

mgr Joanna Bernacka

**Noradrenergiczna regulacja uwalniania dopaminy w układzie  
mezo limbicznym: mechanizmy receptorowe w polu brzusznej  
nakrywki i ich modulacja przez stres**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Farmakologii w Pracowni  
Farmakologii i Biostruktury Mózgu  
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

**Promotor:**

**Prof. dr hab. Ryszard Przewłocki**

**Promotor pomocniczy:**

Dr hab. Wojciech Solecki, Prof. UJ

Kraków, 2023

*Badania opisane w niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach funduszy pochodzących z*

- 1. Projektu badawczego Opus 15 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2018/29/B/NZ7/0267) pt. „Poszukiwanie nowych mechanizmów terapii zaburzeń związanych z używaniem substancji uzależniających lub ze stresem” kierowanego przez dr hab. Wojciecha Soleckiego*
- 2. Działalności statutowej Pracowni Farmakologii i Biostruktury Mózgu*
- 3. Projektu badawczego UJ POB DigiWorld pt. „Aktywność mózgu wzbudzona bodźcem stresowym – funkcjonalny atlas mózgu 3D”, kierowanego przez dr hab. Wojciecha Soleckiego*

*Dziękuję Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej i Dyrektorowi Krakowskiej Interdyscyplinarnej Szkole Doktorskiej za przyznanie stypendium programu STER umożliwiającego odbycie rozwojowego stażu zagranicznego.*

## **Podziękowania**

*Moim Promotorom, prof. dr. hab. Ryszardowi Przewłockiemu i dr. hab. Wojciechowi Soleckiemu za możliwość realizacji pracy doktorskiej i wsparcie w tym procesie oraz motywowanie do ciągłego rozwoju naukowego.*

*Prof. dr. hab. Marzenie Maćkowiak, za pomoc w realizacji części molekularnej badań, wsparcie i służenie dobrą radą nie tylko w kwestiach naukowych.*

*Dr. Michałowi Kielbińskiemu, za wprowadzenie mnie w świat laboratorium, otwartość na naukowe rozmowy, wspólną pracę, nieocenioną pomoc i niekończące się wsparcie, cierpliwość i życzliwość.*

*Mgr. Katarzynie Zajdzie, za fantastyczną atmosferę pracy, wsparcie i pomoc w realizacji części behawioralnej pracy.*

*Koleżankom i Kolegom z Pracowni Farmakologii i Biostruktury Mózgu, za życzliwość i każdą udzieloną mi pomoc, szczególnie dr. Agnieszce Wawrzczak-Bargieła za pomoc w realizacji części molekularnej pracy.*

*Prof. dr. hab. Katarzynie Starowicz-Bubak i dr. hab. Agnieszce Wąsik, za wykonanie części eksperymentalnej i pomoc w interpretacji wyników uzyskanych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.*

*Szczególne podziękowania kieruję do moich najbliższych:*

*Maćka, za wyrozumiałość, motywowanie do działania i ciągłą wiarę w to, że się uda.*

*Mamy i braci, za wsparcie w chwilach zwątpienia.*

# Streszczenie

Układy dopaminergiczny i noradrenergiczny pełnią szereg kluczowych funkcji i biorą udział w rozwoju psychopatologii ośrodkowego układu nerwowego, a także wzajemnie oddziałują w różnych strukturach mózgu. Szczególnie interesującą strukturą w tym kontekście jest, zlokalizowane w śródmózgowiu, pole brzuszne nakrywki (VTA). Uwalnianie dopaminy z VTA do struktur przodomózgowia związane jest z mechanizmami nagrody i procesami uczenia asocjacyjnego oraz ma istotne znaczenie w procesach uzależnień i w chorobach neuropsychiatrycznych związanych ze stresem. Istotnym mechanizmem regulującym te procesy w VTA jest sygnalizacja noradrenergiczna, która, między innymi, jest również kluczowym mediatorem reakcji na stres. Szczególną rolę w interakcji układu noradrenergicznego z dopaminergicznym w VTA odgrywają receptory noradrenergiczne, które są zaangażowane w modulację lokalnej aktywności neuronalnej i, w konsekwencji, poziomu uwalnianej dopaminy do struktur przodomózgowia.

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki postawiono hipotezy: a) że noradrenalina uwalniana w VTA poprzez oddziaływanie na receptory dla katecholamin reguluje poziom uwalnianej dopaminy w strukturach przodomózgowia, a w konsekwencji wpływa na procesy zależne od ich aktywności, oraz b) że istotne bodźce środowiskowe takie jak ostry stres mogą wpływać na interakcje układów dopaminergicznego i noradrenergicznego prowadząc do zmian behawioralnych u zwierząt. Głównym celem badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu aktywności receptorów noradrenergicznych w VTA na poziom fazowo uwalnianej dopaminy do jądra połączonego przegrody (NAc) i podstawno-bocznego jądra migdałowatego (BLA) oraz określenie czy i jak stres może wpływać na tę modulację.

Przedstawione badania elektrochemiczne z wykorzystaniem metody szybkoskanowej woltamperometrii cyklicznej (FSCV) połączonej z farmakologiczną blokadą receptorów noradrenergicznych w VTA wykazały, że podanie do tej struktury specyficznego antagonisty receptora noradrenergicznego  $\alpha_{2A}$  (BRL-44408) osłabia uwalnianie dopaminy w NAc. Efekt ten był hamowany wcześniejszą blokadą receptorów dopaminowych  $D_2$ . Podanie do VTA JP-1302 i imiloksanu (antagonistów specyficznych odpowiednio dla receptorów  $\alpha_{2B}$  i  $\alpha_{2C}$ ) nie wpływało na uwalnianie dopaminy w NAc.

W kolejnym etapie zbadano czy i w jaki sposób ekspozycja zwierząt na bodziec stresowy wpływa na noradrenergiczną modulację poziomu uwalnianej dopaminy w BLA. Wykonane metodą FSCV badania wskazują, że wywołany elektryczną stymulacją VTA

wyrzut dopaminy w BLA był regulowany poprzez aktywność receptorów zarówno  $\alpha_1$ - jak i  $\alpha_2$ -adrenergicznych w tej strukturze. Ekspozycja na bodziec stresowy osłabiała wpływ blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych (RX-821002) w VTA na uwalnianie dopaminy do BLA 24 godziny po stresie. Stres nie wpływał natomiast na działanie antagonisty receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych (terazosyna).

W połączeniu z wykazaną adaptacją wywołaną przez stres, postanowiono zbadać wpływ blokady receptora  $\alpha_2$  w VTA na warunkowanie strachu. Z użyciem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykazano, że procedura warunkowania strachu wywołuje podwyższenie poziomu noradrenaliny w VTA. Co więcej, blokada receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych (podanie RX-821002) w VTA przed warunkowaniem strachu powoduje osłabienie poziomu reakcji znieruchomienia na etapie przywołania pamięci strachu.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że aktywność receptorów zarówno  $\alpha_1$ -jaki  $\alpha_2$ -adrenergicznych wpływa na poziom uwalnianej dopaminy w NAc i BLA. Dodatkowo, wykazano, że główną rolę w regulacji uwalniania noradrenaliny do VTA, a tym samym regulacji uwalniania dopaminy do przedomóżgowia, pełni podtyp  $\alpha_{2A}$  receptorów noradrenergicznych. Co więcej, modulacja poprzez receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne zmienia się w wyniku ekspozycji na stres oraz pełni rolę w nabywaniu pamięci strachu. Niniejsze badania wskazują na nowe mechanizmy regulacyjne, poprzez które noradrenalina może wpływać na dopaminergiczny układ mezolimbiczny i modulować przekaźnictwo dopaminergiczne związane z procesami uczenia się i pamięci.

# Abstract

The dopaminergic and noradrenergic systems are involved in numerous functions as well as pathologies in the central nervous system. Furthermore, these systems interact with each other in various brain structures. Of particular importance for the interaction between these systems is the midbrain ventral tegmental area (VTA). Dopamine release from the VTA to forebrain structures is associated with reward and associative learning processes, playing a crucial role in addiction and neuropsychiatric diseases related to stress. Noradrenergic signaling in the VTA is a putative mechanism involved in this interaction. It is of special interest due to the fact that noradrenaline, among its other roles, is also a fundamental mediator of stress responses. In particular, noradrenergic receptors in the VTA play a large role in the interaction between the noradrenergic and dopaminergic systems, modulating local neuronal activity and consequently, dopamine release in the forebrain.

On this basis, we formulated the following hypotheses: a) noradrenaline released in the VTA, through catecholamine receptors, regulates dopamine release in the forebrain, subsequently influencing processes dependent on their activity, b) environmental stimuli, such as acute stress, can affect the interactions of the dopaminergic and noradrenergic systems, leading to behavioral effects. The primary objective of this doctoral dissertation was to investigate the influence of noradrenergic receptor activity in the VTA on the phasic release of dopamine to nucleus accumbens (NAc) and basolateral amygdala (BLA). It also aimed to determine how stress might modulate these regulatory mechanisms.

Electrochemical studies using fast-scan cyclic voltammetry (FSCV) combined with pharmacological blockade of noradrenergic receptors in the VTA revealed that local administration of a specific  $\alpha_{2A}$  noradrenergic receptor antagonist (BRL-44408) attenuates dopamine release in the NAc, an effect suppressed by prior blockade of D<sub>2</sub> dopamine receptors. Conversely, JP-1302 and imiloxan (specific antagonists for  $\alpha_{2B}$  and  $\alpha_{2C}$  receptors, respectively) did not affect dopamine release in the NAc.

We then examined how animal exposure to a stressor affects noradrenergic modulation of dopamine levels in the BLA. Our FSCV recordings revealed that dopamine release in the BLA, evoked by electrical stimulation of the VTA, was regulated by both  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in this structure. Exposure to a stressor weakened the impact of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor blockade (RX-821002) in the VTA on dopamine release to the BLA 24 hours post-stress, while stress did not influence the action of the  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonist, terazosin.

This stress-induced adaptation led us to explore the effect of  $\alpha_2$  receptor blockade in the VTA on fear conditioning. Using high-performance liquid chromatography, we demonstrated that the fear conditioning procedure induces elevated noradrenaline levels in the VTA. Local  $\alpha_2$ -adrenergic receptor antagonist RX-821002, infused into the VTA before fear conditioning, weakened freezing responses during fear memory retrieval.

Taken together, these results indicate that both  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors influence dopamine release levels in the NAc and BLA. Furthermore, the  $\alpha_{2A}$  subtype of noradrenergic receptors plays a primary role in regulating noradrenaline levels in the VTA and, consequently, dopamine release to the forebrain. Moreover, the modulatory effect of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors is altered by stress exposure and plays a role in fear memory acquisition. These findings suggest novel regulatory mechanisms through which noradrenaline can influence the mesolimbic dopaminergic system and modulate dopaminergic signaling associated with learning and memory processes.

## Spis treści

Streszczenie.....	4
Abstract.....	6
Spis artykułów stanowiących rozprawę doktorską .....	10
Spis najważniejszych skrótów .....	11
Wstęp.....	13
1. Katecholaminy.....	13
1.1 Synteza, wychwyt zwrotny i rozkład .....	13
1.2 Receptory dla neuroprzekaźników katecholaminergicznych .....	14
2. Anatomia funkcjonalna układów katecholaminergicznych .....	15
2.1 Układ dopaminergiczny .....	15
2.1.1 Receptory dopaminergiczne .....	16
2.1.2 Wzorce aktywności neuronów dopaminergicznych .....	16
2.2 Układ noradrenergiczny .....	17
2.2.1 Receptory noradrenergiczne.....	18
2.2.2 Wzorce aktywności neuronów noradrenergicznych.....	19
3. Interakcje pomiędzy układem dopaminergicznym i noradrenergicznym .....	19
4. Pole brzuszne nakrywki – funkcje i najważniejsze projekcje .....	21
5. Wpływ noradrenaliny na aktywność neuronów w polu brzusznej nakrywki i uwalnianie dopaminy w przodomózgowiu .....	23
6. Wpływ stresu na układ katecholaminergiczny .....	26
Cele badań.....	29
Publikacje naukowe w wersji oryginalnej .....	31
Badania dodatkowe .....	64
1. Blokada receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych w polu brzusznej nakrywki zaburza nabywanie, ale nie przywołanie pamięci stachu.....	64



2. Blokada receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych w polu brzuszny nakrywki obniża poziom dopaminy uwalnianej do jądra półleżącego przegrody.....	78
Dyskusja.....	83
1. Regulacja uwalniania noradrenaliny do pola brzuszego nakrywki modulowana jest przez receptory $\alpha_{2A}$ -, ale nie $\alpha_{2B}$ - i $\alpha_{2C}$ -adrenergiczne w tej strukturze .....	83
2. Uwalnianie dopaminy do podstawno-bocznego jądra migdałowatego jest regulowane przez aktywność receptorów $\alpha_1$ - oraz $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA.....	86
3. Stres wpływa na modulację uwalniania dopaminy do podstawno-bocznego jądra migdałowatego mediowaną przez receptory $\alpha_2$ -, ale nie $\alpha_1$ -adrenergiczne w VTA.....	89
4. Potencjalne mechanizmy zmian w funkcjonalności receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych w polu brzuszny nakrywki pod wpływem stresu .....	91
5. Ostry stres zwiększa poziom dopaminy i noradrenaliny w polu brzuszny nakrywki	92
6. Podniesiony ton noradrenergiczny w polu brzuszny nakrywki, modulowany przez aktywność receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych, jest niezbędny do tworzenia pamięci strachu..	93
7. Podsumowanie i wnioski.....	98
Bibliografia .....	100
Oświadczenia współautorów publikacji .....	115

# Spis artykułów

## stanowiących rozprawę doktorską

1. **Bernacka Joanna**, Kielbiński Michał, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Zajda Katarzyna, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Alpha-2A but not 2B/C noradrenergic receptors in ventral tegmental area regulate phasic dopamine release in nucleus accumbens core. *Neuropharmacology*, **220**, 109258, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2022.109258,  
Punktacja MNiSW: **140**, IF: **4.7**
  
2. Kielbiński Michał, **Bernacka Joanna**, Zajda Katarzyna, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit. *Journal of Neurochemistry*. **00**, 1–15, DOI: 10.1111/jnc.15698,  
Punktacja MNiSW: **140**, IF: **4.7**
  
3. **Bernacka Joanna**, Solecki Wojciech (2023) Functional significance of dopamine release in the mesolimbic forebrain by modulation of adrenergic receptors. *European Neuropsychopharmacology*, **75**, 59–61, DOI: 10.1016/j.euroneuro.2023.06.007,  
Punktacja MNiSW: **140**, IF: **5.6**

Łączny Impact Factor (IF) dla serii publikacji: **15.0**

Suma punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) dla serii publikacji: **420**

## Spis najważniejszych skrótów

**3-MT** – 3-metoksytyramina (ang. *3-methoxytyramine*)

**ADHD** – zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ang. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*)

**AMY** – ciało migdałowate (ang. *amygdala*)

**BDNF** – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*)

**BLA** – część podstawno-boczna ciała migdałowatego (ang. *basolateral amygdala*)

**cAMP** – cykliczny monofosforan adenozyliny (ang. *cyclic adenosine monophosphate*)

**COMT** – enzym katecholo-O-metyltransferaza (ang. *catechol-O-methyltransferase*)

**CREB** – czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cAMP (ang. *cAMP response element-binding protein*)

**CS** – bodziec warunkowy (ang. *conditioned stimulus*)

**DA** – dopamina (ang. *dopamine*)

**DAG** – diacyloglicerol (ang. *diacylglycerol*)

**DAT** – transporter dopaminowy (ang. *dopamine transporter*)

**DBH** –  $\beta$ -hydroksylaza dopaminy (ang. *dopamine beta-hydroxylase*)

**DOPA** – 3,4-dihydroksyfenyloalanina (ang. *3,4-dihydroxyphenylalanine*)

**DOPAC** – kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy (ang. *3,4-dihydroxyphenylacetic acid*)

**FSCV** – szybkoskanowa woltamperometria cykliczna (ang. *fast-scan cyclic voltammetry*)

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

**GIRK** – potasowy kanał prostowniczy sprzężony z białkiem G (ang. *G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels*)

**GPCRs** – receptory sprzężone z białkiem G (ang. *G-protein-coupled receptors*)

**HPA** – oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*)

**HPLC** – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*)

**HVA** – kwas homowanilinowy (ang. *homovanillic acid*)

**I<sub>h</sub>** – prąd aktywowany przez hiperpolaryzację (ang. *hyperpolarization-activated current*)

**IP3** – trifosforan inozytolu (ang. *inozytolotrisfosforan*)

**ITI** – interwał między prezentacjami (ang. *intertrial interval*)

**LC** – miejsce sinawe (ang. *locus coeruleus*)

**LTP** – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long-term potentiation*)

**MAO** – monoaminooksydaza (ang. *monoamine oxidase*)

**NA** – noradrenalina (ang. *noradrenaline*)

**NAc** – jądro półleżące nakrywki (ang. *nucleus accumbens*)

**NET** – transporter noradrenaliny (ang. *noradrenaline transporter*)

**NM** – normetanefryna (ang. *normetanephine*)

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

**PIP2** – difosforan fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

**PKA** – kinaza białkowa A (ang. *protein kinase A*)

**PKC** – kinaza białkowa C (ang. *protein kinase C*)

**PTSD** – zespół stresu pourazowego (ang. *post-traumatic stress disorder*)

**TH** – hydroksylaza tyrozyny (ang. *tyrosine hydroxylase*)

**US** – bodziec bezwarunkowy (ang. *unconditioned stimulus*)

**VDCC** – napięciowozależne kanały wapniowe (ang. *voltage-dependent calcium channels*)

**VMAT2** – pęcherzykowy transporter monoamin (ang. *2 vesicular monoamine transporter*)

**VTA** – pole brzuszne nakrywki (ang. *ventral tegmental area*)

# Wstęp

## 1. Katecholaminy

Katecholaminy są jedną z głównych grup neuroprzekaźników w ośrodkowym układzie nerwowym. Należą one do grupy monoamin i zalicza się do nich adrenalinę, noradrenalinę i dopaminę. Noradrenalina i dopamina pełnią szereg istotnych funkcji w ośrodkowym układzie nerwowym, adrenalina natomiast występuje w śladowych ilościach, uwalniana przez niewielką grupę neuronów w pniu mózgu (Kobayashi, 2001).

### 1.1 Synteza, wychwyt zwrotny i rozkład

Katecholaminy są aminami biogennymi, w ośrodkowym układzie nerwowym syntetyzowane są w neuronach zawierających hydroksylazę tyrozyny (ang. *tyrosine hydroxylase*; TH). Produktem wyjściowym reakcji syntezy katecholamin jest aminokwas L-tyrozyna, który podlega hydroksylacji do 3,4-dihydroksyfenyloalaniny (ang. *3,4-dihydroxyphenylalanine*; DOPA) przez TH. To właśnie ta reakcja jest najważniejszym etapem w procesie syntezy katecholamin. Tym samym aktywność enzymatyczna TH jest czynnikiem limitującym powstawanie wszelkich neuroprzekaźników katecholaminowych. W kolejnym etapie, DOPA podlega działaniu dekarboksylazy DOPA do dopaminy. W neuronach noradrenergicznych zawierających enzym  $\beta$ -hydroksylazę dopaminy (ang. *dopamine beta-hydroxylase*; DBH) dopamina może zostać dalej przekształcona w noradrenalinę. Po procesie syntezy, katecholaminy magazynowane są w pęcherzykach synaptycznych. W transporcie katecholamin do pęcherzyków synaptycznych uczestniczy pęcherzykowy transporter monoamin 2 (ang. *vesicular monoamine transporter 2*; VMAT2). Uwalnianie katecholamin do przestrzeni synaptycznej wywołane jest potencjałem czynnościowym, który powoduje napływ jonów wapnia do komórki przez napięciowozależne kanały wapniowe i w konsekwencji prowadzi do procesu egzocytozy, czyli połączenia pęcherzyka synaptycznego z błoną i uwolnienia jego zawartości do przestrzeni synaptycznej. Po egzocytozie pęcherzyki synaptyczne ulegają endocytozie zależnej od klatryny i dynaminy. Podstawowym mechanizmem inaktywacji działania katecholamin jest ich wychwyt zwrotny do zakończenia neuronu, odpowiedzialne są za to transportery dla dopaminy i noradrenaliny, odpowiednio DAT i NET. Część puli cząsteczek tych neurotransmiterów jest metabolizowana przez

enzymy – katechol-O-metylotransferazę (ang. *catechol-O-methyltransferase*; COMT) i monoaminooksydazę (ang. *monoamine oxidase*; MAO) (Eisenhofer *et al.*, 2004). Warto zaznaczyć, że jest to obraz nieco uproszczony. W praktyce kinetyka wychwytu, obrotu i ponownego pakowania do pęcherzyków oraz degradacji dopaminy przez wspomniane enzymy jest dosyć skomplikowana i zależna od struktury – w szczególności od zagęszczenia w danej strukturze poszczególnych transporterów (Tammimaki *et al.*, 2016).

## 1.2 Receptory dla neuroprzekaźników katecholaminergicznych

Różnice w odpowiedzi funkcjonalnej wywołanej działaniem katecholamin (dopaminy i noradrenaliny) wynikają, w dużej mierze, z lokalizacji i typu receptora na który działają. Receptory dla katecholamin mogą być zlokalizowane zarówno na ciałach komórkowych, jak i zakończeniach pre- i postsynaptycznych. Wszystkie receptory katecholaminergiczne są receptorami metabotropowymi, czyli sprzężonymi z białkiem G (ang. *G-protein-coupled receptors*; GPCRs). Zbudowane są z pojedynczego łańcucha aminokwasowego tworzącego siedem hydrofobowych, transbłonowych domen z zewnątrzkomórkowym N-końcem i wewnątrzkomórkowym C-końcem. Ze względu na fakt, że są to receptory oddziałujące na białka G a następnie na kaskady przekazywania wewnątrzkomórkowego, podział receptorów dla katecholamin zależy od typu białka G, z jakim są sprzężone:  $G_q$  (pobudzające poprzez aktywację fosfolipazy C),  $G_s$  (pobudzające poprzez podniesienie poziomu cAMP),  $G_{i/o}$  (hamujące poprzez obniżenie poziomu cAMP) (Levitzki, 1978). Ich działanie nie powoduje szybkiej transmisji synaptycznej i może wywoływać zarówno krótkotrwałe jak i długotrwałe efekty. Krótkotrwałe efekty wiążą się z bezpośrednim wpływem aktywowanych białek G na mechanizmy komórkowe do których zalicza się modulacja aktywności kanałów jonowych (VDCC – ang. *voltage-dependent calcium channels*, GIRK – ang. *G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels*) czy enzymów (np. fosfolipaza C, kinaza G, monoaminooksydaza). Jednym z efektów krótkotrwałych jest wstawianie receptorów (ang. *trafficking*) na powierzchnię komórki poprzez mobilizację rezerwuarów wewnętrznych. Przykładem może być szybkie wstawianie receptorów dla glutaminianu typu AMPA w hipokampie. Mechanizm ten jest kluczowy dla powstawania długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. *long-term potentiation*, LTP), które z kolei leży u podstaw uczenia się i procesów pamięciowych (Gainetdinov *et al.*, 2004; Betke *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Długotrwałe efekty są wynikiem wpływu aktywacji GPCRs na ekspresję genów i syntezę białek. Długotrwała aktywacja białek G może obejmować zmiany w ekspresji genów

kodujących receptory i prowadzić do trwałych zmian w ich liczbie na powierzchni błony komórkowej, a co za tym idzie – reaktywności na sygnały zewnętrzne. Może również wpływać na ekspresję białek z rodziny SNARE, zaangażowanych w proces egzocytozy (Südhof & Rothman, 2009). Co więcej, aktywowane przez białka G mogą być czynniki transkrypcyjne takie jak CREB (ang. *cAMP response element-binding protein*), prowadząc do zmian ekspresji genów, przykładem może być zwiększona ekspresja genu *BDNF* (ang. *brain-derived neurotrophic factor*) i produkcji białka BDNF istotnego dla rozwoju i przetrwania neuronów, ale także powstawania LTP (Bramham & Messaoudi, 2005; Carlezon et al., 2005).

## **2. Anatomia funkcjonalna układów katecholaminergicznych**

Ciała komórkowe neuronów katecholaminergicznych zlokalizowane są w konkretnych rejonach mózgowia, natomiast projekcje tych neuronów są bardzo szerokie. Szlaki katecholaminergiczne zostały po raz pierwszy opisane już w latach sześćdziesiątych XX wieku (Dahlström & Fuxe, 1964; Dahlström & Fuxe, 1964; Andén *et al.*, 1966).

