

Diss. ETH No. 14715

**Pre- and postnatal levels of mRNA encoding for alpha1,
alpha5, beta2 and gamma2 subunits of GABA_A receptors in
the rat CNS after prenatal exposure to benzodiazepines**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

Ali Reza Salili
eidg. dipl. pharm. et med.
Born october 6th 1962
Citizen of Zurich (ZH)

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

2003

1 Summary

Benzodiazepines have been known for their low toxicity since their introduction into medical practice. However, the developing organism differs in many respect from the adult. It therefore seemed to be appropriate to reconsider the potential action of benzodiazepines during ontogeny with refined methodology.

Prenatal exposure to diazepam has been shown to produce various dysfunctions in both humans and laboratory animals, including changes in sensitivity to benzodiazepines. The immediate effects in the newborn, described as the "floppy infant syndrome", are well documented. Thermoregulatory difficulties, apneic spells, low Apgar scores, poor sucking and cardiorespiratory difficulties are described after high doses or chronic dosing of diazepam or alike when given to the mother perinatally. Withdrawal symptomatology with high irritability, tremors, hyperactivity and hypotonicity also threatens the newborn.

The neurochemical basis of behavioral dysfunction caused by prenatal benzodiazepine exposure has not been clarified yet. It seems logical to suppose alterations in GABAergic systems and in the GABA_A receptor complex. This idea is supported i.a. by the data indicating a change in sensitivity to benzodiazepines.

The aim of the present study was to investigate whether low dose prenatal diazepam exposure might influence the development of GABAergic receptors, by inducing long-lasting alterations in the expression of mRNA encoding for different GABA_A receptor subunits. Could such changes be the neurochemical basis of sensorimotor, neuroendocrine or behavioral dysfunctions?

The study was conducted on time-pregnant Long Evans rats. Diazepam (1.25 mg/kg/day) or vehicle (olive oil) was injected subcutaneously to the pregnant dam from gestational day (GD) 14 to GD20.

The levels and distribution of the mRNAs encoding for α_1 , α_5 , β_2 and γ_2 receptor subunits were examined in brain of rat fetuses and offspring at four developmental stages (gestational day (GD) 20, postnatal day (PN) 8, PN 15 and adulthood) with in situ hybridization using ³⁵S-labeled oligonucleotide. mRNA levels were quantified in an MCID image analysis system.

Our investigations revealed changes in mRNA levels during the treatment-phase (GD20) as well as long-lasting alterations of mRNA levels beyond termination of diazepam exposure, pointing to a modulation of the GABAergic system.

The effects on mRNA levels differed, depending on subunit, region, developmental stages and sex. There was a clear-cut tendency towards normalization of mRNA levels with increasing age, but a small number of brain regions, in particular in cortex, exhibited significant differences from controls also in adult offspring.

It appears that a coincidence of treatment with early differentiation is of importance. However, the heterogeneity of changes suggests that they represent the outcome of a combination of different developmental processes, possibly including direct effects on transcription of receptor subunits as well as effects on neurogenesis, differentiation and circuit formation.

Provided the changes in subunit transcription (mRNA levels) result in functionally relevant changes in subunit protein levels, this might represent one possible basis for functional alterations following developmental diazepam exposure.

2 Zusammenfassung

Die Benzodiazepine sind seit ihrer Einführung in die medizinische Praxis für ihre niedrige Toxizität bekannt. Dennoch muss beachtet werden, dass der in Entwicklung befindliche Organismus in mancher Weise vom erwachsenen differiert. Deshalb schien es uns angebracht, die potentielle Wirkung eines Benzodiazepines während der Ontogenese mit verfeinerten Methoden erneut zu evaluieren.

Es ist gezeigt worden, dass eine pränatale Diazepambehandlung sowohl bei Menschen als auch bei Versuchstieren unterschiedlichste Störungen auslöst. Die unmittelbaren Auswirkungen auf das Neugeborene, das "floppy infant syndrome", sind gut dokumentiert. Thermoregulatorische Störungen, Apnoephasen, ein tiefer Apgar-Score, eine verminderte Saugfunktion und kardiorespiratorische Schwierigkeiten kommen nach einer chronischen oder kurzfristig hochdosierten Behandlung mit Diazepam vor, z.B. wenn die Mutter perinatal behandelt wird. Auch Entzugssymptome wie erhöhte Irritabilität, Tremor, Hyperaktivität und Hypotonizität werden beim Neugeborenen beobachtet.

Die neurochemischen Grundlagen dieser Störungen, die nach einer pränatalen Benzodiazepinexposition auftreten, sind bis jetzt nicht geklärt. Es scheint uns, dass die Ursache solcher Störungen u.a. die Veränderungen in den GABAergen Systemen und im GABA_A Rezeptorkomplex sein könnten. Diese Annahme wird auch durch die Studien, die eine Veränderung der Benzodiazepin-Sensitivität zeigen, untermauert.

Ziel unserer Studie war es, zu untersuchen, ob eine niedrig dosierte Diazepambehandlung die Entwicklung von GABA_A-Rezeptoren beeinflusst, speziell die Expression der mRNA für GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. Könnten solche Veränderungen eine neurochemische Basis für Störungen sensomotorischer oder neuroendokriner Systeme oder des Verhaltens darstellen?

Die Untersuchungen wurden an Long Evans Ratten mit zeitlich kontrollierter Begattung durchgeführt. Diazepam (1.25 mg/kg/Tag) oder Vehikel (Olivenöl) wurde trächtigen Ratten vom 14. bis 20. Gestationstag (GD) subkutan injiziert.

Die mRNA-Spezies, die die α_1 , α_5 , β_2 und γ_2 Rezeptor-Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors kodieren, wurden in vier verschiedenen Entwicklungsstadien (Gestationstag (GD) 20, Postnaltag (PN) 8, PN15 und Erwachsenenalter) im Rattengehirn mit in situ-Hybridisierung untersucht. Der Nachweis erfolgte mit ³⁵S-markierten Oligonukleotiden, die Konzentration der mRNA-Spezies wurde mit semiquantitativen Bildanalyse (MCID-System) bestimmt.

Unsere Untersuchungen zeigten Effekte auf die mRNA-Expression während der Behandlung (GD20) und langanhaltende Veränderungen über das Ende der Diazepamexposition hinaus, ein Hinweis auf eine Veränderung des GABAergen Systems. Die Effekte auf die mRNA-Expression differierten in Abhängigkeit von Untereinheit, Region, Alter und Geschlecht. Wir fanden eine deutliche altersabhängige Normalisierung der mRNA Expression, d.h. die Anzahl von Regionen mit signifikant veränderten mRNA Signalen nimmt mit zunehmendem Alter, besonders von PN15 an, ab. In einzelnen besonders corticalen Hirnregionen, blieben indessen Abweichungen von der Norm bis ins Erwachsenenalter bestehen.

Es scheint, dass eine Koinzidenz von Behandlung und früher neuronaler Entwicklung einer Gehirnregion von Bedeutung ist. Die Heterogenität der Veränderungen spricht aber dafür,

dass sie das Resultat einer Kombination verschiedener Entwicklungsprozesse darstellt, wozu direkte Effekte auf die Transkription von Rezeptoruntereinheiten, aber auch Wirkungen auf Neurogenese, Differenzierung und neuronale Netzwerkbildung gehören können.

Falls die beobachteten Änderungen der mRNA-Signale in funktionell relevante Änderungen der Konzentration von Untereinheit-Proteinen resultieren, könnte dies eine der möglichen Grundlagen für Funktionsstörungen nach pränataler Diazepamexposition darstellen.