine Inhibition der Amphetamin-induzierten Prodynorphin mRNA Expression nach pränataler Diazepam-Exposition gemessen, jedoch war der Effekt in diesen Regionen nicht signifikant.

In dieser Studie an Ratten konnten Effekte pränataler Diazepam-Exposition auf Prodynorphin Systeme in den Basalganglien aber auch auf solche, welche an der Regulation der mesolimbischen und nigrostriatalen Dopamin-Systeme beteiligt sind, nachgewiesen werden. Während die verringerte  $\kappa$ -Opiod-Rezeptorendichte in der nucleus accumbens/olfaktorischen Tuberkel Region nach pränataler Diazepam-Exposition bereits unter basalen Bedingungen auftrat, konnten signifikante Effekte pränataler Diazepamgabe auf die Prodynorphin mRNA Expression erst unter Prodynorphin-stimulierenden Bedingungen festgestellt werden. Es scheint daher, dass pränatal Diazepam-exponierte männliche Ratten eine verminderte Fähigkeit zur Kontrolle von Bewegungsaktivierung und Belohnung speziell unter Prodynorphin-stimulierenden Bedingungen, wie zum Beispiel Stress, aufweisen.