### **2.1 Układ dopaminergiczny**

Główne skupiska ciał komórkowych neuronów dopaminergicznych zlokalizowane są przede wszystkim w śródmózgowiu (jądra od A8 do A10), międzymózgowiu, opuszkach węchowych, a także w siatkówce (jądra od A11 do A17). Neurony dopaminergiczne tworzą cztery główne szlaki. Projekcje z istoty czarnej (A9) do grzbietowej części prążkowiec stanowią szlak nigrostriatalny, który reguluje w głównej mierze funkcje ruchowe. Zaburzenia w obszarze tego szlaku, związane z degradacją neuronów dopaminergicznych, występują w chorobie Parkinsona, której objawami są między innymi zubożenie ruchowe oraz drżenie spoczynkowe. Połączenie jąder komórek dopaminergicznych zlokalizowanych w podwzgórzu z przednią częścią przysadki tworzy szlak guzkowo-lejkowy odpowiedzialny za gospodarkę hormonalną poprzez regulację uwalniania prolaktyny do krwi. Pole brzuszne nakrywki (ang. *ventral tegmental area* – VTA – odpowiadające obszarom A8 i A10) jest jądrem, którego projekcje tworzą dwa kolejne szlaki dopaminergiczne. Połączenia VTA z korą przedczołową (ang. *prefrontal cortex*; PFC) tworzą szlak mezokortykalny, natomiast połączenia ze strukturami limbicznymi, między innymi jądrem półleżącym przegrody (*nucleus accumbens*; NAc) i ciałem migdałowatym (*amygdala*; AMY) tworzą szlak mezolimbiczny. Szlaki te nazywane są często zbiorczo szlakiem mezokortykolimbicznym, ponieważ oba pełnią

podobne funkcje i wpływają na procesy uczenia się i zapamiętywania, a także regulują motywację i są główną częścią układu nagrody (Le Moal & Simon, 1991; Wise, 2002; Young *et al.*, 2011).

### **2.1.1 Receptory dopaminergiczne**

Receptory dla dopaminy można podzielić na dwie główne grupy: rodzinę receptorów D<sub>1</sub>, do których należą podtypy D<sub>1</sub> i D<sub>5</sub> oraz rodzinę receptorów D<sub>2</sub> składającą się z podtypów D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> i D<sub>4</sub>. Receptory należące do rodziny receptorów D<sub>1</sub> sprzężone są z białkiem G<sub>s</sub>, a ich aktywacja prowadzi do zwiększenia aktywności cyklazy adenylanowej i do wzrostu stężenia cAMP, która w konsekwencji aktywuje kinazę białkową A (PKA). Aktywowana PKA może następnie fosforylować czynniki transkrypcyjne np. CREB, kanały jonowe i enzymy i prowadzi do pobudzenia komórki. Receptory typu D<sub>1</sub> zlokalizowane są głównie postsynaptycznie, między innymi w takich strukturach jak NAc, PFC, AMY, hipokamp, podwzgórze i wzgórze. Rodzina D<sub>2</sub> to receptory związane z białkiem G<sub>i/o</sub>. Aktywacja tych białek, wywołana przyłączeniem neurotransmitera do receptora, powoduje zahamowanie cyklazy adenylanowej, obniżenie poziomu cAMP i zahamowania PKA, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji działania kanałów potasowych i zamykania kanałów wapniowych, a zatem do zmniejszenia aktywności neuronów. Ten typ receptorów zlokalizowany jest zarówno post- jak i presynaptycznie między innymi w hipokampie, PFC, jądrach podstawnych, AMY, VTA, podwzgórz i wzgórzu. Receptory zlokalizowane presynaptycznie pełnią funkcję autoreceptorów i mają z reguły znacznie wyższe powinowactwo do dopaminy niż receptory zlokalizowane postsynaptycznie (Missale *et al.*, 1998; Neve *et al.*, 2004).

### **2.1.2 Wzorce aktywności neuronów dopaminergicznych**

Różnice w reakcjach organizmu na bodźce wpływające na uwalnianie katecholamin nie zależą jedynie od rodzaju i umiejscowienia odpowiednich dla nich receptorów, ale również od wzorców aktywności neuronów zarówno dopaminergicznych, jak i noradrenergicznych. Zmiany w aktywności neuronów katecholaminergicznych odgrywają ważną rolę w wielu funkcjach mózgu, w tym w motywacji, reakcjach na wzmocnienia zarówno pozytywne jak i negatywne, w utrzymaniu odpowiedniego poziomu uwagowego, a także w procesach pamięciowych (Sara, 2009; Sara & Bouret, 2012; Poe *et al.*, 2020).

Neurony dopaminergiczne charakteryzują się dwoma wzorcami aktywności. W warunkach podstawowych, czyli takich, w których nie jest obecna istotna stymulacja ze środowiska, neurony dopaminergiczne wykazują głównie aktywność toniczną



charakteryzującą się występowaniem potencjałów czynnościowych o częstotliwości od około 0.5 Hz do 10 Hz ze średnią około 4-5 Hz (Grace & Bunney, 1984a, 1984b; Marinelli & McCutcheon, 2014). Wynikiem takiej aktywności jest toniczne uwalnianie dopaminy, czyli uwalnianie niewielkich ilości neuroprzekaźnika odpowiedzialnych za utrzymanie w strukturach docelowych stałego jego poziomu, który jest niezbędny do podtrzymania bazowego poziomu pobudzenia, czy funkcji ruchowych. Natomiast gdy do organizmu docierają istotne bodźce, aktywność neuronów dopaminergicznych zmienia się – następuje wzrost częstotliwości występowania potencjałów czynnościowych, czyli iskrzenie napadowe (ang. *bursting*). Iskrzenie napadowe to szybkie wyzwalenie serii potencjałów czynnościowych z częstotliwością powyżej 10 Hz. Konsekwencją takiej aktywności neuronów dopaminergicznych jest szybkie uwalnianie dużej ilości dopaminy, co prowadzi do przejściowego zwiększenia stężenia neuroprzekaźnika w strukturach docelowych (Grace & Bunney, 1984b; Schultz *et al.*, 1997; Marinelli & McCutcheon, 2014). Zjawisko to jest również nazywane fazową aktywnością neuronów dopaminergicznych, a uwolniona w jej wyniku dopamina – fazowo uwalnianą dopaminą (Grace, 1995). Fazowo uwalniana dopamina, ze względu na szybkie zmiany stężenia, może być mierzona metodami takimi jak szybko-skannowa woltamperometria cykliczna (ang. *fast-scan cyclic voltammetry*; FSCV). Aktywność fazowa neuronów dopaminergicznych może występować spontanicznie w odpowiedzi na istotne bodźce środowiskowe, ale może być również wywołana bezpośrednią stymulacją ciał komórek dopaminergicznych. Fazowe uwalnianie dopaminy odgrywa kluczową rolę w procesach motywacji, przetwarzania bodźców o charakterze pozytywnego i negatywnego wzmocnienia, pomaga w kontrolowaniu precyzyjnych ruchów, jest zaangażowane w procesy poznawcze, uczenie się i formowanie śladów pamięciowych (Wise, 2004; Berridge, 2007; Schultz, 2007). Zaburzenia w fazowym uwalnianiu dopaminy prowadzą do rozwoju patofizjologii, między innymi uzależnień, depresji czy zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ang. *attention deficit hyperactivity disorder*; ADHD) (Nestler & Carlezon, 2006; Volkow *et al.*, 2009; Koob & Volkow, 2010; Del Campo *et al.*, 2011).

## **2.2 Układ noradrenergiczny**

Neurony noradrenergiczne charakteryzują się cienkimi, szeroko rozgałęzionymi, pokrytymi żyłakowatościami aksonami, które zawierają w sobie pęcherzyki synaptyczne. Ze względu na żyłakowatości i fakt, że aksony obejmują duże obszary mózgu, uważa się, że w

wielu przypadkach nie nawiązują one bezpośrednich kontaktów synaptycznych, a uwalnianie neuroprzekaźnika ma w dużej mierze charakter transmisji objętościowej. Za główne jądro noradrenergiczne uznawane jest miejsce sinawe (*locus coeruleus*; LC; A6) zlokalizowane w pniu mózgu. Posiada ono najszersze projekcje ze wszystkich jąder noradrenergicznych. Poza miejscem sinawym główne eferenty noradrenergiczne pochodzą z jądra A1 zlokalizowanego w brzuszno-bocznej części rdzenia przedłużonego oraz jądra A2 zlokalizowanego w jądrze pasma samotnego (ang. *nucleus of solitary tract*). Jądra A5 i A7 tworzone są przez grupę boczno-nakrywkowych komórek noradrenergicznych (Guyenet, 1991; Sara, 2009). Układ noradrenergiczny odgrywa istotną rolę w utrzymaniu odpowiedniego poziomu pobudzenia, uwagi i koncentracji, a także w procesach pamięciowych. Ponadto, jest zaangażowany w regulację cyklu snu i czuwania, a także w modulowanie reakcji organizmu na stres. Układ noradrenergiczny, ze swoim centrum w LC, ściśle współpracuje z układem współczulnym, tworząc spójny mechanizm regulacji fizjologicznej, który pomaga organizmowi adaptować się do zmieniających się warunków zewnętrznych i wewnętrznych (Berridge & Waterhouse, 2003; Samuels & Szabadi, 2008).

### 2.2.1 Receptory noradrenergiczne

Receptory noradrenergiczne, podobnie jak dopaminergiczne, również podzielić można na dwie główne grupy: receptory  $\alpha$ -adrenergiczne oraz receptory  $\beta$ -adrenergiczne. Receptory  $\alpha$ -adrenergiczne podzielono dalej na dwie kolejne grupy, a każda z nich może występować w trzech podtypach. Receptory  $\alpha_1$ -adrenergiczne z podtypami  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  oraz receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne z podtypami  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ . Wszystkie podtypy receptora  $\alpha_1$ -adrenergicznego są receptorami pobudzającymi sprzężonymi z białkiem  $G_q$ , których aktywacja prowadzi do aktywacji fosfolipazy C. Fosfolipaza C katalizuje przekształcenie fosfatydyloinozytolu 4,5-bisfosforanu (PIP2) w błonie komórkowej na dwa drugorzędne przekaźniki: inozytol 1,4,5-trifosforan (IP3) i diacyloglicerol (DAG). IP3 wiąże się z receptorami IP3 na powierzchni siateczki śródplazmatycznej, co prowadzi do zwiększonego uwalniania jonów wapnia do cytozolu. DAG, w połączeniu z jonami  $Ca^{2+}$ , aktywuje kinazę białkową C (PKC), która fosforyluje szereg białek docelowych (takich jak białka cytoszkieletu, receptory czy białka związane z egzocytozą) i prowadzi do pobudzenia komórki. Zlokalizowane są z reguły postsynaptycznie, między innymi, w takich strukturach jak PFC, VTA, AMY, hipokamp. Receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne są receptorami hamującymi, związanymi z białkiem  $G_{i/o}$ . Oddziaływanie na nie neuroprzekaźnika skutkuje zahamowaniem cykazy adenylanowej i obniżeniem poziomu cAMP. Receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne występują zarówno post- jak i

presynaptycznie i pełnią funkcję autoreceptorów regulujących uwalnianie neuroprzekaźnika. Zlokalizowane są między innymi w LC, VTA, hipokampie, opuszkach węchowych czy w pniu mózgu. Grupę receptorów  $\beta$ -adrenergicznych również podzielono na trzy podtypy:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  oraz  $\beta_3$ , z których wszystkie są pobudzające i sprzężone z białkiem  $G_s$ . Zwiększają one aktywność cykazy adenylanowej i podnoszą poziom cAMP (Strosberg, 1993; Philipp & Hein, 2004; Hein, 2006).

### **2.2.2 Wzorce aktywności neuronów noradrenergicznych**

Neurony noradrenergiczne, podobnie jak dopaminergiczne, cechują się różnym poziomem aktywności w zależności od stanu pobudzenia organizmu, jednak w przeciwieństwie do neuronów dopaminergicznych wykazują węższy zakres częstotliwości wyładowań. Podczas snu, zwłaszcza w fazie REM, częstotliwość wyładowań neuronów noradrenergicznych jest bliska zeru i wzrasta wraz ze wzrostem pobudzenia organizmu, aż do częstotliwości 5-6 Hz w sytuacjach stresowych (Aston-Jones & Cohen, 2005; Berridge *et al.*, 2012; Poe *et al.*, 2020). Co więcej, neurony noradrenergiczne w obrębie LC cechują się zróżnicowaną fizjologią, np. neurony projektujące do przodomózgowia charakteryzują się wyższą wrażliwością i częstotliwością występowania potencjałów czynnościowych niż te projektujące do kory ruchowej czy układu czuciowego rdzenia kręgowego (Uematsu *et al.*, 2017; Poe *et al.*, 2020). Różnice te w połączeniu ze specyficznymi obszarami projekcji, umiejscowieniem i rodzajem receptorów na które działa noradrenalina odpowiadają za efekty tego neuroprzekaźnika na warunkowanie i wygaszanie pamięci strachu, lęk czy reakcje na bodźce awersyjne (Hirschberg *et al.*, 2017; Uematsu *et al.*, 2017; Poe *et al.*, 2020).

## **3. Interakcje pomiędzy układem dopaminergicznym i noradrenergicznym**

Układ noradrenergiczny i dopaminergiczny wykazują wiele podobieństw. Oba neuroprzekaźniki są katecholaminami i mają podobną strukturę chemiczną, współdzielą ścieżki projekcji, wykazują działanie w podobnych skalach czasowych, zbliżone powinowactwo do receptorów, a także podobne funkcje (Bouret *et al.*, 2012; Sara & Bouret, 2012; Ranjbar-Slamloo & Fazlali, 2020). Ze względu na opisane podobieństwa układów katecholaminergicznych uważa się, że mogą one wywoływać zbieżne efekty w ośrodkowym układzie nerwowym.

W badaniach Devoto i in., metodą mikrodializy wykazano, że w obszarach kory mózgowej charakteryzujących się niewielkim unerwieniem dopaminergicznym w porównaniu do noradrenergicznego, substancje działające na przewodnictwo noradrenergiczne powodują równoczesne zmiany również w poziomie dopaminy (Devoto *et al.*, 2001, 2003). Ponadto, stwierdzono, że zarówno farmakologiczna, jak i elektryczna stymulacja LC, obszaru mózgu odpowiedzialnego za produkcję noradrenaliny, powoduje równoczesne zmiany w poziomach obu neurotransmiterów. Na tej podstawie zaproponowano hipotezę, że dopamina w korze mózgowej może być uwalniana nie tylko z zakończeń dopaminergicznych pochodzących z VTA (Shnitko & Robinson, 2014), ale również wraz z noradrenaliną z zakończeń noradrenergicznych, gdzie działa zarówno jako prekursor jak i kotransmitter noradrenaliny (Devoto *et al.*, 2001, 2003, 2005; Devoto & Flore, 2006). Opisane wyniki potwierdzono również w innych badaniach gdzie zaobserwowano, że po elektrycznej stymulacji LC obserwowany jest ponad dwukrotny wzrost poziomu dopaminy w mPFC i jedynie niewielki wzrost w NAc. Dodatkowo wykazano, że podanie inhibitora wychwytu zwrotnego NET powoduje wzrost poziomu dopaminy w mPFC, ale nie w NAc. Sugeruje to, że w przypadku niewielkiej ekspresji DAT w stosunku do NET, np. w mPFC, dopamina może być również wychwytywana przez transporter dla noradrenaliny (Masana *et al.*, 2011).

Co więcej, podobne obserwacje poczyniono w hipokampie. Hipokamp jest strukturą ściśle związaną z procesami pamięciowymi, podobnie do kory mózgowej posiada szersze unerwienie noradrenergiczne pochodzące z LC w porównaniu do dopaminergicznego pochodzącego z VTA. W badaniach Takeuchi i in., wykazano, że neurony VTA-TH<sup>+</sup>, wbrew oczekiwaniom, są jedynie nieznacznie aktywowane w odpowiedzi na nowość środowiskową (ang. *novelty*), a ich farmakologiczna blokada nie wpływa na procesy pamięciowe zachodzące w hipokampie. Natomiast, neurony LC-TH<sup>+</sup> wykazują wyższą reaktywność na nowość środowiskową, a ich aktywacja znacząco wpływa na pamięć. Ponadto efekt ten był blokowany poprzez podanie antagonistów receptorów dopaminowych typu D<sub>1</sub> do hipokampa. Autorzy wysnuli więc wniosek, że obserwowane efekty spowodowane są synergistycznym uwalnianiem dopaminy i noradrenaliny z neuronów LC-TH<sup>+</sup> (Takeuchi *et al.*, 2016). W badaniach Kempadoo i in., również wykazano, że optogenetyczna stymulacja aksonów LC w grzbietowym hipokampie powoduje wzrost poziomu dopaminy a w konsekwencji poprawia selektywną uwagę i rozpoznawanie obiektów przestrzennych. Wyniki te wskazują, że uczenie się przestrzenne i pamięć są wzmacniane za pośrednictwem dopaminy uwalnianej z zakończeń noradrenergicznych pochodzących z LC (Kempadoo *et al.*, 2016). Kwestia pochodzenia dopaminy, jak wskazują inni autorzy, jest jednak prawdopodobnie bardziej

skomplikowana. Bezprzecnie dopamina uwalniania w hipokampie jest istotna dla procesów długotrwałej plastyczności synaptycznej w tej strukturze i jej wpływu na pamięć. Natomiast pomimo – jak się wydaje, rzeczywiście niewielkiego – zagęszczenia projekcji dopaminergicznych VTA-hipokamp, niedawne badania optogenetyczne wykazały jednak istotny udział dopaminy uwalnianej z połączeń pochodzących z niewielkiej grupy neuronów zlokalizowanych na granicy VTA i istoty czarnej do hipokampa (Tsetsenis *et al.*, 2021, 2023).

Podsumowując, pomimo, że dopamina i noradrenalina odgrywają unikalne role w różnych strukturach mózgu, istnieją również dowody na to, że neurotransmitery te wykazują szereg podobieństw, są silnie powiązane i mogą działać synergistycznie w regulacji procesów poznawczych. Natomiast pomimo tego, że współdziałanie tych przekaźników w docelowych strukturach kresomózgowia, takich jak hipokamp czy kora, jest obiektem szeroko zakrojonych badań, a nawet pewnego rodzaju kontrowersji, to nadal relatywnie niewiele wiadomo o ich interakcjach w jądrach katecholaminergicznych – przykładowo, o fizjologii i znaczeniu projekcji noradrenergicznych do VTA. Ten stan rzeczy stanowił w dużej mierze motywację do badań zaprezentowanych w niniejszej pracy.

#### **4. Pole brzuszne nakrywki – funkcje i najważniejsze projekcje**

Pole brzuszne nakrywki to jądro śródmózgowia, które, zaraz po istocie czarnej, jest głównym źródłem dopaminy w mózgu. Część neuronów projektujących z VTA tworzy szlak mezolimbiczny, którego główne projekcje obejmują m.in. NAc i podstawno-boczne jądro migdałowe (ang. *basolateral amygdala*; BLA). Dopamina uwalniana z zakończeń aksonalnych VTA w NAc uważana jest za kluczowy neurotransmitter układu nagrody. System ten odpowiedzialny jest za wzmacnianie zachowań ewolucyjnie korzystnych poprzez kodowanie znaczenia i wartości bodźców pochodzących ze środowiska (Berridge & Robinson, 1998; Wise, 2004; Schultz, 2010). Co więcej, udowodniono, że dopamina uwalniana w NAc bierze udział w uczeniu się i formowaniu pamięci (Salamone & Correa, 2002; Wise, 2004). Dopamina w BLA pełni natomiast istotną rolę w procesach regulacji emocji, lęku, motywacji i również uczestniczy w formowaniu pamięci (Rosenkranz & Grace, 2002; de Oliveira *et al.*, 2011; Tye *et al.*, 2011). Dysfunkcje uwalniania dopaminy do wspomnianych struktur obserwowane są w wielu zaburzeniach takich jak uzależnienia od substancji, depresja, schizofrenia, zaburzenia lękowe czy zespół stresu pourazowego (ang.

*post-traumatic stress disorder*; PTSD) (Feltenstein & See, 2008; Admon *et al.*, 2013; Grace, 2016; Koob & Volkow, 2016).

Aktywność neuronów w VTA nie tylko reguluje działanie struktur, do których to jądro projektuje, ale również – poprzez projekcje, które ono otrzymuje – sama podlega regulacji. Jednym z modulatorów działania układu dopaminergicznego jest właśnie noradrenalina (Grenhoff *et al.*, 1993; Guiard *et al.*, 2008; Mejias-Aponte, 2016). Istnieje również szereg dowodów na to, że noradrenalina działająca zarówno na receptory noradrenergiczne jak i dopaminergiczne (poprzez ich krzyżową aktywację – mechanizm opisany w późniejszych częściach rozprawy) działa jako modulator aktywności komórek dopaminergicznych i w konsekwencji uwalniania dopaminy (Grenhoff *et al.*, 1993; Guiard *et al.*, 2008; Bouret *et al.*, 2012; Lammel *et al.*, 2014; Mejias-Aponte, 2016). VTA to struktura niejednorodna, składa się głównie z neuronów dopaminergicznych stanowiących około 65% wszystkich komórek w tym obszarze, ale również z neuronów GABAergicznych (około 25%) i glutaminianergicznych (około 3%) (Nair-Roberts *et al.*, 2008; Morales & Margolis, 2017). VTA otrzymuje projekcje noradrenergiczne głównie z LC, ale również z jąder obszaru A1 i A2, a noradrenalina uwalniana z tych zakończeń oddziałuje głównie na receptory noradrenergiczne zlokalizowane w tej strukturze (Mejías-Aponte *et al.*, 2009; Sara, 2009; Aston-Jones & Waterhouse, 2016; Mejias-Aponte, 2016; Solecki *et al.*, 2019, 2022). W VTA obecne są wszystkie rodzaje receptorów adrenergicznych, przy czym dominuje ekspresja receptorów  $\alpha_1$ - oraz  $\alpha_2$ -adrenergicznych, a dowody na obecność receptorów  $\beta$ -adrenergicznych są mniej jednoznaczne (Mejías-Aponte *et al.*, 2009; Rommelfanger *et al.*, 2009; Mejias-Aponte, 2016). Receptory  $\alpha_1$ - oraz  $\alpha_2$ -adrenergiczne mogą być zlokalizowane zarówno na neuronach dopaminergicznych, jak i niedopaminergicznych, dodatkowo receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne zlokalizowane na zakończeniach aksonów noradrenergicznych działają jako autoreceptory (Aston-Jones & Cohen, 2005; Mejías-Aponte *et al.*, 2009; Mejias-Aponte, 2016; Solecki *et al.*, 2019, 2022). Wykazano również, że receptory  $\alpha_1$ -adrenergiczne są obecne na zakończeniach glutaminianergicznych oraz GABAergicznych, co umożliwia presynaptyczną regulację uwalniania glutamianu i GABA. Udowodniono, że aktywacja receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych zmniejsza uwalnianie GABA i częstotliwość postsynaptycznych prądów hamujących GABA<sub>A</sub> (Velásquez-Martínez *et al.*, 2015). Natomiast aktywacja tych receptorów na zakończeniach glutaminianergicznych prowadzi do zwiększonego uwalniania glutamianu (Velásquez-Martínez *et al.*, 2012). Przytoczone wyniki wskazują na możliwość regulacji aktywności neuronów dopaminergicznych w VTA pośrednio - poprzez zmiany w poziomie GABA i glutamianu.

## 5. Wpływ noradrenaliny na aktywność neuronów w polu brzusznej nakrywki i uwalnianie dopaminy w przodomózgowiu

Już w latach osiemdziesiątych XX wieku rozpoczęto badania wpływu przekaźnictwa noradrenergicznego na aktywność neuronów dopaminergicznych, a tym samym na uwalnianie dopaminy do struktur docelowych. W 1988 roku Grenhoff i Svensson opisali, że u szczurów dożylnie podana klonidyna, która jest agonistą receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, zwiększa regularność występowania potencjałów czynnościowych w VTA bez wpływu na częstotliwość ich występowania. Natomiast podanie antagonisty tych receptorów (idazoksan) zwiększało częstotliwość potencjałów czynnościowych i blokowało działanie klonidyny (Grenhoff & Svensson, 1988, 1989). Pomimo tego, że substancje działające na receptory adrenergiczne podawane były systemowo, a co za tym idzie, niemożliwym było dokładne określenie miejsca ich działania, były to pierwsze dowody na fakt, że substancje te mogą zmieniać aktywność neuronów dopaminergicznych.

W wyniku stymulacji elektrycznej rejonów mózgu, w których znajdują się ciała neuronów noradrenergicznych (LC i A2), również zaobserwowano zmiany w aktywności neuronów dopaminergicznych VTA (Grenhoff *et al.*, 1993; Mejias-Aponte, 2016). W dalszych badaniach wykazano, że systemowe podanie prazosyny, antagonisty receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych zmniejszało (Grenhoff & Svensson, 1993), a systemowe podania reboksetyny (inhibitora wychwyty zwrotnego noradrenaliny), zwiększało częstotliwość występowania potencjałów czynnościowych neuronów dopaminergicznych w VTA (Linnér *et al.*, 2001). Co więcej, miejscowe podania substancji działających na receptory adrenergiczne w VTA również wpływają na aktywność komórek dopaminergicznych. Wykazano, że noradrenalina w VTA hamuje aktywność neuronów dopaminergicznych w tej strukturze poprzez aktywację receptorów dopaminowych typu  $D_2$  – jontoforetyczne podanie noradrenaliny zmniejszało częstotliwość występowania potencjałów czynnościowych, a efekt ten był blokowany przez podanie antagonisty receptorów  $D_2$  (Aghajanian & Bunney, 1977; White & Wang, 1984; Guiard *et al.*, 2008). Podobny efekt w postaci niewielkiego zmniejszenia aktywności komórek dopaminergicznych zaobserwowano po miejscowym podaniu agonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych (White & Wang, 1984). W przeciwieństwie do hamującego działania agonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych aktywacja receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych przez fenylefrynę zwiększała zarówno częstotliwość występowania potencjałów czynnościowych, jak i iskrzenie napadowe neuronów dopaminergicznych w VTA (Goertz *et al.*, 2015). Udowodniono również, że jontoforetyczne podanie fenylefryny

proceeds to the excitation of non-dopaminergic neurons, whereas it exhibited an inhibitory effect on the activity of dopaminergic neurons localized in the VTA. Clonidine (agonist of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors) did not affect the activity of dopaminergic neurons, but it slightly changed the regularity of action potentials of non-dopaminergic neurons without changes in the frequency of action potentials. Similarly, the administration of an agonist of  $\beta$ -adrenergic receptors had no effect on the activity of neurons, both dopaminergic and non-dopaminergic, but an increase in the frequency of action potentials of non-dopaminergic neurons was observed (Pradel *et al.*, 2018). Using the electrophysiological method of *patch-clamp* recordings of dopaminergic VTA neurons, it was shown that agonists of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor cause a decrease in the amplitude of postsynaptic action potentials evoked by glutamate (Jiménez-Rivera *et al.*, 2012) and an increase in spontaneous postsynaptic action potentials (Cathala *et al.*, 2002).

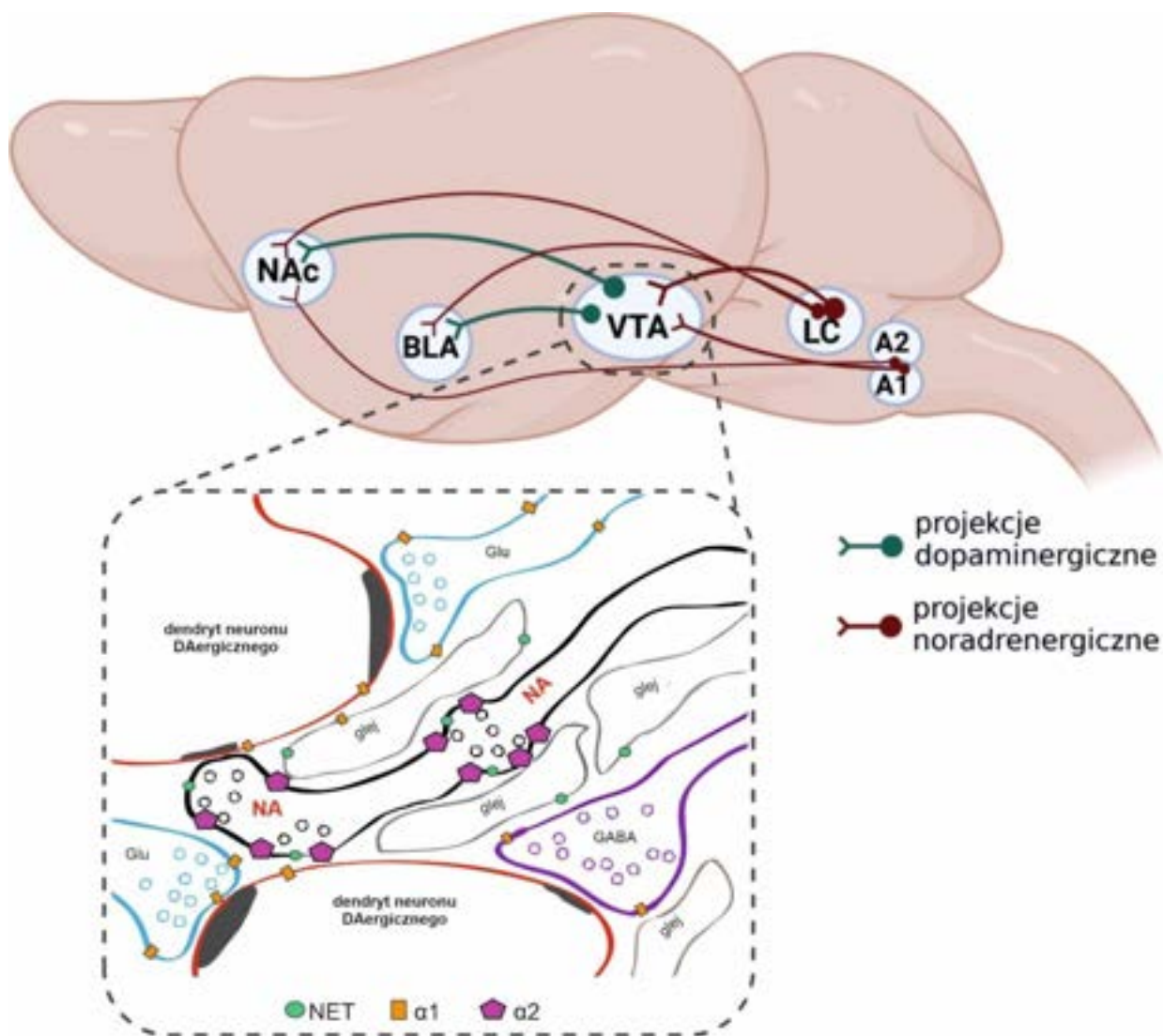
Changes in the activity of VTA neurons are reflected in changes in dopamine release from their terminals. There is a series of literature data describing the influence of noradrenergic transmission on dopamine release to target structures. It was shown that electrical stimulation of the LC causes the release of norepinephrine in the VTA, which – acting on  $\alpha_1$ -adrenergic receptors on dopaminergic neurons – in consequence triggers dopamine release to the NAc (Park *et al.*, 2017). Complementing these data, in our earlier studies using FSCV, we examined the effect of VTA antagonists of all major groups of adrenergic receptors on both phasic and tonic dopamine release to the NAc after electrical stimulation of the VTA. It was shown that blockade of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in the VTA, combined with electrical stimulation of this structure, leads to a decrease in phasic dopamine release to the NAc, but not to the mPFC. Interestingly, blockade of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in the VTA almost completely inhibited phasic dopamine release to the NAc, and this effect was dependent on the activity of dopamine receptors of the  $D_2$  type. Administration of  $\beta$ -adrenergic receptor antagonists had no effect on dopamine release to the NAc (Kielbinski *et al.*, 2019).

Changes in noradrenergic transmission, affecting the activity of dopaminergic neurons and dopamine release, also have a behavioral reflection in animals. In behavioral studies, it was shown that noradrenergic activity in the VTA regulates the behavior of the substance of dependence in conditions of abstinence in mice. Administration of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonists to



VTA zmniejszało motywację do poszukiwania kokainy w abstynencji, a podanie zarówno agonisty tych receptorów, jak i antagonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych nasilało zachowania poszukiwawcze substancji (Solecki *et al.*, 2018). Uzupełniono te wyniki badaniami dowodzącymi, że blokada receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych w VTA zmniejsza poszukiwanie kokainy w nowym kontekście oraz nawrót wywołany bodźcami warunkowymi, ale nie ma wpływu na nawrót wywołany stresem oraz na poszukiwanie naturalnej nagrody (Solecki *et al.*, 2019). Dodatkowo wykazano, że antagonisty receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych podany do VTA zaburza pawłowskie asocjacyjne uczenie się skojarzone z pozytywnym bodźcem – kokainą (Solecki *et al.*, 2022).

Ze względu na fakt, że oba opisywane systemy katecholaminergiczne zaangażowane są w odpowiedź na bodźce awersyjne, modulacyjny wpływ noradrenaliny na dopaminę zbadano również w eksperymentach behawioralnych związanych ze stresem. Między innymi wykazano, że zmiany w aktywności receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych w VTA mogą wpływać na procesy pamięciowe w paradygmacie warunkowania strachu, gdzie podanie antagonisty receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych do VTA powodowało zarówno zaburzenia w nabywaniu, jak i przywoływaniu pamięci strachu (Solecki *et al.*, 2017). Przedstawione wyniki behawioralne wskazują na modulacyjną rolę noradrenaliny w VTA na układ dopaminergiczny w kontekście uzależnień i pamięci strachu.



Ryc. 1 Schemat omawianych w rozprawie projekcji noradrenergicznych (czerwone) pochodzących z miejsca sinawego (LC) oraz z obszaru A1 i A2 do pola brzuszego nakrywki (VTA; Mejías-Aponte et al., 2009), jądra półleżącego przegrody (NAc; Delfs et al., 1998) i podstawno-bocznego jądra migdałowatego (BLA; Fallon et al., 1978) oraz połączeń dopaminergicznych (zielone) z VTA do BLA i NAc (Berridge et al., 1997, Fallon et al., 1978). Poniżej schemat lokalizacji receptorów noradrenergicznych w VTA – zaadaptowano i zmieniono za Mejias – Aponte 2016.

## 6. Wpływ stresu na układ katecholaminergiczny

Jak wcześniej wspomniano, oba układy katecholaminergiczne – dopaminergiczny i noradrenergiczny – są jednymi z kluczowych regulatorów prawidłowego działania ośrodkowego układu nerwowego. Zaburzenia w funkcjonowaniu tych układów są powiązane z patogenezą licznych schorzeń takich jak choroba Parkinsona, ADHD, depresja, schizofrenia, zaburzenia lękowe, PTSD czy uzależnienia od substancji psychoaktywnych

(Aston-Jones & Cohen, 2005; Morilak *et al.*, 2005; Smith & Aston-Jones, 2008; Mitrano *et al.*, 2012; Koob, 2014; Koob *et al.*, 2014). Jednocześnie większość z tych zaburzeń powiązana jest z narażeniem organizmu na stres, który prowadzi do szeregu zmian w organizmie takich jak aktywacja osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*; HPA) i wzrostu poziomu kortyzolu czy modulacji poziomu katecholamin w ośrodkowym układzie nerwowym (Charney, 2004; Lupien *et al.*, 2009).

Stres w znaczący sposób wpływa na układ noradrenergiczny, który pełni kluczową rolę w utrzymaniu odpowiedniego poziomu pobudzenia i uwagi. Bodźce stresowe powodują szybki wzrost aktywności neuronów noradrenergicznych (poprzez zmianę aktywności z tonicznej na fazową), prowadząc do wzrostu uwalniania noradrenaliny w strukturach, do których neurony te projektują (Korf *et al.*, 1973; Rasmussen *et al.*, 1986; Aston-Jones *et al.*, 1991; Morilak *et al.*, 2005; Valentino & Van Bockstaele, 2008; Sara & Bouret, 2012). Podniesiony poziom uwalniania noradrenaliny ma na celu zwiększenie czujności, uwagi, koncentracji i gotowości do odpowiedniej reakcji na zagrożenie (Morilak *et al.*, 2005; Sara & Bouret, 2012). Co więcej, farmakologiczne manipulacje mające na celu podniesienie poziomu noradrenaliny w strukturach przodomózgowia poprzez bezpośrednią infuzję noradrenaliny lub działanie na receptory noradrenergiczne prowadziły do reakcji behawioralnych analogicznych do obserwowanych po bodźcach stresowych. Prowadzi to do wniosku, że za występowanie reakcji tych odpowiedzialna jest właśnie aktywacja układu noradrenergicznego (Arnsten, 2000; Berridge & Waterhouse, 2003; Aston-Jones & Cohen, 2005; Morilak *et al.*, 2005; Sara & Bouret, 2012; Reyes *et al.*, 2015). W najnowszych badaniach Zerbi i in. połączyli funkcjonalne neuroobrazowanie z chemogenetyczną aktywacją neuronów LC, pomiarem lokalnego obrotu noradrenaliny, a także pomiarem ekspresji receptorów noradrenergicznych w strukturach docelowych. U myszy chemogenetyczna aktywacja LC prowadziła nie tylko do wzrostu zachowań określanych jako behawioralne markery stresu (obniżona aktywność lokomotoryczna, skrócenie czasu spędzanego w centralnej części otwartego pola, mniej zachowań eksploracyjnych), ale także do rozszerzenia źrenic, uważanego za fizjologiczny korelat aktywacji układu noradrenergicznego w ośrodkowym układzie nerwowym. Dzięki metodom obrazowania wykazano dodatkowo, że aktywacja LC prowadzi do znacznego wzrostu aktywności struktur zaangażowanych w przetwarzanie istotności bodźców, między innymi w przednim zakręcie obręczy, wyspie, brzuszynym prądkowiu, wzgórze, hipokampie oraz AMY, a obserwowane efekty były blokowane poprzez farmakologiczną stymulację autoreceptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych systemowym podaniem medetomidyny (Zerbi *et al.*, 2019). Opisane wyniki potwierdzają, że zmiany wywołane pobudzeniem neuronów

noradrenergicznych w LC zwiększają czujność niezbędną do odpowiedniej reakcji na zagrożenia (Zerbi *et al.*, 2019), jednakże nie jest to jedyna rola układu noradrenergicznego w kontekście stresu. W licznych badaniach wykazano również, że poziom uwalnianej noradrenaliny w strukturach takich jak AMY, hipokamp czy mPFC reguluje pamięć i uczenie się w sposób zależny od tego, w którym momencie procesu uczenia stres miał miejsce (Ferry *et al.*, 1999; Roozendaal & McGaugh, 2011; Josselyn & Frankland, 2018; Schwabe *et al.*, 2022).

Noradrenalina to nie jedyny neuroprzekaźnik katecholaminergiczny, którego uwalnianie może być zmienione w odpowiedzi na stres. Udowodniono, że również układ dopaminergiczny podlega regulacji pod wpływem bodźców stresowych. Zmiany w działaniu układu mezokortykolimbicznego mogą prowadzić do rozwoju zaburzeń nastroju, depresji, lęku uogólnionego czy zaburzeń związanych z przyjmowaniem substancji uzależniających (Nestler & Carlezon, 2006; Polter & Kauer, 2014; Grace, 2016). Metodą mikrodializy wykazano, że ekspozycja na bodziec stresowy powoduje wzrost poziomu dopaminy w mPFC, NAc i AMY (Finlay *et al.*, 1995; Di Chiara *et al.*, 1999; Yadid *et al.*, 2001; Nestler & Carlezon, 2006; Holly & Miczek, 2015; Douma & de Kloet, 2020; Lowes & Harris, 2022) oraz że odpowiedni, podniesiony poziom dopaminy w tych strukturach pełni kluczową rolę w nabywaniu śladów pamięciowych w warunkowaniu klasycznym (Oei & King, 1980; Guarraci & Kapp, 1999; Nader & LeDoux, 1999; Guarraci *et al.*, 2000; Lisman *et al.*, 2011; Pignatelli & Bonci, 2015; Lee *et al.*, 2017). Co więcej, również stres chroniczny może powodować długotrwałe zmiany w funkcjonowaniu układu dopaminergicznego, prowadząc do zaburzenia zachowań adaptacyjnych i w konsekwencji to rozwoju patofizjologii takich jak depresja (Treadway & Zald, 2011; Der-Avakian & Markou, 2012; Venzala *et al.*, 2013), czy uzależnienie od substancji (Koob & Volkow, 2016).

Z przedstawionych badań wynika, że stres wpływa na oba opisywane układy katecholaminergiczne, zarówno noradrenergiczny, jak i dopaminergiczny. Niewiele jednak wiadomo o tym, jak stres może wpływać na wzajemne oddziaływania tych układów, co wydaje się szczególnie interesujące, biorąc pod uwagę ich opisane wcześniej podobieństwa, obszerne projekcje oraz szereg współdzielonych funkcji. Lepsze poznanie zachodzących pomiędzy układem noradrenergicznym i dopaminergicznym interakcji, a także potencjalnych zmian w nich zachodzących pod wpływem stresu stanowiłoby kolejny krok w zrozumieniu procesów prowadzących do rozwoju patofizjologii działania ośrodkowego układu nerwowego.

# Cele badań

Biorąc pod uwagę zagadnienia poruszone we wstępie, dotyczące współdziałania układu dopaminergicznego i noradrenergicznego w strukturach przodomózgowia w kontekście procesów ściśle związanych z aktywnością VTA, szczególnie interesujące wydaje się określenie znaczenia przekazywania noradrenergicznego w tej strukturze. W niniejszej rozprawie postawiono hipotezę, że noradrenalina uwalniana w VTA poprzez oddziaływanie na receptory dla katecholamin reguluje poziom uwalnianej dopaminy w przodomózgowiu, a w konsekwencji wpływa na procesy zależne od aktywności tych struktur, prowadząc do zmian behawioralnych u zwierząt oraz że stres może wpływać na oddziaływanie układu dopaminergicznego i noradrenergicznego w VTA.

Ogólnym celem badań było zbadanie wpływu aktywności receptorów noradrenergicznych w VTA na poziom fazowo uwalnianej dopaminy do NAc i BLA oraz określenie czy i jak stres może wpływać na tę modulację. Ponadto postanowiono zbadać, w paradygmacie warunkowania pamięci strachu, behawioralne konsekwencje zmian w aktywności receptorów noradrenergicznych w VTA.

Szczegółowe zadania badawcze:

1. Udział podtypów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego w VTA w regulacji poziom uwalniania dopaminy do NAc:
  - Wpływ podania do VTA antagonistów specyficznych dla konkretnych podtypów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego:  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - i  $\alpha_{2C}$ -adrenergicznego, na poziom uwalnianej dopaminy w NAc wywołanej elektryczną stymulacją VTA – metoda FSCV
  - Zbadanie mechanizmu działania antagonisty receptora  $\alpha_{2A}$ -adrenergicznego z użyciem antagonisty receptora dopaminowego typu  $D_2$  – metoda FSCV
  - Weryfikacja obecności białka receptora  $\alpha_{2A}$ -adrenergicznego w VTA – metoda Western blot
2. Wpływ stresu na noradrenergiczną modulację uwalniania dopaminy w BLA
  - Wpływ podania do VTA antagonisty receptora  $\alpha_1$ - oraz  $\alpha_2$ -adrenergicznego na poziom uwalnianej dopaminy w BLA wywołany elektryczną stymulacją VTA – metoda FSCV

- Wpływ ekspozycji na ostry stres na noradrenergicznie modulowane uwalnianie dopaminy w BLA poprzez receptory  $\alpha_1$ - i  $\alpha_2$ -adrenergiczne w VTA – metoda FSCV
  - Porównanie poziomu ekspresji receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA u zwierząt kontrolnych i poddanych stresowi – metoda Western blot
3. Rola aktywności receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w polu brzusznej nakrywki w reakcji na stres i uczeniu się asocjacyjnym:
- Wpływ bodźców stresowych (szok elektryczny w łapę) na poziom dopaminy, noradrenaliny oraz ich metabolitów w VTA – metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high-performance liquid chromatography*; HPLC)
  - Wpływ blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych (przez podanie antagonisty: RX-821002) na nabywanie pamięci strachu – test warunkowania strachu (ang. *fear conditioning*)
  - Wpływ blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych (RX-821002) na przywoływanie pamięci strachu – test warunkowania strachu
  - Wpływ blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych (RX-821002) na aktywność lokomotoryczną i zachowania lękowe – test otwartego pola

# **Publikacje naukowe w wersji oryginalnej**



## Alpha-2A but not 2B/C noradrenergic receptors in ventral tegmental area regulate phasic dopamine release in nucleus accumbens core

Joanna Bernacka<sup>a,b,1</sup>, Michał Kielbinski<sup>a,1</sup>, Agnieszka Wawrzczak-Bargieła<sup>b</sup>, Katarzyna Zajda<sup>a</sup>, Marzena Maćkowiak<sup>b</sup>, Ryszard Przewlocki<sup>c</sup>, Wojciech Solecki<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Jagiellonian University, Institute of Applied Psychology, Department of Neurobiology and Neuropsychology, Łojasiewicza Str. 4, 30-348, Krakow, Poland

<sup>b</sup> Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Department of Pharmacology, Laboratory of Pharmacology and Brain Biostructure, Smętna Str. 12, 31-343, Krakow, Poland

<sup>c</sup> Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Department of Molecular Neuropharmacology, Smętna Str. 12, 31-343, Krakow, Poland

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Phasic dopamine  
Ventral tegmental area  
alpha2a-adrenoreceptor  
BRL-44408  
Idazoxan  
Noradrenaline

### ABSTRACT

Adrenergic receptors (AR) in the ventral tegmental area (VTA) modulate local neuronal activity and, as a consequence, dopamine (DA) release in the mesolimbic forebrain. Such modulation has functional significance: intra-VTA blockade of  $\alpha_1$ -AR attenuates behavioral responses to salient environmental stimuli in rat models of drug seeking and conditioned fear as well as phasic DA release in the nucleus accumbens (NAc). In contrast,  $\alpha_2$ -AR in the VTA has been suggested to act primarily as autoreceptors, limiting local noradrenergic input. The regulation of noradrenaline efflux by  $\alpha_2$ -AR could be of clinical interest, as  $\alpha_2$ -AR agonists are proposed as promising pharmacological tools in the treatment of PTSD and substance use disorder. Thus, the aim of our study was to determine the subtype-specificity of  $\alpha_2$ -ARs in the VTA capable of modulating phasic DA release. We used fast scan cyclic voltammetry (FSCV) in anaesthetized male rats to measure DA release in the NAc after combined electrical stimulation and infusion of selected  $\alpha_2$ -AR antagonists into the VTA. Intra-VTA microinfusion of idazoxan – a non-subtype-specific  $\alpha_2$ -AR antagonist, as well as BRL-44408 – a selective  $\alpha_{2A}$ -AR antagonist, attenuated electrically-evoked DA in the NAc. In contrast, local administration of JP-1302 or imiloxan ( $\alpha_{2B}$ - and  $\alpha_{2C}$ -AR antagonists, respectively) had no effect. The effect of BRL-44408 on DA release was attenuated by intra-VTA DA D<sub>2</sub> antagonist (raclopride) pre-administration. Finally, we confirmed the presence of  $\alpha_{2A}$ -AR protein in the VTA using western blotting. In conclusion, these data specify  $\alpha_{2A}$ , but not  $\alpha_{2B}$ - or  $\alpha_{2C}$ -AR as the receptor subtype controlling NA release in the VTA.

### 1. Introduction

Noradrenaline (NA) in the central nervous system is involved in a broad array of functions, including rest and alertness transitions, attention, memory processing and action control (Chandler et al., 2014, 2019; Poe et al., 2020; Ranjbar-Slamloo and Fazlali, 2020; Ross and Van Bockstaele, 2021; Sara and Bouret, 2012). These functions are mediated through adrenergic receptors (ARs), a family of G protein coupled receptors comprising three types ( $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - and  $\beta$ -ARs). Each of these types is further subdivided into functionally distinct subtypes, with widespread, but distinct, expression patterns in the brain (Nicholas et al., 1996). The  $\alpha_2$ -AR were initially described as autoreceptors, providing feedback

control of NA release, with  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -ARs serving as postsynaptic effectors (Starke, 2001). This view has since been expanded, with the recognition of  $\beta$ -AR expression and function on NA neurons, and the presence of  $\alpha_2$ -ARs on postsynaptic neurons (Hein, 2006). The broader picture, such as the ‘GANE’ (“glutamate amplifies noradrenergic effects”) conceptual model put forward by Mather and others, encompasses all three classes of receptors working in concert with glutamatergic signaling in both neurons and glia to fine-tune excitatory neurotransmission and plasticity, acting as a putative gain control mechanism boosting the signal to noise ratio of behaviorally salient environmental stimuli (Mather et al., 2016; Poe et al., 2020).

The dopaminergic midbrain nucleus ventral tegmental area (VTA),

\* Corresponding author. Department of Neurobiology and Neuropsychology, Institute of Applied Psychology, Jagiellonian University, 4 Łojasiewicza Street, 30-348, Krakow, Poland.

E-mail address: [wojciech.solecki@uj.edu.pl](mailto:wojciech.solecki@uj.edu.pl) (W. Solecki).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109258>

Received 19 April 2022; Received in revised form 9 September 2022; Accepted 11 September 2022

Available online 16 September 2022

0028-3908/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.



responsible for dopamine's (DA) role in reward and memory processing has emerged as potential locus for noradrenergic modulation (Mejias-Aponte, 2016). The VTA receives robust innervation from noradrenergic nuclei A1, A2 and A6 (also known as locus coeruleus, LC; Mejias-Aponte et al., 2009). Expression of multiple AR types has also been reported, based on ligand binding, immunohistochemical and in situ hybridization studies, suggesting the presence of  $\alpha_1$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2C}$  and, to a lesser extent,  $\beta$ -ARs on both pre- and postsynaptic neuronal elements in the VTA, as well as glia (for comprehensive review, see Mejias-Aponte, 2016). Furthermore, NA in the VTA has been shown to facilitate neuronal activity and DA release (Goertz et al., 2015; Grenhoff et al., 1993; Park et al., 2017), and has, in animal models, been implicated in regulating behavior: drug seeking and taking (Schmidt and Weinschenker, 2014; Solecki et al., 2018, 2019) as well as fear conditioning (Solecki et al., 2017). In particular, cocaine seeking was shown to be increased by microinfusion of  $\alpha_1$ -AR agonist phenylephrine as well as  $\alpha_2$ -AR antagonist RX-821002, and decreased by terazosin and prazosin ( $\alpha_1$ -AR antagonists) into the VTA (Solecki et al., 2018). The effect of RX-821002 was dependent on the availability of  $\alpha_1$ -ARs, as co-administration of both RX-821002 and terazosin resulted in no net change in cocaine seeking. Together, these findings were consistent with  $\alpha_1$ -AR as the modulator of VTA activity, and  $\alpha_2$ -AR as autoreceptor regulating NA efflux at this site.

In our previous study, we used fast-scan cyclic voltammetry (FSCV) to demonstrate that DA release in two distinct pathways (Holloway et al., 2019) – mesolimbic (VTA-NAc core) and mesocortical (VTA-mPFC) is differentially regulated by  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenergic receptor antagonists administered into the VTA (Kielbinski et al., 2019). Electrically-evoked DA efflux in the NAc was attenuated by terazosin, consistent with  $\alpha_1$ -AR's proposed role in facilitating DA release. At the same time, intra-VTA application of RX-821002 resulted in near-complete attenuation of DA release: an effect that was blocked by dopaminergic receptor  $D_2$  antagonist, raclopride. We proposed cross-activation of  $D_2$  receptors on VTA DA neurons by increased NA overflow resulting from electrical stimulation under  $\alpha_2$ -AR blockade as the most likely mechanism.

Because of these observations, and because the regulation of NA efflux by  $\alpha_2$ -AR could be of clinical interest (Sofuoglu et al., 2014; Upadhyay et al., 2021), in the present study we aimed to determine the subtype-specificity of  $\alpha_2$ -ARs in question. To this end, we used FSCV to measure DA release in the NAc core after combined electrical stimulation and infusion of selected  $\alpha_2$ -AR antagonists into the VTA. The  $\alpha_2$ -AR family consists of three primary receptor subtypes,  $\alpha_{2A-C}$ . Prior studies point to  $\alpha_{2A}$ -AR as the primary receptor involved in regulating NA release at high levels of activity and at high neurotransmitter concentrations due to its fast kinetics, as well as the main subtype involved in many of  $\alpha_{2A}$ -AR-dependent central effects, such as hypothermia, seizure suppression, sedation and anaesthesia (Gilsbach and Hein, 2012; Hein et al., 1999). We first confirmed the  $\alpha_2$ -AR subtype-nonspecific effect of idazoxan, a broad  $\alpha_2$ -AR and imidazoline receptor antagonist, followed by an interrogation of  $\alpha_2$ -AR subtypes by specific antagonists: BRL-44408, imiloxan and JP-1302. We also performed Western blotting experiments on samples of rat VTA tissue in order to determine the presence of  $\alpha_{2A}$ -AR protein.

We found that the  $\alpha_{2A}$ -AR antagonist BRL-44408 is capable of dose-dependently attenuating electrically-evoked DA in the NAc core in a manner similar to non-subtype-specific  $\alpha_2$ -AR drugs (RX-821002 and idazoxan), while antagonists specific for  $\alpha_{2B}$ - and  $\alpha_{2C}$ -AR receptors do not share this property. This effect requires local  $D_2$  receptor signaling in the VTA, as it was attenuated by raclopride local pre-administration, in line with our previous findings with RX-821002. Western blotting also confirmed the presence of  $\alpha_{2A}$ -AR protein in the VTA. Together, these data confirm VTA as a direct target for noradrenergic regulation and specify  $\alpha_{2A}$ -AR as the receptor subtype responsible for controlling NA release at this site.

**Table 1**

Table includes the pKi values of the substances used in the experiment and the selectivity ratios for each noradrenergic receptor subtype (Proudman et al., 2022). The pKi values for Idazoxan were taken from the Tocris database, for BRL44408 and imiloxan from the Guide to Pharmacology database, and the value for JP1302 was calculated based on Ki values from the Tocris database.

	pKi			Selectivity ratios		
	$\alpha_{2A}$	$\alpha_{2B}$	$\alpha_{2C}$	$\alpha_{2A}$ VS $\alpha_{2B}$	$\alpha_{2A}$ VS $\alpha_{2C}$	$\alpha_{2B}$ VS $\alpha_{2C}$
<b>Idazoxan</b>	8.01	7.43	7.7	6.0	1.0	5.9
<b>BRL-44408</b>	8.2–8.8	6.8	6.2	60.3	9.3	6.5
<b>Imiloxan</b>	–	7.3	–	4.0	2.5	1.6
<b>JP-1302</b>	5.50	5.83	7.77	1.5	42.7	64.6

Proudman, R. G. W., Akinaga, J., and Baker, J. G. (2022). The affinity and selectivity of  $\alpha$ -adrenoceptor antagonists, antidepressants and antipsychotics for the human  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ , and  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors and comparison with human  $\alpha_1$  and  $\beta$ -adrenoceptors. *Pharmacol. Res. Perspect.* 10, e00936. <https://doi.org/10.1002/PRP2.936>.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

All of the experiments were carried out in male Sprague-Dawley rats with body weights of approximately 300g at the beginning of the procedures. The animals were housed in Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University (Krakow, Poland) on an artificial light/dark cycle (12/12 h, lights on at 7 a.m.) in a temperature- and humidity-controlled room with free access to food and water. The experimental protocols were approved by the Committee for Laboratory Animal Welfare and the Ethics committee of the Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences in Kraków, Poland (approval n. 164/2019).

### 2.2. Surgical procedures

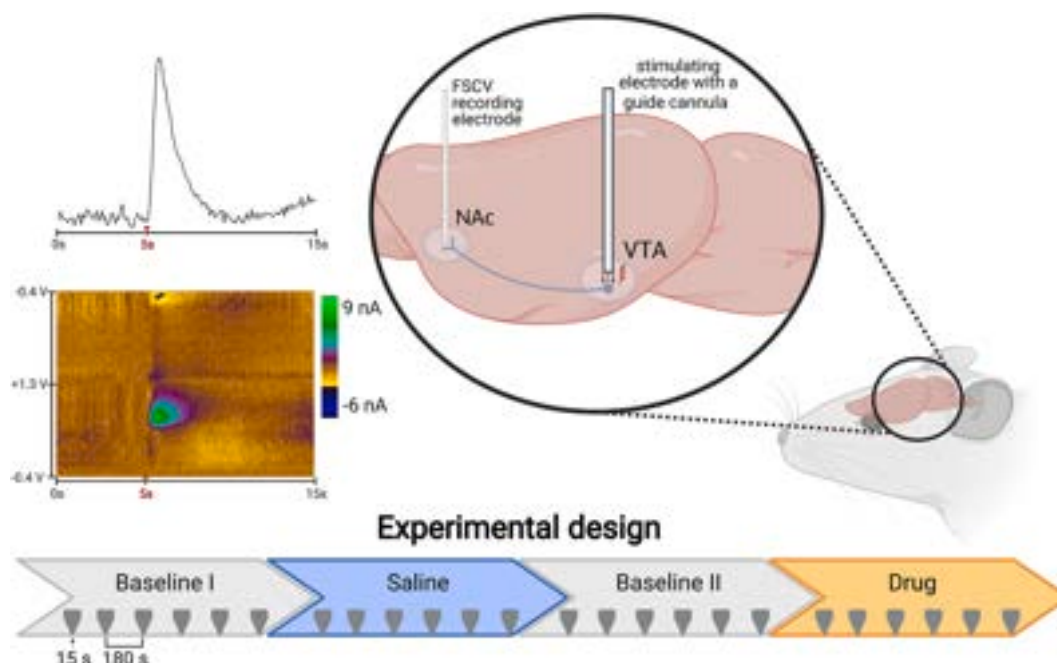
Animals were deeply anaesthetized by intraperitoneal injection of urethane (1.5 g/kg body mass; cat. n. U2500, Sigma Aldrich, Germany) diluted in 0.9% sodium chloride. Throughout the surgery and FSCV experiment, heating pads were used to avoid hypothermia. Animals were then placed in a stereotaxic frame (Stoelting Europe, Ireland), the skin and tissue were removed to expose the skull. Then, the bregma was determined, and holes were drilled at the following coordinates: for VTA, AP -5.3 to -5.5, ML  $\pm$ 1.0 and for NAc, AP +1.2, ML  $\pm$ 1.4 (Paxinos and Watson, 2013). A bipolar stainless steel stimulating electrode combined with a guide cannula (1 mm width, 26 ga guide; Plastics One, United States) was placed in the VTA (DV from dura - 8.1 to -8.3), while a carbon fiber-glass microelectrode (A-M, standard 1 mm diameter, 7  $\mu$ m carbon diameter, cut to 40–80  $\mu$ m) in NAc (DV from dura -6.2 to -6.4). The reference electrode (Ag/AgCl) was placed in the opposite hemisphere in the cortical areas and secured with a screw.

### 2.3. Histological verification

At the end of each experiment, animals were sacrificed by decapitation, brains were placed in 10% formalin solution and, after 7 days, cut into 100  $\mu$ m slices using a vibratome (Leica VT-1000S). The locations of recording and stimulating electrodes were verified using a light microscope. Fig. S1 shows implantation sites of the stimulating electrode (VTA) and the recording electrode (NAc).

### 2.4. Drugs

Idazoxan (nonspecific  $\alpha_2$ -AR antagonist, 10  $\mu$ g, final concentration of 83.09 mM; cat. n. I6138, Sigma-Aldrich), BRL-44408 ( $\alpha_{2A}$ -AR antagonist, 1, 5 and 10  $\mu$ g, final concentration of 6.04, 30.18 and 60.36 mM; cat. n. B4559, Sigma-Aldrich), imiloxan ( $\alpha_{2B}$ -AR antagonist, 1 and 10  $\mu$ g,



**Fig. 1.** FSCV experimental design at a glance. Top right: schematic representation of the placement of the FSCV recording electrode in the NAc and the stimulating electrode combined with guide cannula in the VTA. Top left: representative single recording trace of DA concentration over time and colour plot of electrically evoked DA in NAc after VTA stimulation (indicated by red arrow). Bottom: outline of the experiment. Each segment consisted of a series of six 15-s recordings with electrical stimulation at  $t = 5$  s. There was a 180-s interval between recordings. The first stage consisted of baseline recordings followed by the injection of saline into the VTA and a series of “saline” recordings, the third stage was another baseline measurement “baseline II” followed by the administration of a drug.

final concentration of 7.12 and 71.23 mM; cat. n. 0986, Tocris Bioscience), JP-1302 ( $\alpha_{2C}$ -AR antagonist, 1 and 10  $\mu$ g, final concentration of 4.53, 45.31 mM; cat. n. 2666, Tocris Bioscience), raclopride ( $D_2$  receptor antagonist, 0.5  $\mu$ g, a final concentration of 2.88 mM; cat. n. 1810, Tocris Bioscience). Affinities and relative specificities of  $\alpha_2$ -AR antagonists used in the study are shown in Table 1. All drugs were dissolved in sterile 0.9% saline. Substances in the volume of 0.5  $\mu$ L were administered with the use of a micropump (53127V, Stoelting Europe, Ireland) with an installed 10  $\mu$ L Hamilton syringe (26s ga, Hamilton 701N).

## 2.5. Fast-scan cyclic voltammetry (FSCV)

Dopamine measurements by FSCV were performed as previously described (Kielbinski et al., 2019), using a system consisting of a controller and headstage custom built by the University of North Carolina Department of Chemistry, Electronics Facility, Chapel Hill, NC, USA and a stimulus isolator (DS 4, Digitimer Ltd, United Kingdom) under the control of HDCV software (UNC Department of Chemistry Electronics Facility, Chapel Hill, NC, USA). In brief, a triangular waveform was applied to the recording site (from  $-0.4$  V to  $+1.3$  V relative to the Ag/AgCl reference, with a scan rate of 400 V/s applied in 850 steps of 2 mV per 100 ms window). To generate cyclic voltammograms, the triangular waveform was low-pass filtered at 2 kHz. Phasic dopamine release in the NAc was induced by electrical stimulation of the VTA with a biphasic rectangular waveform (300  $\mu$ A; 2 ms per phase; 24 pulses at 60 Hz). Each trace consisted of 15 s of recording; stimulation was performed at the 5th second of recording.

A diagram of the experiment is shown in Fig. 1. The first stage is a baseline recording followed by control administration of saline to the VTA and a series of recordings, the next stage is a repeat baseline measurement followed by the administration of a drug to the VTA, each stage consisting of 6 measurements with a 180-s interval between them.

## 2.6. Western blotting

The animals were sacrificed by decapitation and their brains were quickly removed from the skull. VTA samples were cut from 1 mm thick coronal slices using a biopsy punch, then rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C. The Western blot procedure was performed as previously described (Bator et al., 2018; Latusz and Maćkowiak, 2020). The tissue was homogenized (TissueLyser, Retsch, Germany) in lysis buffer (PathScan® Sandwich ELISA Lysis Buffer (1X), Cell Signaling). Protein concentrations in the extracts were determined using QuantiPro BCA Assay kit (Sigma, Poland). Equal samples in terms of protein content were adjusted to a final concentration of 10 mM Tris (pH 6.8) containing 2% SDS, 8% glycerol, and 2% 2-mercaptoethanol with bromophenol blue as a marker and then boiled in 100 °C for 8 min. Protein extracts (10, 20, 40  $\mu$ g of protein per lane, for  $\alpha_{2A}$ -AR and GAPDH analysis) were separated on a 7.5% SDS-PAGE gel and transferred to nitrocellulose membranes using an electrophoretic transfer system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), then the membranes were stained with Ponceau S to confirm gel transfer. The membranes were then cut in two, were washed, and non-specific binding sites were blocked with 5% albumin (Bovine Serum Albumin; Sigma) and TBS reagent (Lumi Light mouse/rabbit; Roche) in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) for 1 h at room temperature, washed with TBST, and incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: rabbit anti-ADRA2A (1:500; NBP2-22452, NovusBio), and rabbit anti-GAPDH (1:5000; 14C10, 2118S Cell Signaling Technology). A secondary anti-rabbit IgG antibody (1:1000, Roche, Poland) was used to detect immune complexes (incubation for 1 h at room temperature). Blots were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL, Lumi-LightPlus Western Blotting Kit, Roche, Switzerland) and scanned using a luminescent image analyser (LAS-4000, Fujifilm, USA).

## 2.7. Data analysis

Dopamine concentration changes were quantified using HDCV

**Table 2**

A total of 61 rats out of 92 were used for the study, 16 were excluded based on histological verification and 15 were excluded during data analysis, the primary basis for exclusion was a failure to meet data quality criteria for the FSCV datasets.

Drug	Initial	Excluded (histological verification)	Excluded (data quality)	Final n
Idazoxan 10 µg	9	2	1	6
BRL-44408 1.0 µg	7	1	0	6
BRL-44408 5.0 µg	14	2	3	9
BRL-44408 10.0 µg	12	4	1	7
Raclopride 0.5 µg + BRL-44408 10.0 µg	15	3	4	8
Imiloxan 1.0 µg	9	1	2	6
Imiloxan 10.0 µg	9	1	2	6
JP-1302 1.0 µg	7	0	1	6
JP-1302 10.0 µg	10	2	1	7

Analysis software (UNC Department of Chemistry Electronics Facility, Chapel Hill, NC, USA) as described previously (Kielbinski et al., 2019). Briefly, based on training sets obtained *in vivo* by applying varying pulse number (12–48) and stimulation intensity (200–400 µA), principal component regression using the HDCV software's built-in functionality (Bucher et al., 2013; Keithley and Wightman, 2011; Rodeberg et al., 2015) was performed to isolate the components of the signal corresponding to DA and pH. Only datasets meeting minimal quality criteria – stable baseline DA levels, no missing measurements (due to artifacts) in the recording and no contamination from above-background residual signal in PCA output – were included in the final analysis. Table 2 provides a detailed summary of animals used and excluded from the experiments on the basis of histological verification or failure of the recorded data to meet quality criteria.

DA component traces were averaged across all recordings per condition (for average effects) or used separately (for time-course data) to calculate the ratio of DA signal after saline or drug injection to the average DA signal at the corresponding baseline (Fig. 1). Relative changes in DA efflux were then compared with paired T-tests (for the average effect of each dose and drug), or with two-way analysis of variance (ANOVA), with the main effects of drug and time point (trace) as well as their interaction (for time-course analysis). Paired Sidak-

corrected *post hoc* tests were used to compare drug effects at each time point. In all cases, two-sided tests were used, with  $p < 0.05$  as the criterion of significance. Visual inspection of histograms (raw data) as well as residual Q-Q plots were used to assess data quality. No outlier removal was performed. Blinding, randomization and power calculations were also not employed in this study. Analyses were performed with Prism 8.0 (GraphPad Software).

### 3. Results

#### 3.1. Intra VTA idazoxan reduces electrically evoked phasic DA release in the NAC core

Previously we have shown that the  $\alpha_2$ -AR antagonist RX-821002 is capable of potentially inhibiting electrically evoked DA release (Kielbinski et al., 2019).

To confirm that this finding can be generalized to  $\alpha_2$ -AR antagonists, we first tested the effects of idazoxan, a nonselective  $\alpha_2$ -AR antagonist commonly used in pharmacological studies. The administration of 10 µg of idazoxan to the VTA resulted in an overwhelming decrease in electrically evoked phasic DA release into the NAC core (Fig. 2b; paired T-test  $t_{(5)} = 5.09$ ,  $n = 6$  rats,  $p = 0.0038$ ). Also, comparisons of single traces over time showed a significant effect of idazoxan intra-VTA infusion (Fig. 2c drug effect  $F_{(1,10)} = 24.74$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.0006$ ; time effect  $F_{(2,09, 20,91)} = 0.98$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.39$ ; time x drug  $F_{(5, 50)} = 0.63$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.68$ ). Significant decreases in DA release were found at five of the six time points (6, 9, 12, 15, 18, but not 3 min based on Sidaks multiple comparisons post-test).

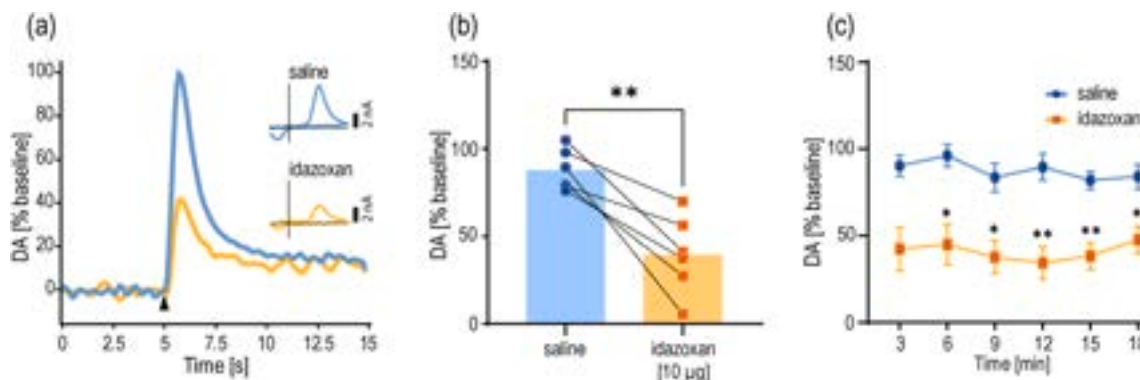
The results demonstrate that idazoxan has an analogous effect to a previously tested non-specific  $\alpha_2$ -AR antagonist (RX-821002).

#### 3.2. Intra-VTA $\alpha_{2A}$ -AR antagonist BRL-44408 dose-dependently attenuates electrically evoked phasic DA release in the NAC core

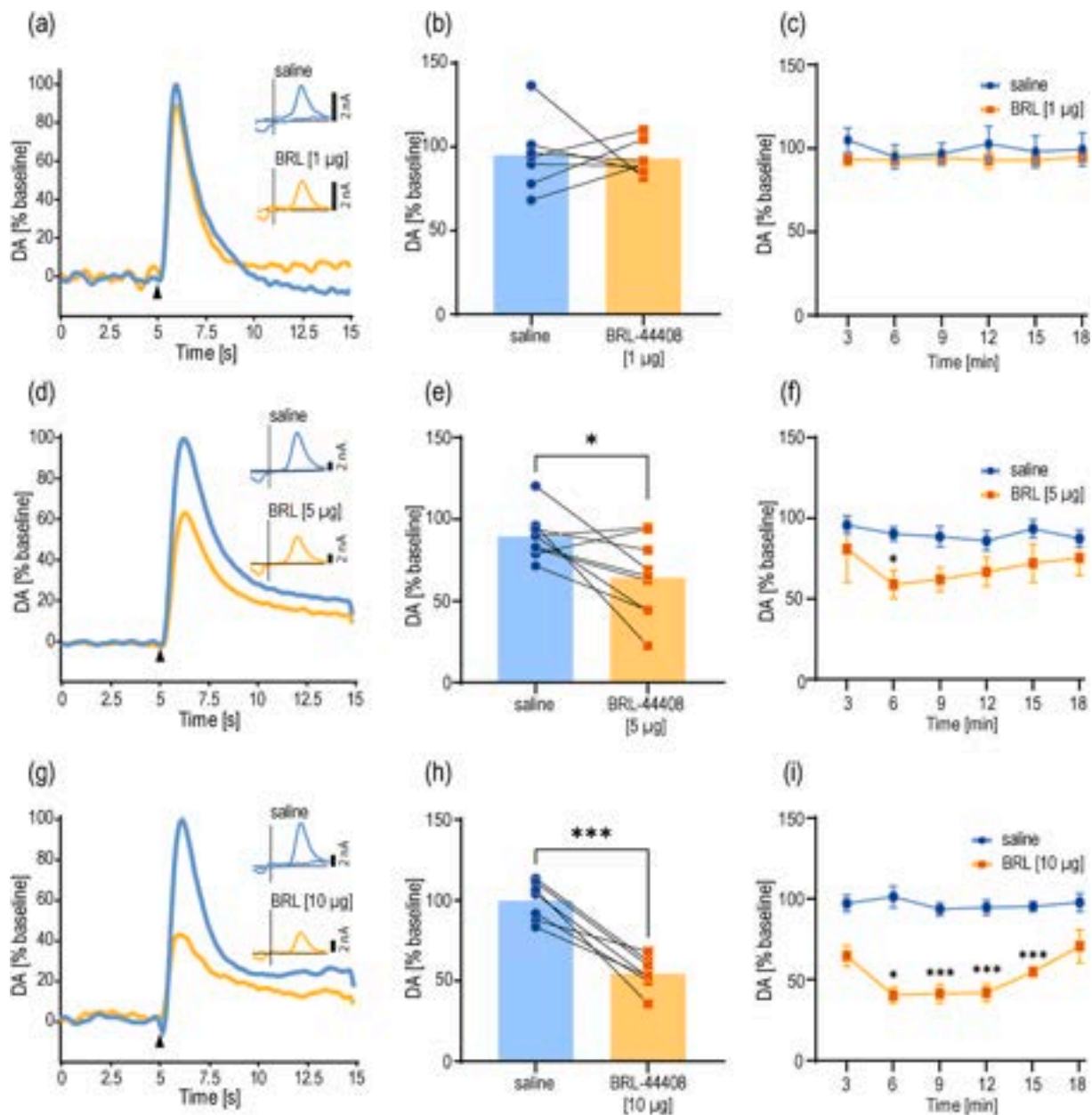
Having established that idazoxan exhibits similar actions in the VTA to RX-821002, we then examined the effects of intra-VTA infusions of varying doses of the  $\alpha_{2A}$ -AR antagonist, BRL-44408, on electrically evoked, phasic DA release into the NAC core.

After administration of a 1 µg dose of BRL-44408, we found no differences in the average relative DA release values compared to saline administration (Fig. 3b; paired T-test  $t_{(6)} = 0.17$ ,  $n = 7$  rats,  $p = 0.87$ ), as well as when comparing individual time points (Fig. 3c; drug effect  $F_{(1,10)} = 0.40$ ,  $n = 7$  rats,  $p = 0.54$ ; time effect  $F_{(2,64, 26,41)} = 0.93$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.43$ ; time x drug  $F_{(5, 50)} = 1.03$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.41$ ).

However, the administration of a 5 µg of BRL-44408 caused a decrease in the average amount of DA released into the NAC core



**Fig. 2.** Effects of idazoxan intra-VTA infusion on electrically evoked phasic DA release in the NAC core. (a) Representative fast-scan cyclic voltammetry (FSCV) traces obtained after infusion of saline and idazoxan (10 µg). Insets show representative current to voltage traces obtained from NAC core in response to VTA stimulation after saline and idazoxan. (b) Plots of averaged DA values, bars represent the average obtained from all results, markers represent individual data points. \*\* $p < 0.01$  in paired Student's test. (c) Time course comparisons of relative DA peaks (% of their corresponding baseline) over six subsequent measurements after saline and idazoxan (10 µg). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  in Sidak multiple comparisons post-test.



**Fig. 3.** Effects of BRL-44408 intra-VTA infusion on electrically evoked phasic DA release in the NAc core. (a,d,g) representative fast-scan cyclic voltammetry (FSCV) traces obtained after infusion of saline and BRL-44408 (1, 5, 10 µg respectively). Insets show representative current to voltage traces obtained from NAc core in response to VTA stimulation after saline and BRL-44408. (b, e, h) Plots of averaged DA values, bars represent the average obtained from all results, markers represent individual data points. \* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.001$  in paired Student's test. (c, f, i) Time course comparisons of relative DA peaks (% of their corresponding baseline) over six following measurements after saline and BRL-44408 (1, 5, 10 µg respectively). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  in Sidak multiple comparisons post-test.

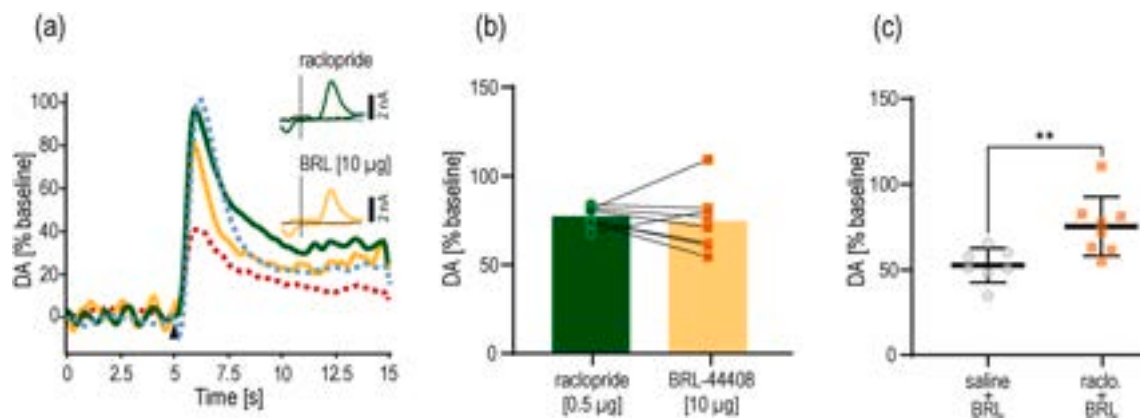
(Fig. 3e; paired  $T$ -test  $t_{(8)} = 2.7$ ,  $n = 9$  rats,  $p = 0.027$ ). Time comparisons of single traces showed no significant effect of BRL-44408 at 5 µg (Fig. 3f; drug effect  $F_{(1, 16)} = 4.42$ ,  $n = 9$ ,  $p = 0.052$ ; time effect  $F_{(1.47, 23.53)} = 1.16$ ,  $n = 9$ ,  $p = 0.32$ ; time x drug  $F_{(5, 80)} = 0.53$ ,  $n = 9$ ,  $p = 0.76$ ).

Intra-VTA infusion of 10 µg of an  $\alpha_2$ -AR antagonist resulted in a significant reduction in the averaged relative DA release into the NAc core (Fig. 3h; paired  $T$ -test  $t_{(6)} = 7.25$ ,  $n = 7$  rats,  $p = 0.0004$ ). Comparisons based on time points of single traces showed a significant effect (Fig. 3i; drug effect  $F_{(1,12)} = 65.90$ ,  $n = 7$  rats,  $p < 0.0001$ ; time effect  $F_{(2.48, 29.81)} = 4.55$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.014$ ; time x drug  $F_{(5, 60)} = 4.12$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.003$ ). Significant decreases in relative evoked DA were also found for all time points except the last one at 18 min (based on Sidak's multiple comparisons post-tests).

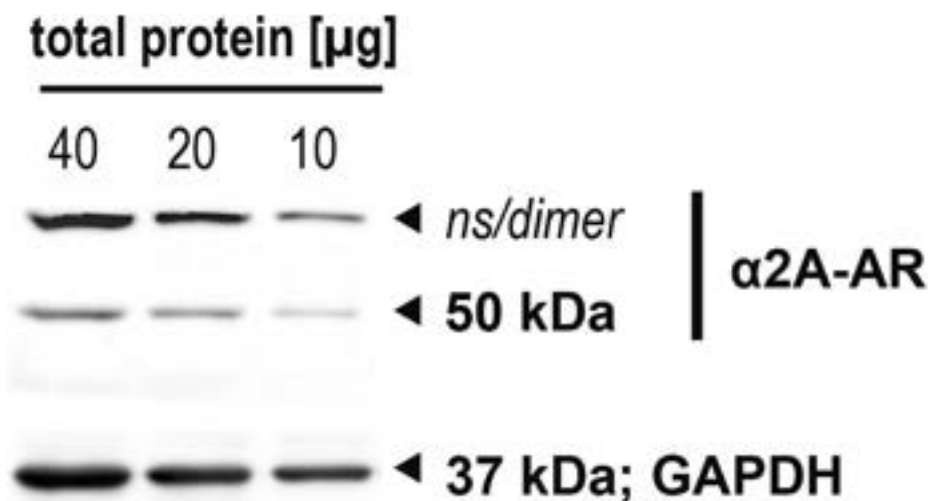
### 3.3. Attenuation of phasic DA release in the NAc core by BRL-44408 is dependent on $D_2$ receptor blockade in the VTA

Because of the significant effects of  $\alpha_2$ -AR antagonist administration to the VTA on phasic DA release into the NAc core, we tested whether this was dependent on dopamine  $D_2$  receptors in the VTA.

For this purpose, we blocked dopamine  $D_2$  receptors in the VTA with raclopride (0.5 µg) before administering an  $\alpha_2$ -AR antagonist (BRL-44408 at 10 µg). These recordings were performed according to the previous scheme (Fig. 1), except raclopride was administered in place of saline. As seen previously, raclopride administration in and of itself had no significant effects on DA release (Kielbinski et al., 2019). However, raclopride pretreatment inhibited BRL-44408-induced attenuation of DA release (Fig. 4a). The average values of DA release after



**Fig. 4.** Attenuation of electrically evoked phasic DA release in the NAc by intra-VTA BRL-44408 administration is blocked by intra-VTA raclopride pre-treatment. (a) Representative fast-scan cyclic voltammetry (FSCV) traces obtained after intra-VTA infusion of 0.5 µg raclopride followed by BRL-44408 (10 µg), dashed lines are representative traces after saline (blue) and subsequent BRL-44408 (10 µg; red) infusion, taken from Fig. 3. (g). Insets show representative current to voltage traces obtained from NAc core in response to phasic VTA stimulation. (b) Plots of averaged DA values, bars represent the average obtained from all results, markers represent individual data points. (c) Pre-treatment with raclopride prevents intra-VTA BRL-44408 administration from attenuating phasic DA release, resulting in significantly higher NAc core DA in raclopride + BRL-44408 ( $n = 7$  rats), compared to saline + BRL-44408 ( $n = 8$  rats). Plot represents the mean and SD.  $**p < 0.01$  in unpaired Student's  $t$ -test.



**Fig. 5.** Representative immunoblot probed with antibodies for  $\alpha_{2A}$ -AR (bands at 50 kDa weight) and GAPDH proteins (bands at 37 kDa weight). The upper additional band represents a putative receptor dimer.

administration of raclopride and BRL-44408 were not different (Fig. 4b; paired  $T$ -test  $t_{(7)} = 0.48$ ,  $n = 8$  rats,  $p = 0.65$ ). Furthermore, the relative average DA levels obtained after intra-VTA administration of BRL-44408 (10 µg) in raclopride-pretreated rats ( $n = 8$  rats) were significantly higher than in saline-pretreated subjects ( $n = 7$  rats; Fig. 4c; unpaired  $T$ -test  $t_{(13)} = 3.06$ ,  $p = 0.009$ ).

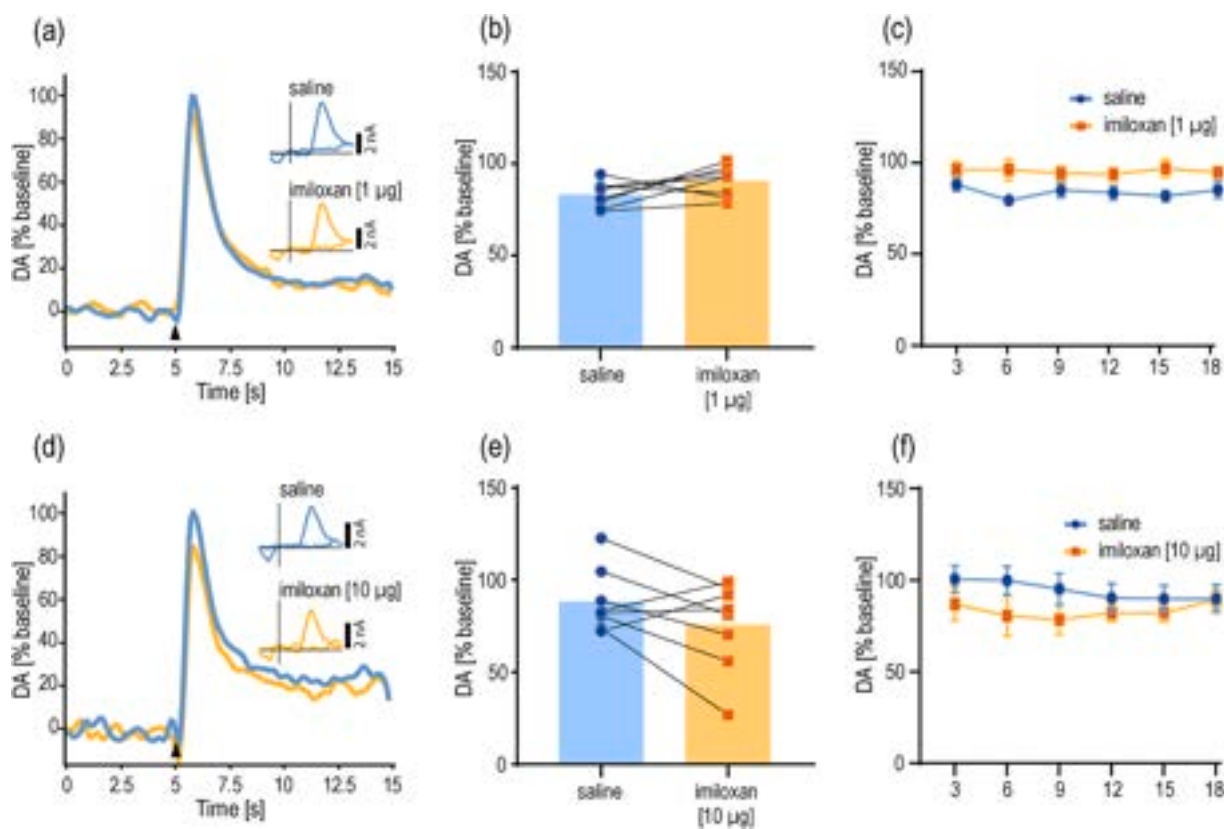
### 3.4. $\alpha_{2A}$ -AR protein is readily detectable in VTA samples by western blotting

We then set out to confirm the presence of  $\alpha_{2A}$ -AR in the VTA on the protein level, using Western blotting. Western blots of VTA tissue samples from naïve rats were performed with three different protein concentrations of 10, 20 and 40 µg; GAPDH was used as reference. Representative blot image (Fig. 5) shows distinct bands corresponding to  $\alpha_{2A}$ -AR protein for all selected concentrations, confirming its expression in the VTA.

### 3.5. Intra-VTA $\alpha_{2B}$ , as well as an $\alpha_{2C}$ receptor antagonist, does not affect electrically evoked phasic DA release in the NAc core

Infusion of imiloxan at both low (1 µg; Fig. 6b; paired  $T$ -test  $t_{(7)} = 1.80$ ,  $n = 8$  rats,  $p = 0.12$ ) and high doses (10 µg; Fig. 6c; paired  $T$ -test  $t_{(7)} = 1.58$ ,  $n = 8$  rats,  $p = 0.16$ ) did not affect the average level of DA released into the NAc core. No differences were also observed at the particular time points for both doses (1 µg; Fig. 6c; drug effect  $F_{(1, 14)} = 8.28$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.01$  – no statistically significant results in the Sidak multiple comparisons post-test; time effect  $F_{(2.52, 35.24)} = 0.43$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.7$ ; time x drug  $F_{(5, 70)} = 0.63$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.68$ ; 10 µg; Fig. 6f drug effect  $F_{(1, 10)} = 1.21$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.3$ ; time effect  $F_{(2.06, 20.6)} = 1.97$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.16$ ; time x drug  $F_{(5, 50)} = 2.51$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.04$  – no statistically significant results in the Sidak multiple comparisons post-test).

Similar to imiloxan, blocking  $\alpha_{2C}$ -AR by administering JP-1302 to VTA did not affect the average level of DA released into NAc core at any of the selected doses (1 µg; Fig. 7b; paired  $T$ -test  $t_{(6)} = 1.08$ ,  $n = 7$  rats,  $p = 0.32$ , 10 µg; Fig. 7e; paired  $T$ -test  $t_{(6)} = 1.21$ ,  $n = 7$  rats,  $p = 0.27$ ). Analysis of the differences across time points also showed no differences (1 µg; Fig. 7c; drug effect  $F_{(1,10)} = 1.97$ ,  $n = 7$  rats,  $p = 0.19$ ; time effect



**Fig. 6.** Effects of imiloxan intra-VTA infusion on electrically evoked phasic DA release in the NAc core. (a,d) representative fast-scan cyclic voltammetry (FSCV) traces obtained after infusion of saline and imiloxan (1 and 10 µg). Insets show representative current to voltage traces obtained from Nac core in response to VTA stimulation after saline and imiloxan. (b: 1 µg, e: 10 µg) Plots of averaged DA values, bars represent the average obtained from all results, markers represent individual data points. (c, f) Time course comparisons of relative DA peaks (% of their corresponding baseline) over six following measurements after saline and imiloxan (1 and 10 µg respectively).

$F_{(3,14, 31,37)} = 3.05$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.041$ ; time x drug  $F_{(5, 50)} = 1.62$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.17$  – no statistically significant results in the Sidak multiple comparisons post-test; 10 µg: Fig. 7f; drug effect  $F_{(1,12)} = 1.17$ ,  $n = 7$  rats,  $p = 0.30$ , time effect  $F_{(2,9, 34,8)} = 2.36$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.09$ ; time x drug  $F_{(5, 60)} = 1.55$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.19$ .

Thus, our results indicate that the  $\alpha_{2A}$  subtype is the major noradrenergic autoreceptor responsible for regulating NA release in the VTA and phasic DA release in the NAc core, with negligible contribution of  $\alpha_{2B}$  and  $\alpha_{2C}$ .

#### 4. Discussion

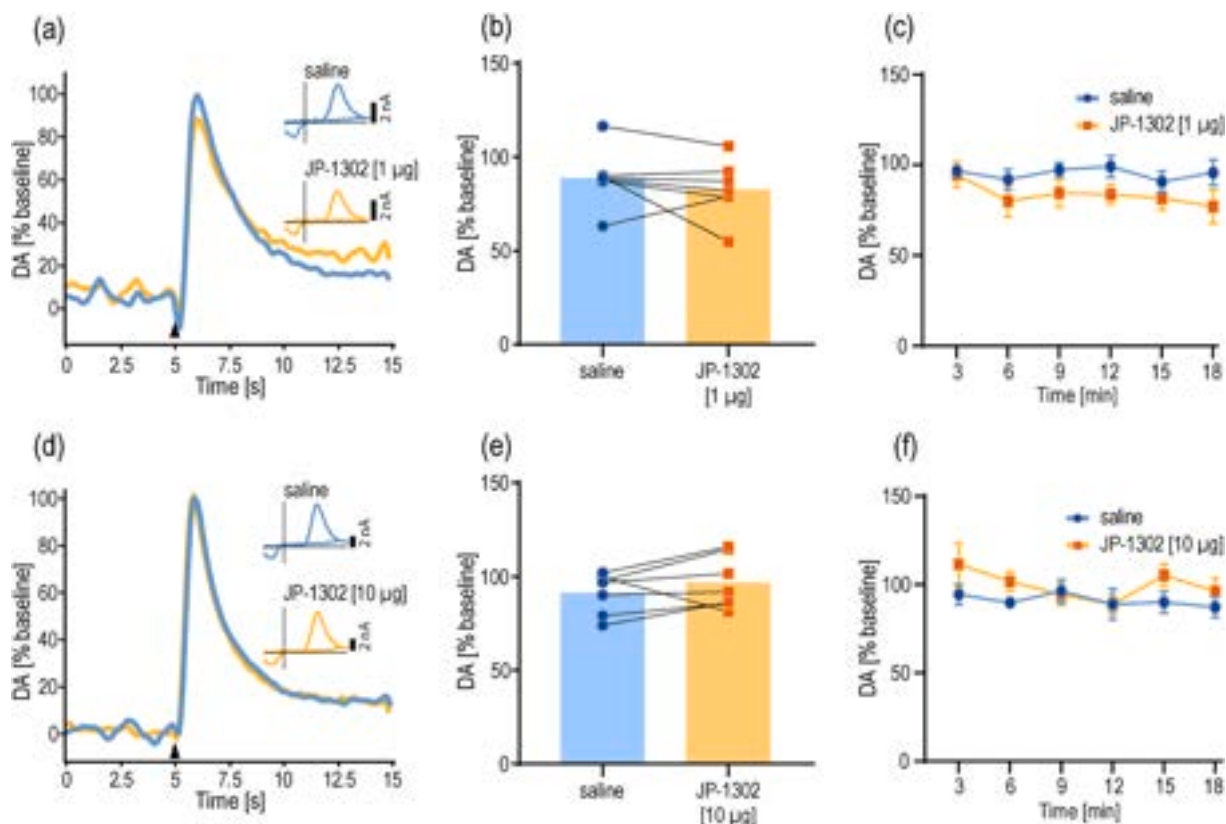
Previous electrophysiological, electrochemical and behavioral studies from our laboratory have demonstrated NA-dependent regulation of VTA activity and subsequent DA release in the mesolimbic (VTA-NAc) pathway. Electrochemical data, both from our group (Kielbinski et al., 2019) and from other researchers (Goertz et al., 2015; Park et al., 2017), as well as behavioral observations (Solecki et al., 2018, 2019) converge on an interpretation of intra-VTA NA signaling as net positive modulator of DA release. In this view NA acts in concert with glutamate to modulate VTA activity by direct actions on DA neurons as well as modulation of afferent neurotransmission (Goertz et al., 2015; Grenhoff et al., 1995; Paladini et al., 2001; Tovar-Díaz et al., 2018; Velásquez-Martínez et al., 2012; Velásquez-Martínez et al., 2015; Williams et al., 2014).

Based on electrophysiological data, we proposed that the spatio-temporal scale of NA action in the VTA, i.e. its persistence for a longer time, at larger concentration and at larger part of the DA cell dendritic arbor, determines the excitatory effects of  $\alpha_1$ -AR signaling (Goertz et al., 2015; Pradel et al., 2018). This is in agreement with the working model

of mostly paracrine action of NA in the VTA: neuroanatomical evidence points to NA release in the VTA by volume transmission from varicosities rather than synaptic contacts (Liprando et al., 2004; Watabe-Uchida et al., 2012).

Here, we demonstrate that in the VTA, regulation of NA efflux is carried out by signaling via the  $\alpha_{2A}$ -AR subtype: BRL-44408, a specific antagonist of  $\alpha_{2A}$ -AR, in contrast with imiloxan and JP-1302 (specific for  $\alpha_{2B}$ - and  $\alpha_{2C}$ -AR, respectively), replicates the effect of nonspecific  $\alpha_2$  antagonists (RX-821002 and idazoxan). Previous studies on the expression and binding of NA receptors in the VTA and substantia nigra (Mejias-Aponte, 2016) have shown high to moderate binding to  $\alpha_2$ -AR radioligands, idazoxan and rauwolscine. Previous studies of  $\alpha_2$ -AR expression on the protein or mRNA level had shown putative  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -AR receptors in the VTA (Lee et al., 1998; Rosin et al., 1993), while  $\alpha_{2B}$ -AR is generally not reported in the midbrain; its expression in the brain is mostly confined to the thalamus (MacDonald and Scheinin, 1995; Scheinin et al., 1994). Here, we confirm the presence of  $\alpha_{2A}$ -AR in total protein extract from VTA samples.

Autoinhibition of NA release from afferent terminals by  $\alpha_2$ -ARs would be of critical importance in regulating the extent of NA overflow required for VTA regulation, although some studies also raise the possibility of presynaptic  $\alpha_2$ -AR-mediated inhibition on glutamate terminals (Jiménez-Rivera et al., 2012; Williams et al., 2014), or even direct regulation of DA cells (Inyushin et al., 2010), which should still be taken into consideration. Electrophysiological data, however, did not show an appreciable effect of local  $\alpha_2$ -AR agonist application on DA and non-DA neurons (Aghajanian and Bunney, 1977; Pradel et al., 2018). In addition, a recent study in which NA receptor expression in retrograde-labeled mouse VTA-NAc projecting DA neurons was profiled, revealed low levels of all three  $\alpha_2$ -ARs in this neuronal population



**Fig. 7.** Effects of JP-1302 intra-VTA infusion on electrically evoked phasic DA release in the NAc core. (a,d) representative fast-scan cyclic voltammetry (FSCV) traces obtained after infusion of saline and JP-1302 (1 and 10 µg). Insets show representative current to voltage traces obtained from NAc core in response to VTA stimulation after saline and JP-1302. (b, 1 µg, e: 10 µg) Plots of averaged DA values, bars represent the average obtained from all results, markers represent individual data points. (c, f) Time course comparisons of relative DA peaks (% of their corresponding baseline) over six following measurements after saline and JP-1302 (1 and 10 µg respectively).

(Zhang et al., 2019). This leads us to believe that the  $\alpha_2$ -ARs on afferents in the VTA, and not DA neurons themselves, are the primary site of action for intra-VTA  $\alpha_2$ -AR inhibitors.

Thus, we focused on  $\alpha_2$ -AR-mediated autoreceptor regulation as the primary determinant of NA levels in the VTA, which then recruit  $\alpha_1$ -AR signaling to regulate mesolimbic DA release. This is in agreement with the observed behavioral effects of intra-VTA  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -AR antagonists on cocaine seeking (Solecki et al., 2018).

The  $\alpha_{2A}$ -AR has a well-known role as presynaptic autoreceptor present on NA terminals (Hein et al., 1999). Presynaptic  $\alpha_{2A}$ -ARs are particularly well-suited to regulating NA release during burst firing of NA neurons due to their very fast kinetics (Gilsbach and Hein, 2012), comparatively fast deactivation of G protein-activated inwardly rectifying  $K^+$  currents and lower affinity towards NA, compared to  $\alpha_{2C}$ -AR (Bünemann et al., 2001). It is theoretically possible that both subtypes have separate roles in regulating phasic ( $\alpha_{2A}$ ) and tonic ( $\alpha_{2C}$ ) NA release in the VTA. However, our previous experiments with tonic (5 Hz) stimulation of the VTA did not reveal any effects of RX-821002 micro-infusion (Kielbinski et al., 2019). Given that this antagonist has roughly equal affinities  $\alpha_{2A}$  and  $\alpha_{2C}$  subtypes (O'Rourke et al., 1994), the evidence does not support separate regulation of tonic NA release by  $\alpha_{2C}$ -AR.

In the experimental conditions described here, the combination of high frequency electrical stimulation (60 Hz) and  $\alpha_2$ -AR blockade likely results in increased concentrations of NA in the VTA, with the possibility of DA co-release from noradrenergic terminals (Devoto et al., 2003; Kempadoo et al., 2016). Upon release, these catecholamines bind to  $D_2$  receptors on DA neuronal cell bodies to inhibit firing and attenuate DA release, as evidenced by  $D_2$  blockade by micro-infusion of raclopride attenuating the effects of subsequent administration of  $\alpha_2$ -AR

antagonists on DA release into NAc core (Kielbinski et al., 2019), in agreement with prior *in vitro* studies describing these effects in terms of  $I_h$  conductance and DA neuron activity (Arencibia-Albite et al., 2007; Grenhoff et al., 1995). It is worth noting that cross-talk between DA and NA receptors has been previously shown both on receptor and system level (Guiard et al., 2008; Park et al., 2017; Sánchez-Soto et al., 2016). Indeed, it has been demonstrated that NA can bind to all  $D_2$ -like receptor subtypes and activate their respective  $G\alpha i/o$  signaling with high potency, comparable to its action at native adrenergic receptors (Sánchez-Soto et al., 2016).

Previously, we had assumed that the levels of NA released in the VTA during electrical stimulation in combination with  $\alpha_2$ -AR blockade were supraphysiological, a useful proxy for studying the regulation of NA release in the VTA but lacking a behavioral interpretation (Kielbinski et al., 2019). However, a recent *in vivo* investigation has shown that high-frequency phasic optogenetic activation of LC does indeed have a distinct behavioral effect in awake animals (Deal et al., 2020). In that study, phasic and tonic optogenetic stimulation (50 Hz and 5 Hz, respectively) exhibited opposing effects on alcohol drinking behavior, with tonic NA supporting, and phasic NA – inhibiting alcohol intake.

Previous studies also show plastic changes in NA and DA systems, particularly through a loss of  $\alpha_2$ -AR control over NA release, in the context of stress and drug consumption (Fox et al., 2017). In this view, stress – generally resulting in elevated tonic NA and potentially other factors, such as corticotropin-releasing-factor (Tovar-Díaz et al., 2018) – interacts reciprocally and adversely with the DA system (Douma and de Kloet, 2020), driving drug seeking and consumption. It is, however, worth noting that in a set of studies, NA release from the LC into the VTA has been also shown to elicit homeostatic plasticity via  $\alpha_1$ -AR regulation of VTA DA neuronal cell firing via  $I_h$  and SK conductances, which was

sufficient to confer active resilience to chronic social defeat stress (Zhang et al., 2019). Taken together, those lines of inquiry lead to two important problems for future research. Firstly, under what conditions the noradrenergic changes to VTA function remain ultimately adaptive, and under what conditions do they become maladaptive – and what physiological and molecular patterns accompany such potential shift. Secondly, to what degree phasic release of NA in the VTA, in quantities sufficient for eliciting the D<sub>2</sub>-mediated inhibition of VTA DA neurons, represents a natural, rather than only experimentally induced, phenomenon – perhaps occurring in the case of heavily traumatic acute experience, or in response to psychostimulant-induced catecholamine release. In both cases,  $\alpha_2$ -AR-dependent control of NA release would constitute an important piece of the puzzle, especially considering reports of stress- or withdrawal-induced dysregulation of  $\alpha_2$ -AR signaling (Fox and Wightman, 2017).

## 5. Conclusions

Here, we have shown that in the VTA, NA efflux is specifically controlled by the  $\alpha_2$ -AR. In humans,  $\alpha_2$ -AR agonists have been used, with various degrees of success, in clinical trials for PTSD and SUD (Gowing et al., 2016; Sofuoğlu et al., 2014; Upadhyay et al., 2021). Mounting evidence suggests that in addition to considering the effects of  $\alpha_2$ -AR drugs in forebrain output structures of the catecholamine systems, the contribution of LC-VTA might be important for the clinical effects of these drugs. This presents a sort of complication, but also – opportunity, as this points to the VTA as a potential novel locus for pharmacological action. It is also worth noting that  $\alpha_2$ A specific pharmaceuticals tend to be better tolerated than broader drugs which act on all  $\alpha_2$  subtypes and/or on imidazoline receptors (Gowing et al., 2016), thus, the observation that  $\alpha_2$ A seems to be the predominant autoreceptor subtype in the VTA could prove useful in developing better targeted therapeutics. One caveat is that in our present study, we report findings in male rats only. Given that sex-related factors are clinically important for the prevalence and prognosis of both PTSD and SUD (Koob, 2021), and that relevant animal studies often find sex differences in NA and corticotropin release factor signaling (Cason et al., 2016; den Hartog et al., 2020), looking for such differences in VTA NA regulation by  $\alpha_2$ -ARs would be an important goal for future studies.

## CRedit authorship contribution statement

**Joanna Bernacka:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – review & editing, Visualization. **Michał Kielbinski:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – review & editing, Visualization. **Agnieszka Wawrzczak-Bargiela:** Methodology, Investigation. **Katarzyna Zajda:** Validation, Visualization. **Marzena Maćkowiak:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing. **Ryszard Przewlocki:** Writing – review & editing. **Wojciech Solecki:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Validation, Writing – review & editing.

## Declarations of competing interest

None.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgements

This work was supported by the Polish National Science Center Research grant UMO-2018/29/B/NZ7/02672 awarded to WBS as well as statutory funds of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy

of Sciences, contributed by MM. The authors declare no conflicts of interest. Fig. 1 and graphical abstract were created with BioRender.com.

## Appendix A. Supplementary data

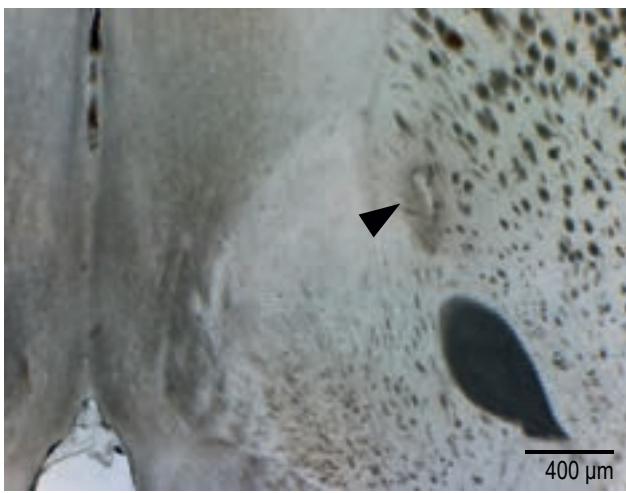
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109258>.

## References

- Aghajanian, G.K., Bunney, B.S., 1977. Dopamine "Autoreceptors": pharmacological characterization by microiontophoretic single cell recording studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 297, 1–7. <https://doi.org/10.1007/BF00508803>.
- Arencibia-Albite, F., Paladini, C., Williams, J.T., Jiménez-Rivera, C.A., 2007. Noradrenergic modulation of the hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroscience* 149, 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.08.009>.
- Bator, E., Latusz, J., Glowacka, U., Radaszkiewicz, A., Mudlaff, K., Maćkowiak, M., 2018. Adolescent social isolation affects schizophrenia-like behavior in the MAM-E17 model of Schizophrenia. *Neurotox. Res.* 34, 305–323. <https://doi.org/10.1007/S12640-018-9888-0/FIGURES/8>.
- Bucher, E.S., Brooks, K., Verber, M.D., Keithley, R.B., Owesson-White, C., Carroll, S., Takmakov, P., McKinney, C.J., Wightman, R.M., 2013. Flexible software platform for fast-scan cyclic voltammetry data acquisition and analysis. *Anal. Chem.* 85, 10344–10353. <https://doi.org/10.1021/ac402263x>.
- Bünemann, M., Bücheler, M.M., Philipp, M., Lohse, M.J., Hein, L., 2001. Activation and deactivation kinetics of  $\alpha_2$ A- and  $\alpha_2$ C-adrenergic receptor-activated G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel currents. *J. Biol. Chem.* 276, 47512–47517. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108652200>.
- Cason, A.M., Kohtz, A., Aston-Jones, G., 2016. Role of corticotropin releasing factor 1 signaling in cocaine seeking during early extinction in female and male rats. *PLoS One* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158577>.
- Chandler, D.J., Waterhouse, B.D., Gao, W.-J., 2014. New perspectives on catecholaminergic regulation of executive circuits: evidence for independent modulation of prefrontal functions by midbrain dopaminergic and noradrenergic neurons. *Front. Neural Circ.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00053>.
- Chandler, D.J., Jensen, P., McCal, J.G., Pickering, A.E., Schwarz, L.A., Totah, N.K., 2019. Redefining noradrenergic neuromodulation of behavior: impacts of a modular locus coeruleus architecture. In: *Journal of Neuroscience. Society for Neuroscience*, pp. 8239–8249. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1164-19.2019>.
- Deal, A.L., Bass, C.E., Grinevich, V.P., Delbono, O., Bonini, K.D., Weiner, J.L., Budygin, E.A., 2020. Bidirectional control of alcohol-drinking behaviors through locus coeruleus optoactivation. *Neuroscience* 443, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.07.024> den Hartog, C.R.
- den Hartog, C., Blandino, K.L., Nash, M., et al., 2020. Noradrenergic tone mediates marble burying behavior after chronic stress and ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* 237 (10).
- Devoto, P., Flore, G., Longu, G., Pira, L., Gessa, G.L., 2003. Origin of extracellular dopamine from dopamine and noradrenaline neurons in the medial prefrontal and occipital cortex. *Synapse* 50, 200–205. <https://doi.org/10.1002/syn.10264>.
- Douma, E.H., de Kloet, E.R., 2020. Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 108, 48–77. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.015>.
- Fox, M.E., Wightman, R.M., 2017. Contrasting regulation of catecholamine neurotransmission in the behaving brain: pharmacological insights from an electrochemical perspective. *Pharmacol. Rev.* 69, 12–32. <https://doi.org/10.1124/pr.116.012948>.
- Fox, M.E., Nathan Rodeberg, T., Mark Wightman, R., 2017. Reciprocal catecholamine changes during opiate exposure and withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 42, 671–681. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.135>.
- Giltsbach, R., Hein, L., 2012. Are the pharmacology and physiology of  $\alpha_2$  adrenoceptors determined by  $\alpha_2$ -heteroreceptors and autoreceptors respectively? *Br. J. Pharmacol.* 165, 90–102. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01533.x>.
- Goertz, R.B., Wanat, M.J., Gomez, J.A., Brown, Z.J., Phillips, P.E., Paladini, C.A., 2015. Cocaine increases dopaminergic neuron and motor activity via midbrain  $\alpha_1$  adrenergic signaling. *Neuropsychopharmacology* 40, 1151–1162. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.296>.
- Gowing, L., Farrell, M., Ali, R., White, J.M., 2016. Alpha2-adrenergic agonists for the management of opioid withdrawal. *Cochrane Database Syst. Rev.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002024.pub5>, 2016.
- Grenhoff, J., Nisell, M., Ferré, S., Aston-Jones, G., Svensson, T.H., 1993. Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *J. Neural. Transm.* 93, 11–25. <https://doi.org/10.1007/BF01244934>.
- Grenhoff, J., North, R.A., Johnson, S.W., 1995. Alpha<sub>1</sub>-adrenergic effects on dopamine neurons recorded intracellularly in the rat midbrain slice. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1707–1713. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb00692.x>.
- Guiard, B.P., El Mansari, M., Blier, P., 2008. Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus coeruleus, and dorsal hippocampus. *Mol. Pharmacol.* 74, 1463–1475. <https://doi.org/10.1124/mol.108.048033.eric>.
- Hein, L., 2006. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res.* 326, 541–551. <https://doi.org/10.1007/S00441-006-0285-2/FIGURES/4>.

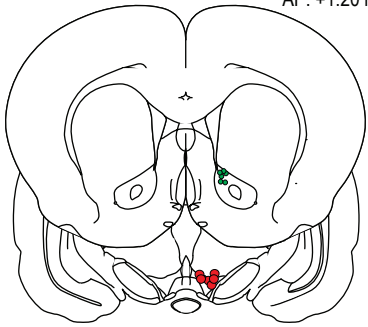


- Hein, L., Altman, J.D., Kobilka, B.K., 1999. Two functionally distinct  $\alpha$ 2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 402, 181–184. <https://doi.org/10.1038/46040>.
- Holloway, Z.R., Freels, T.G., Comstock, J.F., Nolen, H.G., Sable, H.J., Lester, D.B., 2019. Comparing phasic dopamine dynamics in the striatum, nucleus accumbens, amygdala, and medial prefrontal cortex. *Synapse* 73, 1–15. <https://doi.org/10.1002/syn.22074>.
- Inyushin, M.U., Arencibia-Albite, F., Vázquez-Torres, R., Vélez-Hernández, M.E., Jiménez-Rivera, C.A., 2010. Alpha-2 noradrenergic receptor activation inhibits the hyperpolarization-activated cation current (Ih) in neurons of the ventral tegmental area. *Neuroscience* 167, 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.052>.
- Jiménez-Rivera, C.A., Figueroa, J., Vázquez-Torres, R., Vélez-Hernandez, M.E., Schwarz, D., Velásquez-Martínez, M.C., Arencibia-Albite, F., 2012. Presynaptic inhibition of glutamate transmission by  $\alpha$ 2 receptors in the VTA. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1406–1415. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08029.x>.
- Keithley, R.B., Wightman, R.M., 2011. Assessing principal component regression prediction of neurochemicals detected with fast-scan cyclic voltammetry. *ACS Chem. Neurosci.* 2, 514–525. <https://doi.org/10.1021/cn200035u>.
- Kempadoo, K.A., Mosharov, E.V., Choi, S.J., Sulzer, D., Kandel, E.R., 2016. Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 14835–14840. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616515114>.
- Kielbinski, M., Bernacka, J., Solecki, W.B., 2019. Differential regulation of phasic dopamine release in the forebrain by the VTA noradrenergic receptor signaling. *J. Neurochem.* 149 <https://doi.org/10.1111/jnc.14706>.
- Koob, G.F., 2021. Drug addiction: hyperkatifeia/negative reinforcement as a framework for medications development. *Pharmacol. Rev.* 73, 163–201. <https://doi.org/10.1124/PHARMREV.120.000083>.
- Latusz, J., Maćkowiak, M., 2020. Early-life blockade of NMDA receptors induces epigenetic abnormalities in the adult medial prefrontal cortex: possible involvement in memory impairment in trace fear conditioning. *Psychopharmacology (Berl)* 237, 231–248. <https://doi.org/10.1007/S00213-019-05362-5>.
- Lee, A., Wissekerke, A.E., Rosin, D.L., Lynch, K.R., 1998. Localization of alpha2C-adrenergic receptor immunoreactivity in catecholaminergic neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 84, 1085–1096.
- Liprando, L.A., Miner, L.H., Blakely, R.D., Lewis, D.A., Sesack, S.R., 2004. Ultrastructural interactions between terminals expressing the norepinephrine transporter and dopamine neurons in the rat and monkey ventral tegmental area. *Synapse* 52, 233–244. <https://doi.org/10.1002/syn.20023>.
- MacDonald, E., Scheinin, M., 1995. Distribution and pharmacology of  $\alpha$ 2-adrenoceptors in the central nervous system. *J. Physiol. Pharmacol.* 46, 241–258.
- Mather, M., Clewett, D., Sakaki, M., Harley, C.W., 2016. Norepinephrine ignites local hotspots of neuronal excitation: how arousal amplifies selectivity in perception and memory. *Behav. Brain Sci.* 39 <https://doi.org/10.1017/S0140525X15000667>.
- Mejías-Aponte, C.A., 2016. Specificity and impact of adrenergic projections to the midbrain dopamine system. *Brain Res.* 1641, 258–273. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.01.036>.
- Mejías-Aponte, C.A., Drouin, C., Aston-Jones, G., 2009. Adrenergic and noradrenergic innervation of the midbrain ventral tegmental area and retrorubral field: prominent inputs from medullary homeostatic centers. *J. Neurosci.* 29, 3613–3626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4632-08.2009>.
- Nicholas, A.P., Hökfelt, T., Pieribone, V.A., 1996. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 245–255. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(96\)10022-5](https://doi.org/10.1016/0165-6147(96)10022-5).
- O'Rourke, M.F., Blaxall, H.S., Iversen, L.J., Bylund, D.B., 1994. Characterization of [3H]RX821002 binding to alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 268, 1362–1367.
- Paladini, C.A., Fiorillo, C.D., Morikawa, H., Williams, J.T., 2001. Amphetamine selectively blocks inhibitory glutamate transmission in dopamine neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 275–281. <https://doi.org/10.1038/85124>.
- Park, J.W., Bhimani, R.V., Park, J., 2017. Noradrenergic modulation of dopamine transmission evoked by electrical stimulation of the locus coeruleus in the rat brain. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 1913–1924. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00078>.
- Paxinos, G., Watson, C., 2013. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, seventh ed.* Academic Press. Amsterdam Academic Press.
- Poe, G.R., Foote, S., Eschenko, O., Johansen, J.P., Bouret, S., Aston-Jones, G., Harley, C. W., Manahan-Vaughan, D., Weinschenker, D., Valentino, R., Berridge, C., Chandler, D.J., Waterhouse, B., Sara, S.J., 2020. Locus coeruleus: a new look at the blue spot. *Nat. Rev. Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0360-9>.
- Pradel, K., Blasiak, T., Solecki, W.B., 2018. Adrenergic receptor agonists' modulation of dopaminergic and non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 375, 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.002>.
- Proudman, R.G.W., Akinaga, J., Baker, J.G., 2022. The affinity and selectivity of  $\alpha$ -adrenoceptor antagonists, antidepressants and antipsychotics for the human  $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B, and  $\alpha$ 2C-adrenoceptors and comparison with human  $\alpha$ 1 and  $\beta$ -adrenoceptors. *Pharmacol. Res. Perspect.* 10, e00936 <https://doi.org/10.1002/PRP2.936>.
- Ranjbar-Slamloo, Y., Fazlali, Z., 2020. Dopamine and noradrenaline in the brain; overlapping or dissociate functions? *Front. Mol. Neurosci.* 12, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00334>.
- Rodeberg, N.T., Johnson, J.A., Cameron, C.M., Sadoris, M.P., Carelli, R.M., Wightman, R.M., 2015. Construction of training sets for valid calibration of in vivo cyclic voltammetric data by principal component analysis. *Anal. Chem.* 87, 11484–11491. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03222>.
- Rosin, D.L., Zeng, D., Stornetta, R.L., Norton, F.R., Riley, T., Okusa, M.D., Guyenet, P.G., Lynch, K.R., 1993. Immunohistochemical localization of  $\alpha$ 2A-adrenergic receptors in catecholaminergic and other brainstem neurons in the rat. *Neuroscience* 56, 139–155. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90569-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90569-2).
- Ross, J.A., Van Bockstaele, E.J., 2021. The locus coeruleus-norepinephrine system in stress and arousal: unraveling historical, current, and future perspectives. *Front. Psychiatr.* <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.601519>.
- Sánchez-Soto, M., Bonifazi, A., Cai, N.S., Ellenberger, M.P., Newman, A.H., Ferré, S., Yano, H., 2016. Evidence for noncanonical neurotransmitter activation: norepinephrine as a dopamine D2-like receptor agonist. *Mol. Pharmacol.* 89, 457–466. <https://doi.org/10.1124/mol.115.101808>.
- Sara, S.J., Bouret, S., 2012. Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron* 76, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.011>.
- Scheinin, M., Lomasney, J.W., Hayden-Hixson, D.M., Schambra, U.B., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Fremeau, R.T., 1994. Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 21, 133–149. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(94\)90386-7](https://doi.org/10.1016/0169-328X(94)90386-7).
- Schmidt, K.T., Weinschenker, D., 2014. Adrenaline rush: the role of adrenergic receptors in stimulant-induced behaviors. *Mol. Pharmacol.* 85, 640–650. <https://doi.org/10.1124/mol.113.090118>.
- Sofuoglu, M., Rosenheck, R., Petrakis, I., 2014. Pharmacological treatment of comorbid PTSD and substance use disorder: recent progress. *Addict. Beyond Behav.* 39, 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2013.08.014>.
- Solecki, W.B., Szklarczyk, K., Klasa, A., Pradel, K., Dobrzański, G., Przewlocki, R., 2017. Alpha1-adrenergic receptor blockade in the VTA modulates fear memories and stress responses. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27, 778–794. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.05.008>.
- Solecki, W.B., Szklarczyk, K., Pradel, K., Kwiatkowska, K., Dobrzański, G., Przewlocki, R., 2018. Noradrenergic signaling in the VTA modulates cocaine craving. *Addiction Biol.* 23, 596–609. <https://doi.org/10.1111/adb.12514>.
- Solecki, W.B., Kielbinski, M., Karwowska, K., Zajda, K., Wilczkowski, M., Rajfur, Z., Przewlocki, R., 2019. Alpha1-adrenergic receptor blockade in the ventral tegmental area modulates conditional stimulus-induced cocaine seeking. *Neuropharmacology* 158. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107680>.
- Starke, K., 2001. Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on  $\alpha$ 2-adrenoceptors. *J. Neurochem.* 78, 685–693. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00484.x>.
- Tovar-Díaz, J., Pomrenze, M.B., Kan, R., Pahlavan, B., Morikawa, H., 2018. Cooperative CRF and  $\alpha$ 1 adrenergic signaling in the VTA promotes NMDA plasticity and drives social stress enhancement of cocaine conditioning. *Cell Rep.* 22, 2601–2614. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.039>.
- Upadhyay, J., Verrico, C.D., Cay, M., Kodele, S., Yammine, L., Koob, G.F., Schreiber, R., 2021. Neurocircuitry basis of the opioid use disorder–post-traumatic stress disorder comorbid state: conceptual analyses using a dimensional framework. *Lancet Psychiatr.* 1–13. [https://doi.org/10.1016/s2215-0366\(21\)00008-0](https://doi.org/10.1016/s2215-0366(21)00008-0), 0366.
- Velásquez-Martínez, M.C., Vázquez-Torres, R., Jiménez-Rivera, C.A., 2012. Activation of alpha1-adrenoceptors enhances glutamate release onto ventral tegmental area dopamine cells. *Neuroscience* 216, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.056>.
- Velásquez-Martínez, M.C., Vázquez-Torres, R., Rojas, L.V., Sanabria, P., Jiménez-Rivera, C.A., 2015. Alpha-1 adrenoceptors modulate GABA release onto ventral tegmental area dopamine neurons. *Neuropharmacology* 88, 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.09.002>.
- Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S.K., Vamanrao, A., Uchida, N., 2012. Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron* 74, 858–873. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.017>.
- Williams, M.A., Li, C., Kash, T.L., Matthews, R.T., Winder, D.G., 2014. Excitatory drive onto dopaminergic neurons in the rostral linear nucleus is enhanced by norepinephrine in an  $\alpha$ 1 adrenergic receptor-dependent manner. *Neuropharmacology* 86, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.07.001>.
- Zhang, H., Chaudhury, D., Nectow, A.R., Friedman, A.K., Zhang, S., Juárez, B., Liu, H., Pfau, M.L., Aleyasin, H., Jiang, C., Crumiller, M., Calipari, E.S., Ku, S.M., Morel, C., Tzavaras, N., Montgomery, S.E., He, M., Salton, S.R., Russo, S.J., Nestler, E.J., Friedman, J.M., Cao, J.L., Han, M.H., 2019.  $\alpha$ 1 - and  $\beta$ 3 -adrenergic receptor-mediated mesolimbic homeostatic plasticity confers resilience to social stress in susceptible mice. *Biol. Psychiatr.* 85, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.08.020>.



**NAc core, 60 Hz  
BRL (1 μg)**

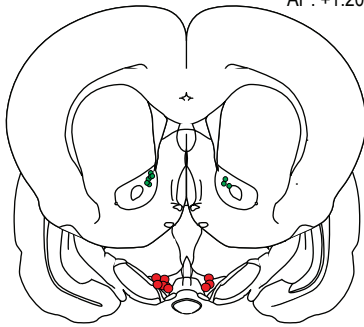
AP: +1.20 mm



AP: -5.30 mm

**NAc core, 60 Hz  
BRL (5 μg)**

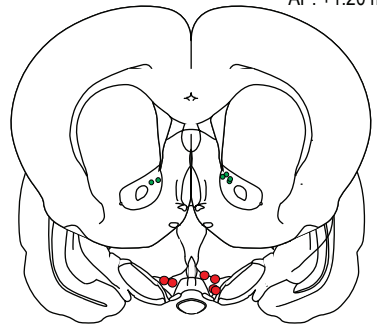
AP: +1.20 mm



AP: -5.30 mm

**NAc core, 60 Hz  
BRL (10 μg)**

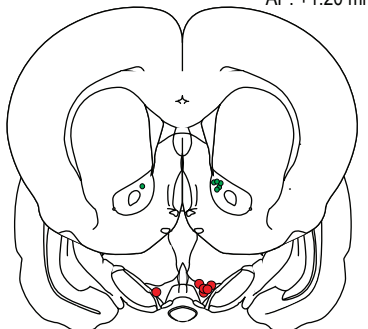
AP: +1.20 mm



AP: -5.30 mm

**NAc core, 60 Hz  
JP (1 μg)**

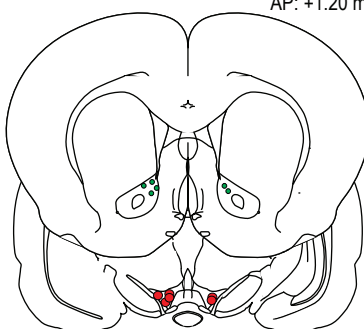
AP: +1.20 mm



AP: -5.30 mm

**NAc core, 60 Hz  
JP (10 μg)**

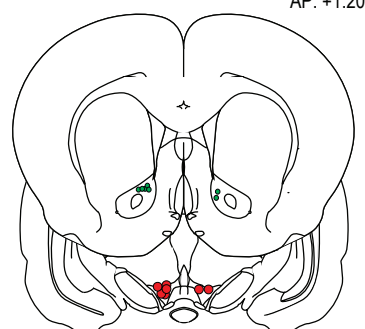
AP: +1.20 mm



AP: -5.30 mm

**NAc core, 60 Hz  
IMIL (1 μg)**

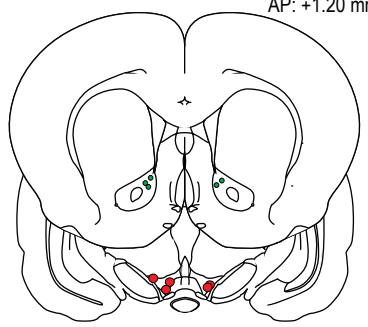
AP: +1.20 mm



AP: -5.30 mm

**NAc core, 60 Hz  
IMIL (10 μg)**

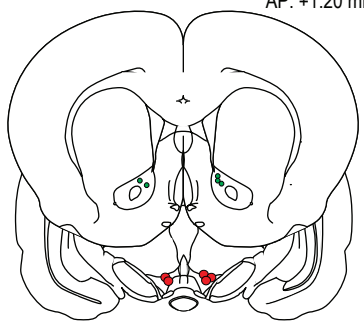
AP: +1.20 mm



AP: -5.30 mm

**NAc core, 60 Hz  
IDX (10 μg)**

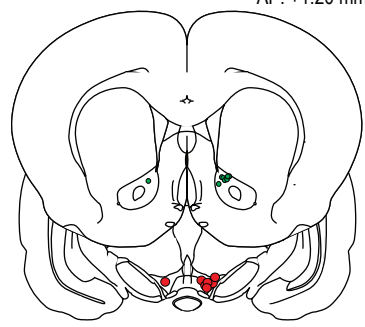
AP: +1.20 mm



AP: -5.30 mm

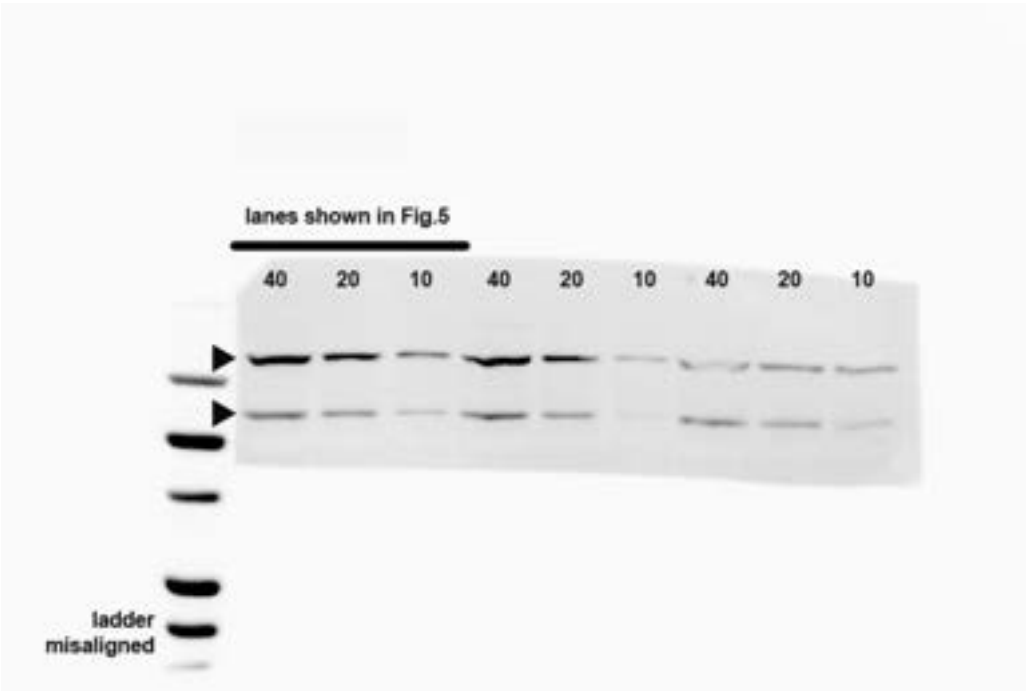
**NAc core, 60 Hz  
rac - BRL (0.5 - 10 μg)**

AP: +1.20 mm

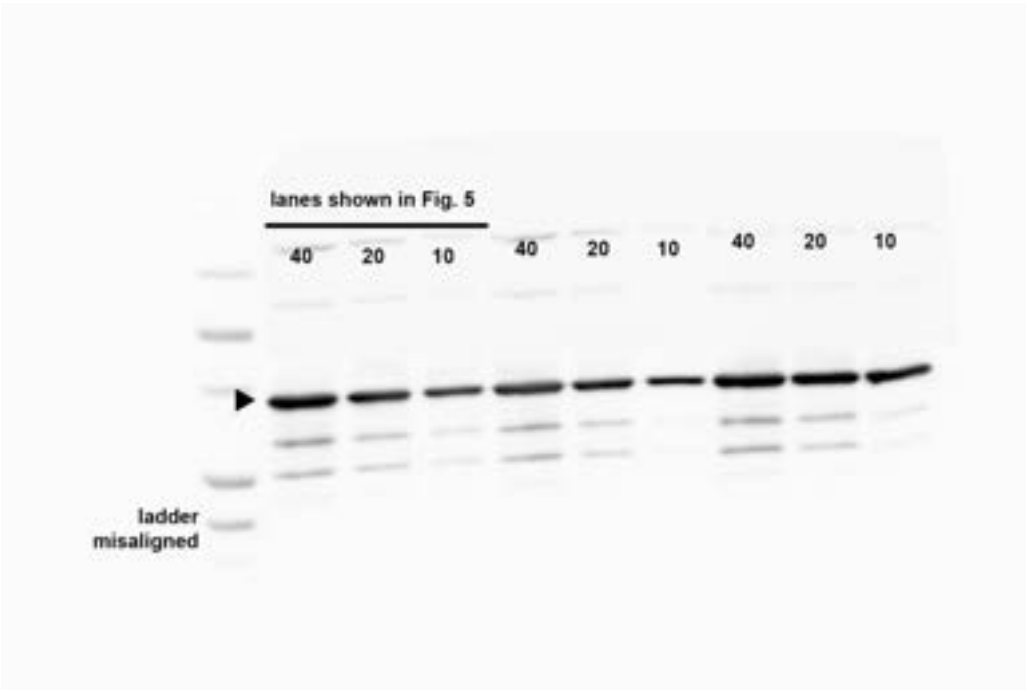


AP: -5.30 mm

Supplementary Fig. 2.



Supplementary Fig. 3.



### **Supplementary. Fig. 1**

Verification of recording and stimulation sites. Top: representative photomicrograph of a recording site in NAc core (arrowhead). Bottom: schematic coronal sections from the brain atlas (Paxinos and Watson, 2013), showing stimulation sites in the midbrain (red dots) and recording sites in the NAc (green dots).


### **Supplementary Fig. 2.**

Western blot gel image showing bands for  $\alpha_2$ -AR protein.

### **Supplementary Fig. 3.**

Western blot gel image showing bands for both  $\alpha_2$ -AR (top) and GAPDH protein (bottom).

# Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit

Michał Kielbinski<sup>1</sup> | Joanna Bernacka<sup>1,2</sup> | Katarzyna Zajda<sup>1</sup> | Agnieszka Wawrzczak-Bargieła<sup>2</sup> | Marzena Maćkowiak<sup>2</sup> | Ryszard Przewlocki<sup>3</sup> | Wojciech Solecki<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Neurobiology and Neuropsychology, Jagiellonian University, Institute of Applied Psychology, Krakow, Poland

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Laboratory of Pharmacology and Brain Biostructure, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland

<sup>3</sup>Department of Molecular Neuropharmacology, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland

## Correspondence

Wojciech Solecki, Department of Neurobiology and Neuropsychology, Institute of Applied Psychology, Jagiellonian University, 4 Lojasiewicza Street, 30-348 Krakow, Poland.  
Email: [wojciech.solecki@uj.edu.pl](mailto:wojciech.solecki@uj.edu.pl)

## Funding information

Narodowe Centrum Nauki, Grant/Award Number: UMO-2018/29/B/NZ7/02672; Statutory funds of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences

## Abstract

Noradrenergic neurotransmission is a critical mediator of stress responses. In turn, exposure to stress induces noradrenergic system adaptations, some of which are implicated in the etiology of stress-related disorders. Adrenergic receptors (ARs) in the ventral tegmental area (VTA) have been demonstrated to regulate phasic dopamine (DA) release in the forebrain, necessary for behavioral responses to conditional cues. However, the impact of stress on noradrenergic modulation of the VTA has not been previously explored. We demonstrate that ARs in the VTA regulate dopaminergic activity in the VTA–BLA (basolateral amygdala) circuit, a key system for processing stress-related stimuli; and that such control is altered by acute stress. We utilized fast-scan cyclic voltammetry to assess the effects of intra-VTA microinfusion of  $\alpha_1$ -AR and  $\alpha_2$ -AR antagonists (terazosin and RX-821002, respectively), on electrically evoked phasic DA release in the BLA in stress-naïve and stressed (unavoidable electric shocks – UES) anesthetized male Sprague–Dawley rats. In addition, we used western blotting to explore UES-induced alterations in AR protein level in the VTA. Intra-VTA terazosin or RX-821002 dose-dependently attenuated DA release in the BLA. Interestingly, UES decreased the effects of intra-VTA  $\alpha_2$ -AR blockade on DA release (24 h but not 7 days after stress), while the effects of terazosin were unchanged. Despite changes in  $\alpha_2$ -AR physiological function in the VTA, UES did not alter  $\alpha_2$ -AR protein levels in either intracellular or membrane fractions. These findings demonstrate that NA-ergic modulation of the VTA–BLA circuit undergoes significant alterations in response to acute stress, with  $\alpha_2$ -AR signaling indicated as a key target.

## KEYWORDS

acute stress, dopamine, noradrenaline, ventral tegmental area,  $\alpha_1$ -adrenergic receptor,  $\alpha_2$ -adrenergic receptor

**Abbreviations:** AR, adrenergic receptor; BLA, basolateral amygdala; BNST, bed nucleus of stria terminalis; BS<sup>3</sup>, bissulfosuccinimidyl suberate; DA, dopamine; FSCV, fast-scan cyclic voltammetry; LC, locus coeruleus; mPFC, medial prefrontal cortex; NA, noradrenaline; NAc, nucleus accumbens; RRID, Research Resource Identifier (see scicrunch.org); UES, unavoidable electric shock; VTA, ventral tegmental area.

Michał Kielbinski and Joanna Bernacka contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Journal of Neurochemistry* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of International Society for Neurochemistry.

## 1 | INTRODUCTION

Maladaptive changes in the brain catecholamine – dopamine (DA) and noradrenaline (NA) – neurotransmitter systems are widely recognized to be implicated in conditions related to stress: affective disorders, anxiety disorders as well as substance use disorder (Aston-Jones & Harris, 2004; Koob, 2014; Koob et al., 2014; Morilak et al., 2005; Smith & Aston-Jones, 2008). Multiple neural hubs involved in affective, cognitive, and behavioral responses to acute stressors are also potentially relevant for subsequent development of anxiety-like behaviors. This includes, among others: regions of the medial prefrontal cortex (mPFC), lateral septum, the central and basolateral amygdala, bed nucleus of stria terminalis (BNST) and nucleus accumbens, NAc (Morilak et al., 2005). Here, the basolateral amygdala (BLA) is of special interest, as both DA and NA signaling converge in this structure (Sharp, 2017), regulating BLA function in fear conditioning as well as modulating anxiogenic effects of prolonged stress (Daviu et al., 2019; Giustino & Maren, 2018; Haubrich et al., 2020; Kwon et al., 2015; McCall et al., 2017; Sharp, 2017).

Among the neuroadaptations implicated in vulnerability to stress and anxiety, one stands out as particularly critical: dysregulation of catecholaminergic neurotransmission itself, which has the potential to engage a plethora of downstream mechanisms in multiple structures of interest due to the sheer volume and breadth of brain-wide NA- and DA-ergic innervation (Beier et al., 2015; Poulin et al., 2018; Schwarz & Luo, 2015). For instance, in the locus coeruleus (LC), stress elicits an overall increase in excitability and, presumably, NA production, through a number of alterations in intrinsic properties, morphology and receptor expression (Borodovitsyna, Flamini et al., 2018; Borodovitsyna, Joshi, et al., 2018). This is accompanied by similar changes in NA efferents. With the use of fast-scan cyclic voltammetry (FSCV) and similar techniques enabling the detection of catecholamine release with high-spatiotemporal precision, several groups have demonstrated that NA terminals in BNST and BLA respond to stressful stimuli or drug abstinence/withdrawal, often by decreasing NA uptake or dampening the regulatory action of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors,  $\alpha_2$ -AR (Deal et al., 2021; Fox et al., 2015; McElligott et al., 2013; Schmidt et al., 2018). Both the reuptake of NA into terminals, as well as inhibition of its release via  $\alpha_2$ -AR autoreceptors (Gilsbach & Hein, 2012), limit the availability and local extracellular spread of NA, determining its capability to engage  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -ARs. Thus, these changes in LC efferents can drive up the levels of NA and engage plasticity in target structures (Fox et al., 2017).

Dopaminergic neurons in the ventral tegmental area (VTA) also undergo changes in excitability in response to stress (Baik, 2020; Douma & de Kloet, 2020). Given the fact that the VTA receives adrenergic innervation from the LC as well as brainstem areas A1/A2 (Mejias-Aponte et al., 2009), and that ARs are known to be expressed on most of the compartments of the VTA, including DA neurons, GABA interneurons, afferents and glial cells (Mejias-Aponte, 2016), the VTA emerges as a potential important locus of NA-ergic modulation. In our previous study, we have shown that NA can act directly in the VTA, differentially influencing DA release in mesocortical and

mesolimbic pathways. The release of DA in the mesolimbic pathway (from VTA to NAc core) was regulated by  $\alpha_1$ -AR receptor antagonists infused into the VTA, in contrast to DA release in the mPFC (Kielbinski et al., 2019). In that study, we also found that intra-VTA administration of RX-821002, an  $\alpha_2$ -AR antagonist, was capable of almost completely shutting down electrically-evoked phasic DA release in NAc and that dopamine  $D_2$  receptors ( $D_2$ Rs) were required for this effect. We interpreted this finding as cross-activation of  $D_2$ R by high levels of NA released into the VTA in response to electrical stimulation coupled with acute  $\alpha_2$ -AR autoreceptor blockade.

Given these priors: that BLA, an important structure involved in both fear and anxiety, is regulated by VTA DA-ergic input; that stressful stimuli have been demonstrated to decrease NA autoregulation by  $\alpha_2$ -AR; and that intra-VTA infusion of  $\alpha_2$ -AR antagonist results in attenuation of mesolimbic DA release, we asked whether the LC/A1/A2-VTA-BLA circuit exhibits stress-induced reduction in afferent  $\alpha_2$ -AR regulation of NA release in the VTA after exposure to a stressful stimulus in the form of a series of unavoidable electric shocks (UES).

We used FSCV measurements of electrically evoked DA efflux in BLA to compare the effects of  $\alpha_2$ -AR antagonist RX-821002 and  $\alpha_1$ -AR antagonist terazosin in naïve rats and rats which had been subjected to UES 24 h prior to recording. We found that the effect of RX-821002, but not terazosin, was attenuated significantly by stress, suggesting that noradrenergic projections into the VTA exhibit reduced responses to  $\alpha_2$ -AR autoregulation. These changes were transient, as 7 days after the exposure to electric shock the response to  $\alpha_2$ -AR blockade was normalized to naïve levels. To probe for potential mechanisms of altered  $\alpha_2$ -AR autoregulation, we performed the western blotting of VTA tissue samples treated with the protein crosslinker bisulfosuccinimidyl suberate ( $BS^3$ ) to separate intracellular and membrane fractions. However, we detected no changes in  $\alpha_2A$ -AR or  $D_2$  dopamine receptor expression in either of these fractions in stressed animals compared to controls. Thus, stress-induced decrease in  $\alpha_2$ -AR function is likely not mediated simply by changes in the expression or trafficking of  $\alpha_2$ -AR and  $D_2$  receptor proteins.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Animals and study design

Adult male Crl:CD(SD) Sprague-Dawley rats (RRID:RGD\_737891) weighing ~300 g at the start of the experiment were purchased from Charles River (Germany). Animals were housed in the Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University (Krakow, Poland). Animals were housed five per cage on a 12-hour light/dark cycle (lights on at 7 am – experimental procedures were performed during the light phase of the cycle), with ad libitum access to food and water and in a temperature- and humidity-controlled room. All the experimental procedures were conducted according to the EU Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Committee on

the Ethics of Animal Experiments at the Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland (approval n. 165/2019). The study was not pre-registered. Due to the within-subject design limiting the bias introduced by control vs treatment allocation, subjects were allocated to treatments non-randomly on a cohort-by-cohort basis. No blinding was performed during FSCV experiments due to practical limitations, histological evaluation post-experiment was blinded (subjects coded by date and decoded after verification).

## 2.2 | Drugs

Terazosin ( $\alpha_1$ -AR antagonist, 5  $\mu\text{g}$ , final concentration of 25.8 mM; cat. n. T4680, Sigma Aldrich, Germany), RX-821002 ( $\alpha_2$ -AR antagonist, 2.7  $\mu\text{g}$  or 13.5  $\mu\text{g}$ , final concentration of 23.06 mM, and 115.26 mM; cat. n. 1324, Tocris Bioscience, United Kingdom) were dissolved in sterile 0.9% saline and administered in a total volume of 0.5  $\mu\text{l}$  via a micropump (53 127 V, Stoelting Europe, Ireland) driving a 10  $\mu\text{l}$  syringe (26 s ga, Hamilton 701 N).

The injection of the drug into the structure was performed for 1 min, then the internal cannula was left at the injection site for another 1 min for complete diffusion into the tissue. The doses used were derived from previous studies (Kielbinski et al., 2019; Park et al., 2017).

## 2.3 | Unavoidable electric shock

Prior to FSCV or tissue preparation for western blot, rats from the experimental group were subjected to a series of unavoidable electric shock. Each rat was placed in the experimental chamber with a metal grid floor, one opaque Plexiglas sidewall, three metal sidewalls, a 24-V house light located on the opaque Plexiglas ceiling, and a white stimulus lamp illuminated by a 24-V bulb and a tone generator, both located on a metal sidewall. At 180 s, after being placed in the experimental chamber, all rats received four series of electric shocks, each consisting of a 30-s tone (60 dB) and light presentation co-terminated with a 2 s 0.9 mA electric footshock. The inter-trial interval lasted 60 s. 24 h or 7 days after the UES procedure animals were subjected to FSCV experiments.

## 2.4 | Surgical procedures

Animals were deeply anesthetized with urethane (1.5 g/kg i.p.; cat. n. U2500, Sigma Aldrich) and maintained under full anesthesia through the experiment, followed by immediate sacrifice (nonrecovery procedure). Urethane is a general anesthetic routinely used in electrophysiological and electrochemical *in vivo* studies, characterized by long-lasting (up to 24 h) and stable anesthesia and analgesia (Field et al., 1993). The depth on anesthesia was monitored throughout, no cases of premature termination of the

procedure due to loss of anesthesia were encountered. A heating pad was used throughout all experimental procedures to avoid hypothermia.

Animals were secured in a stereotaxic frame (Stoelting Europe, Ireland), the skin and tissue were removed to expose the skull and the bregma reference point was identified (Paxinos & Watson, 2013). Holes were then drilled, using bregma as a reference for the stimulation and recording electrodes. A carbon-fiber microelectrode consisting of a glass capillary (A-M, standard 1 mm diameter) and carbon fiber (7  $\mu\text{m}$  carbon diameter, cut to 50–80  $\mu\text{m}$ ) was inserted into the basolateral amygdala at the following coordinates (anteroposterior, mediolateral and dorsoventral displacement in mm from bregma): AP -2.0 to -2.4; ML +4.6; DV -7.1 to -7.4 below the dura. The bipolar stainless steel stimulating electrode combined with a guide cannula (1 mm width, 26 ga guide; Plastics One) was placed in the VTA: AP -5.3 to -5.5, ML -1.0, DV from dura-7.9 to -8.3. A reference Ag/AgCl electrode was inserted into the contralateral hemisphere and secured tightly with a single screw.

## 2.5 | Histological verification

At the end of each experimental session, a lesion was made at the recording site by stepwise application of current from 6 to 10  $\mu\text{A}$ , then animals were decapitated and brains were preserved in 10% formalin for later sectioning into 100  $\mu\text{m}$  coronal slices (on a Leica VT-1000S vibratome) for histological verification of stimulation and recording electrode placements. Implantation sites of both recording and stimulating electrodes were verified using a light microscope. Only animals where both the recording and stimulation electrodes were placed unambiguously in the BLA and VTA, respectively, based on corresponding anatomical sections in the rat brain atlas (Paxinos & Watson, 2013) were included. Figure S1 shows implantation sites of stimulating electrodes (VTA) and recording electrodes (BLA).

## 2.6 | Fast-scan cyclic voltammetry (FSCV)

The FSCV measurements were performed with techniques and equipment described previously (Kielbinski et al., 2019).

Briefly, the system consisted of a custom-built controller and headstage (University of North Carolina Department of Chemistry, Electronics Facility, Chapel Hill, USA) as well as stimulus isolator (DS 4, Digitimer Ltd) under the control of HDCV software (UNC Dept. of Chemistry Electronics Facility, Chapel Hill, USA).

A triangular waveform (from -0.4 V to +1.3 V against the Ag/AgCl reference, at a scan rate of 400 V/s applied in 850 steps of 2 mV per 100 ms window) was applied to the recording site. Background-subtracted, low-pass filtered (2 kHz) signal was used to generate cyclic voltammograms. Recordings were obtained as described previously (Kielbinski et al., 2019). For evoking DA release, the VTA was stimulated with a biphasic square waveform (300  $\mu\text{A}$ ; 2 ms per phase; 24 pulses) with 60 Hz frequency corresponding to "phasic"

activity. Each trace consisted of 15 s of recording, with stimulation being performed at  $t = 5$  s.

The experimental design is shown in Figure 1 and consisted of measurements performed at baseline, followed by a control infusion of saline into the VTA, followed by another, second baseline measurement, after which drug infusion was performed. For each condition, 5 to 6 consecutive measurements were taken, 180 s apart, to allow the local environment to equilibrate through DA uptake and to restore DA stores in neuronal terminals at the recording site (Wickham et al., 2013).

## 2.7 | Tissue preparation

For tissue preparation (previously described in Bator et al., 2018; Boudreau & Wolf, 2005; Chocyk et al., 2013), animals – naïve or 24 h post-UES – were killed by decapitation, the brains were immediately removed from the skull and dissected. Samples of the VTA were obtained with a small biopsy punch, then minced with a scalpel blade. The tissue was then transferred to tubes filled with cold ACSF (containing in mM: 118 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 10 glucose) and 5 mM bisulfosuccinimidyl suberate (BS<sup>3</sup>; cat. n. 21580, Thermo Scientific) solution was added. Crosslinker BS<sup>3</sup> is a water-soluble analogue of N-hydroxysuccinimide ester that reacts efficiently with primary amino groups (–NH<sub>2</sub>) of proteins to form stable amide bonds. Furthermore, BS<sup>3</sup> cannot pass through the cell membrane and binds only to fragments protruding from the

membrane, forming cross-linked protein complexes, while having no effect on intracellular proteins. The use of the BS<sup>3</sup> crosslinker thus allows the separation of proteins on the cell surface from intracellular proteins in the same sample without prior fractionation (Boudreau et al., 2012). Tissue samples in ACSF–BS<sup>3</sup> solution were incubated for 30 min on ice with gentle agitation. The reaction was terminated by adding 20 mM glycine (Sigma Aldrich) followed by a 10 min incubation on ice. Then, the samples were pelleted by brief centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in cold lysis buffer (PathScan® Sandwich ELISA Lysis Buffer [1X], Cell Signaling) with protease and phosphatase inhibitor cocktails (1:200; Sigma) and homogenized (TissueLyser, Retsch). The total protein concentrations in the extracts were determined using the QuantiPro BCA Assay kit (Sigma).

## 2.8 | Western blotting

Samples with an equal amount of protein extract (for  $\alpha_{2A}$ -AR protein, 40  $\mu$ g; and for D<sub>2</sub>R protein, 30  $\mu$ g of protein per lane) were separated using 7.5% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane using an electrophoretic transfer system (Bio-Rad). Then the membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit anti-ADRA2A (1:500; cat. n. NBP2-22452, NovusBio) or rabbit anti-DRD2 (1:1000; RRID:AB\_2094980, cat. n. AB5084P, Millipore) and rabbit anti-GAPDH (1:5000; cat. n. 14C10 2118S, Cell Signaling Technology). A suitable secondary antibody

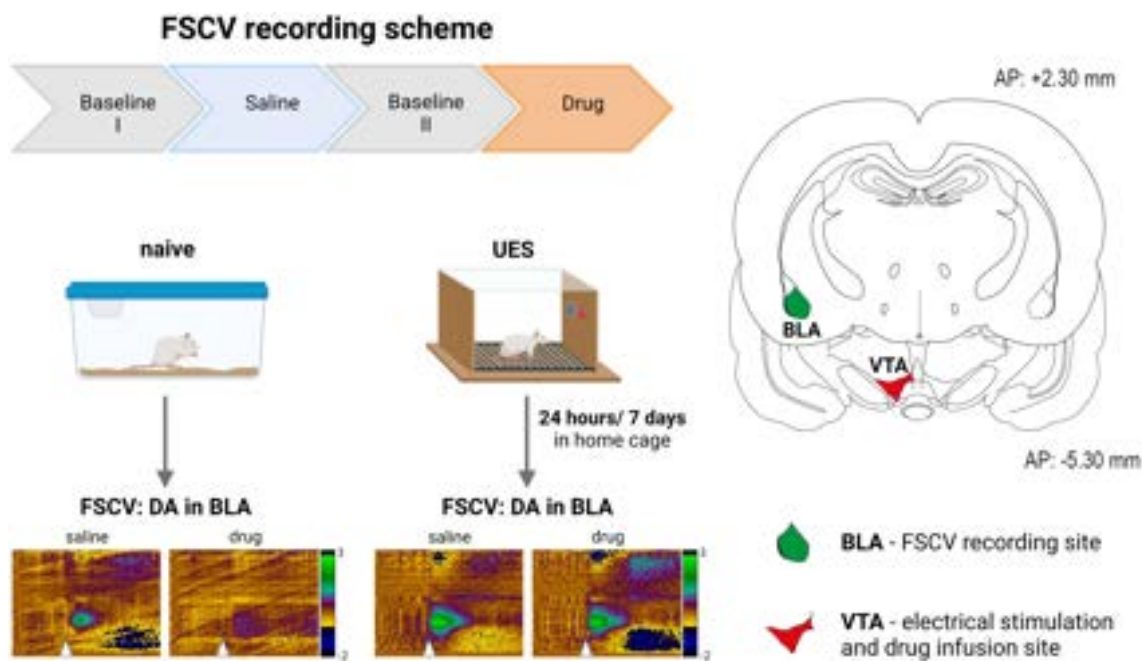


FIGURE 1 Schematic of the FSCV experiment. Top: Experimental design. Each stage consisted of a series of recordings: Baseline, followed by an injection of saline into the VTA and a series of “saline” recordings, followed by a baseline series (“baseline II”), followed by drug administration and recording. Bottom: The experiment included a “naïve” control group and the “UES” experimental groups which underwent unavoidable electric shock procedure 24 h or 7 days before the FSCV experiment; shown are examples of color plots of electrically evoked DA in BLA after VTA stimulation (white triangles). Right: Schematic coronal sections from the brain atlas (Paxinos & Watson, 2013), showing recording site in the BLA (green) and electrical stimulation and infusion site in the VTA (red).



was used to detect immune complexes (rabbit IgG antibody, 1:1000 from Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit, cat. n. 12015 218001, Roche – incubation for 1 h at room temperature). The reactions were visualized with enhanced chemiluminescence (ECL; Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit, Roche). Chemiluminescence was imaged using a luminescent image analyzer (Fujifilm LAS-1000; Fujifilm Corporation). Relative immunoreactivity levels for  $\alpha_{2A}$ -AR and GAPDH proteins were quantified using ImageJ software (Schneider et al., 2012). Density of the BS<sup>3</sup>-conjugated and unconjugated fractions were then expressed as ratios of  $\alpha_{2A}$ -AR/GAPDH and expressed as Z-scores to facilitate comparisons between technical replicates (blots).

## 2.9 | Data analysis

The HDCV Analysis software (UNC Department of Chemistry Electronics Facility, Chapel Hill, NC, USA) was used to quantify relative changes in phasic DA efflux as described previously (Kielbinski et al., 2019). Briefly, representative traces of electrically evoked phasic DA were obtained in vivo at different stimulation parameters (combinations of 12, 24, 48 pulses at stimulation amplitude of 200, 300, and 400  $\mu$ A, resulting in outputs spanning the range of signals expected under experimental conditions) and used as training sets for principal component regression analysis using the HDCV software's built-in capabilities (Bucher et al., 2013; Keithley & Wightman, 2011; Rodeberg et al., 2015). Components corresponding to DA and pH were identified and peak values corresponding to phasic DA were either averaged per experimental condition or used separately to study changes over time. In all cases, DA levels after saline or antagonist intra-VTA administration were expressed as percentile ratios representing change in DA efflux versus the average of their respective 5–6 baseline traces (Figure 1). Additionally, the difference of % DA changes after saline vs drug injection was calculated to compare the respective effects in naïve and stressed subjects.

Only datasets meeting minimal quality criteria – stable baseline DA levels (i.e., distinctly identifiable, upon visual inspection, peaks corresponding to stimulation, with no non-stimulated peaks or fluctuation at a similar amplitude), no missing measurements (for time-course data; for averaged values, data sets of at least 4 traces with no consecutive rejected traces were accepted) and no contamination from above-background residual signal in PCA output – were included in the final analysis. Initial numbers of subjects used were determined based on similar previously published experiments (Kielbinski et al., 2019); the effect of terazosin on NAc phasic DA was taken as a conservative estimate of an expected effect – post-hoc power analysis for repeated-measures *T*-test on this data (observed standardized difference  $d = 1.544588$ ) yielded power  $>0.85$  for  $n \geq 6$ , assuming two-sided  $p = 0.05$ .

Summary of animals used and excluded from the experiments on the basis of histological verification or failure of the recorded data to meet quality criteria is shown in Table 1.

Relative changes in phasic DA after saline and drug infusion were compared with repeated measures *T*-tests (for average effect calculation), or with repeated measures two-way analysis of variance (RM ANOVA) for time course data, with within-subjects drug treatment and time effects as well as drug-time interaction. For differences between saline and drug changes, simple (unpaired) *T*-tests or ANOVA were used, with drug dose and treatment (naïve vs UES), where appropriate. For normalized relative levels of  $\alpha_{2A}$ -AR signal obtained from western blotting, unpaired *T*-tests were used as well. In all cases,  $p < 0.05$  (two-sided) was taken as the threshold of significance. No outlier removal or value imputation methods were used; data conformation towards parametric statistical test assumptions was verified by histogram and residual plot evaluation. All the statistical analyses were performed with Prism 9.0 (GraphPad Software).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Intra-VTA $\alpha_1$ -AR antagonist terazosin reduces DA release into the BLA but is not modulated by a single episode of UES

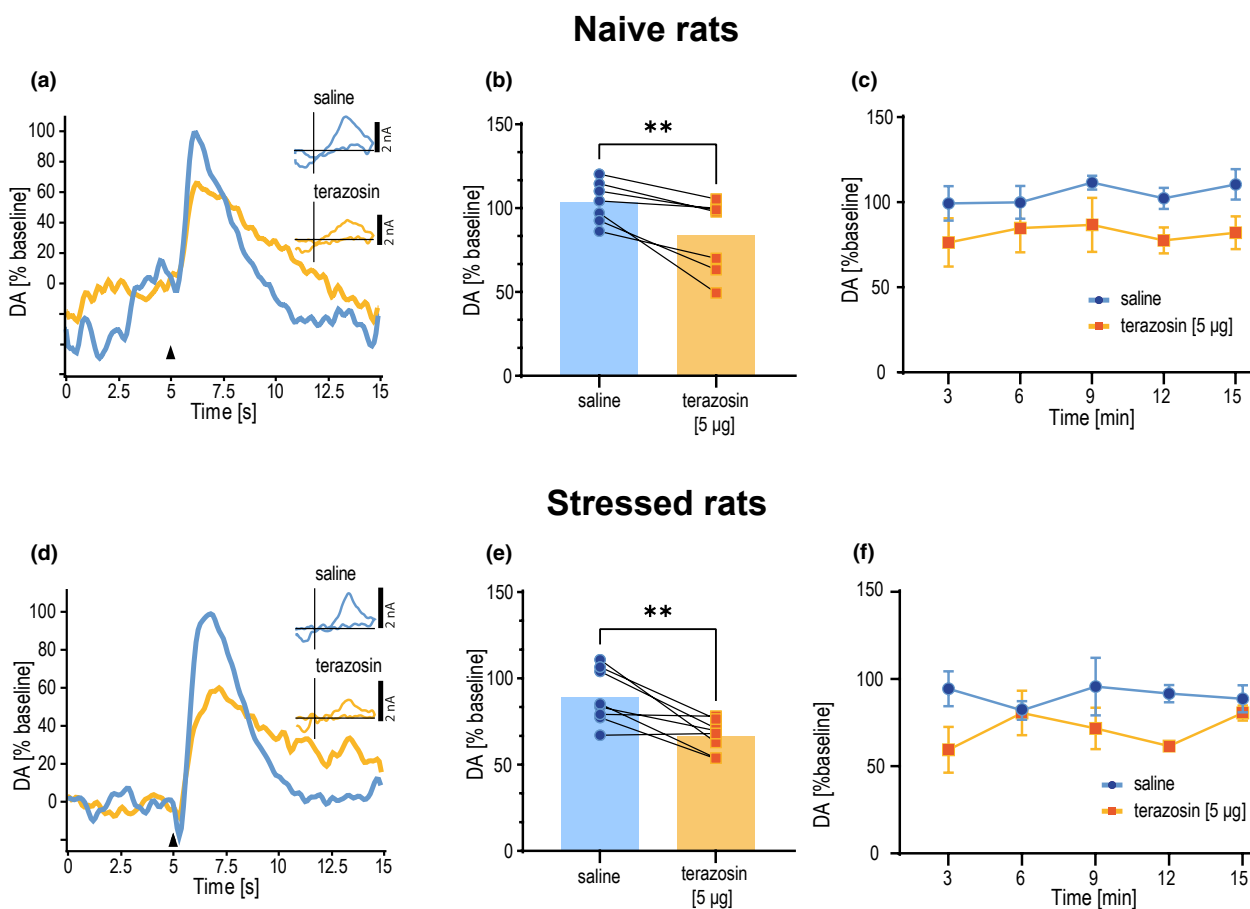
After administration of the  $\alpha_1$ -AR antagonist terazosin (5  $\mu$ g) to the VTA, we observed a significant decrease in the average level of electrically evoked phasic DA released into the BLA in comparison with saline control (Figure 2b; paired *T*-test  $t_{[6]} = 3.71$ ,  $n = 7$  rats,  $p = 0.01$ ). The results obtained in animals after a single episode of UES are analogous to those in naïve animals, i.e., intra-VTA terazosin (5  $\mu$ g) causes a reduction in average DA levels in the BLA (Figure 2e; paired *T*-test  $t_{[7]} = 3.79$ ,  $n = 8$  rats,  $p = 0.0068$ ). Time comparisons of single traces showed no significant effect of terazosin administration at a dose of 5  $\mu$ g in both naïve (Figure 2c; RM ANOVA: drug effect  $F_{(1,4)} = 7.691$ ,  $n = 5$  rats,  $p = 0.0502$ ; time effect  $F_{(2,338,9,353)} = 1.357$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.31$ ; time x drug  $F_{(2,869,11,48)} = 0.4284$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.73$ ) and stressed rats (Figure 2f; RM ANOVA: drug effect  $F_{(1,4)} = 5.016$ ,  $n = 5$  rats,  $p = 0.089$ ; time effect  $F_{(2,014,8,057)} = 0.3247$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.73$ ; time x drug  $F_{(1,961,7,846)} = 2.25$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.17$ ). Moreover, a direct comparison of saline-drug differences in relative DA change from baseline between the naïve and UES groups showed no difference in the effect induced by intra-VTA administration of terazosin (Figure 5a; unpaired *T*-test  $t_{[13]} = 0.31$ ,  $n = 14$ ,  $p = 0.76$ ).

### 3.2 | Intra-VTA $\alpha_2$ -AR antagonist dose-dependently reduces electrically evoked phasic DA release into the BLA

Administration of an  $\alpha_2$ -AR antagonist (RX-821002) at a dose of 2.7  $\mu$ g to VTA resulted in a decrease in electrically evoked, phasic DA release into the BLA in naïve animals (Figure 3b; paired *T*-test  $t_{[5]} = 7.64$ ,  $n = 6$  rats,  $p = 0.0006$ ). Furthermore, administration of a higher dose of RX-821002, i.e., 13.5  $\mu$ g resulted in nearly complete blockade of DA release into the BLA (Figure 3e; paired *T*-test

Drug	Initial	Excluded (data quality)	Excluded (histological verification)	Final n
Terazosin 5.0 µg naïve	9	0	2	7
Terazosin 5.0 µg stressed	12	1	3	8
RX-821002 2.7 µg naïve	8	1	1	6
RX-821002 2.7 µg stressed	9	0	3	6
RX-821002 13.5 µg naïve	8	0	2	6
RX-821002 13.5 µg stressed	9	1	1	7
RX-821002 13.5 µg 7 days after stress	8	0	3	5

**TABLE 1** A total of 44 rats out of 63 were used for the study. Among those discarded: 4 were excluded during data analysis (due to artifacts in the FSCV data traces resulting in above-threshold residual current, as determined by HDCVsoftware) and 15 were excluded based on histological verification (only animals with visible and unambiguous electrode placements in both BLA and VTA were accepted)



**FIGURE 2** Effects of terazosin intra-VTA infusion on electrically evoked phasic DA release in the BLA in naïve and stressed animals. (a, d) Representative FSCV traces obtained after infusion of saline and terazosin (5 µg) in naïve (a) and stressed (d) rats. Insets show representative current to voltage traces obtained from BLA in response to VTA stimulation after saline and terazosin. (b, e) plots of averaged DA values, bars represent the average obtained from all results, points represent individual measurements in naïve (b, n = 7) and stressed (e, n = 8) rats. \*\**p* < 0.01 in paired Student's test. (c, f) time course comparisons of relative DA peaks (% of their corresponding baseline) over five consecutive measurements in naïve (n = 5) and stressed (n = 5) rats after saline and terazosin (5 µg).

$t_{[5]} = 7.52$ ,  $n = 6$  rats,  $p = 0.0007$ ). Time comparisons of single traces showed a significant effect of RX-821002 at both doses. For 2.7 µg (Figure 3c; RM ANOVA: drug effect  $F_{(1,4)} = 70.62$ ,  $n = 5$  rats,  $p = 0.0011$ ; time effect  $F_{(1,479,5,917)} = 0.6732$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.50$ ; time x drug  $F_{(1,634,6,537)} = 0.6613$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.52$ ) Sidak's post-test of multiple comparisons showed significant differences for

three initial time points (i.e. 3, 6, 9 min.). For the 13.5 µg dose (Figure 3f; RM ANOVA: drug effect  $F_{(1,4)} = 38.81$ ,  $n = 5$  rats,  $p = 0.0034$ ; time effect  $F_{(1,942,7,766)} = 3.163$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.10$ ; time x drug  $F_{(2,035,8,140)} = 0.4145$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.68$ ) Sidak's multiple comparisons post-test revealed significant differences for first four time points (3–12 min).

### 3.3 | UES decreases the effects of intra-VTA administration of RX-821002 in BLA

A single episode of UES resulted in a complete blockade of the effect that was induced by intra-VTA administration of a low (2.7  $\mu\text{g}$ ) dose of RX-821002 in naïve animals. In stressed animals, the average DA levels obtained after saline and RX-821002 (2.7  $\mu\text{g}$ ) were not different from saline control (Figure 3h; paired *T*-test  $t_{[5]} = 0.88$ ,  $n = 6$  rats,  $p = 0.42$ ). Comparison of individual time points also showed no significant differences (Figure 3i; RM ANOVA: drug effect  $F_{(1,5)} = 4.582$ ,  $n = 6$  rats,  $p = 0.085$ ; time effect  $F_{(1,92,9,962)} = 0.7583$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.49$ ; time x drug  $F_{(1,852,9,258)} = 0.8399$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.45$ ).

In contrast, in animals that underwent a single episode of UES, administration of a high dose of an  $\alpha_2$ -AR antagonist (RX-821002, 13.5  $\mu\text{g}$ ) to the VTA reduced the average level of DA release to the BLA, but to a lesser extent than in naïve animals (Figure 3l paired *T*-test  $t_{[6]} = 4.55$ ,  $n = 7$  rats,  $p = 0.0039$ ). Similarly, comparisons based on single trace time points showed a significant effect (Figure 3m; RM ANOVA: drug effect  $F_{(1,5)} = 10.18$ ,  $n = 6$  rats,  $p = 0.024$ ; time effect  $F_{(1,662,8,311)} = 1.033$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.38$ ; time x drug  $F_{(2,318,11,59)} = 0.4904$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.65$ ), however, none of the particular time-point comparisons reached significance based on Sidak's multiple comparisons tests. In addition, a direct comparison of the effects induced by the administration of two doses of RX-821002 in naïve and stressed animals showed a significant main effect of treatment (Figure 5b; two-way ANOVA;  $F_{[1,21]} = 20.92$ ;  $p = 0.0002$ ), multiple comparisons test revealed differences between the naïve and UES groups after the administration of 2.7  $\mu\text{g}$  RX-821002 ( $p = 0.0003$ ), and 13.5  $\mu\text{g}$  RX-821002 ( $p = 0.0466$ ).

### 3.4 | Seven days after a single episode of UES, the effects of RX-821002 administration were normalized

Given the clear effects of a single episode of UES on the modulation of DA release in the BLA by  $\alpha_2$ -AR blockade in the VTA, we next set out to test how long this change would persist. To this end, we performed FSCV experiments 7 days after the UES procedure. Interestingly, the results obtained 7 days after UES were similar to those observed in naïve animals, with the average DA level in BLA decreased significantly after intra-VTA RX-821002 (2.7  $\mu\text{g}$ ) administration (Figure 4b; paired *T*-test  $t_{[4]} = 6.15$ ,  $n = 5$  rats,  $p = 0.0035$ ). In addition, comparisons of single traces over time showed a significant effect of RX-821002 intra-VTA infusion (Figure 4c; RM ANOVA: drug effect  $F_{(1,4)} = 40.60$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.0031$ ; time effect  $F_{(1,485,5,938)} = 0.4542$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.60$ ; time x drug  $F_{(2,670,10,68)} = 2.149$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0.16$ ). Significant decreases in DA release were found at 4 of the 6 time points (3, 9, 12, 15 min) based on Sidak's multiple comparisons post-test. A direct comparison between the groups: naïve, 24 h and 7 days after UES showed a significant, but transient effect of stress on the level of DA released into the BLA (Figure 5c, one-way ANOVA;  $F_{[2,14]} = 9.86$ ;  $p = 0.0021$ ). Tukey's multiple comparisons test revealed significant differences

between the naïve and 24 h post-UES ( $p = 0.0028$ ), as well as 24 h post-UES and 7 days post-UES groups ( $p = 0.01$ ), while the naïve and 7 days post-UES groups did not differ ( $p = 0.88$ ).

### 3.5 | Protein levels of either the membrane or intracellular fractions of both $\alpha_2$ and $D_2$ receptors are not modulated by a single episode of UES

Given our results showing that a single episode of UES affects  $\alpha_2$  receptor-dependent modulation of DA release in the BLA, and data from our previous work showing that  $D_2$  receptors are required for the effect induced by intra-VTA administration of an  $\alpha_2$ -AR antagonist (Kielbinski et al., 2019), we decided to test whether protein levels of both of these receptors ( $\alpha_{2A}$ -AR and  $D_2R$ ) change following UES. Both a band with a predicted molecular mass of approximately 50–70 kDa, corresponding to  $\alpha_{2A}$ -AR or  $D_2R$  (intracellular protein) and a band with a high molecular mass (corresponding to BS<sup>3</sup>-crosslinked  $\alpha_{2A}$ -AR or  $D_2R$  membrane-expressed protein) were observed in BS<sup>3</sup>-treated tissues prepared from VTA samples of both naïve animals and rats subjected to a single episode of UES. We then compared the standard scores between control and stressed groups in terms of membrane protein levels, intracellular protein levels and the ratio of these fractions to each other. UES had no effect on membrane  $\alpha_{2A}$ -AR protein levels (Figure 6b; unpaired *T*-test  $t_{[14]} = 0.28$ ,  $p = 0.78$ ), intracellular levels (Figure 6c; unpaired *T*-test  $t_{[14]} = 0.79$ ,  $p = 0.44$ ) and the ratio of membrane to intracellular levels (Figure 6e; unpaired *T*-test  $t_{[14]} = 0.90$ ,  $p = 0.38$ ).

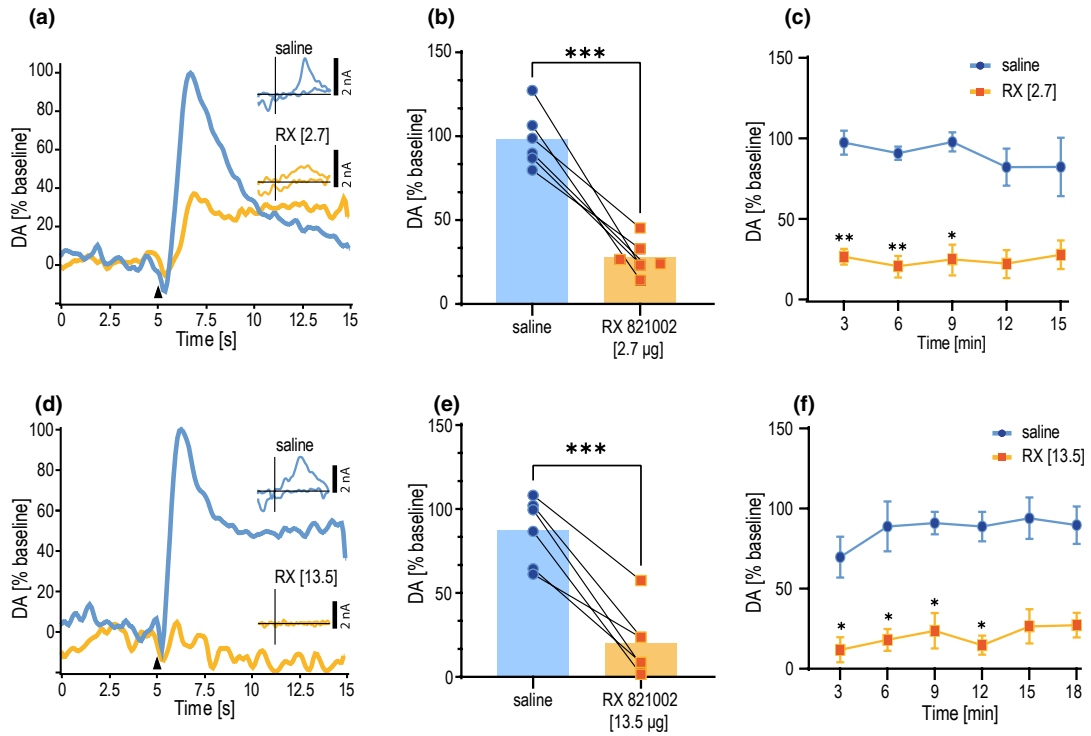
As with  $\alpha_{2A}$ -AR protein levels, a single episode of UES did not affect  $D_2R$  protein expression in either of the fractions studied, i.e., membrane (Figure 6f; unpaired *T*-test  $t_{[15]} = 0.53$ ,  $p = 0.60$ ) and intracellular (Figure 6g; unpaired *T*-test  $t_{[15]} = 0.22$ ,  $p = 0.83$ ), and there were no statistically significant differences in the ratio of membrane to intracellular  $D_2R$  protein levels (Figure 6h; unpaired *T*-test  $t_{[15]} = 0.29$ ,  $p = 0.78$ ; unpaired *T*-test  $t_{[15]} = 0.29$ ,  $p = 0.78$ ).

## 4 | DISCUSSION

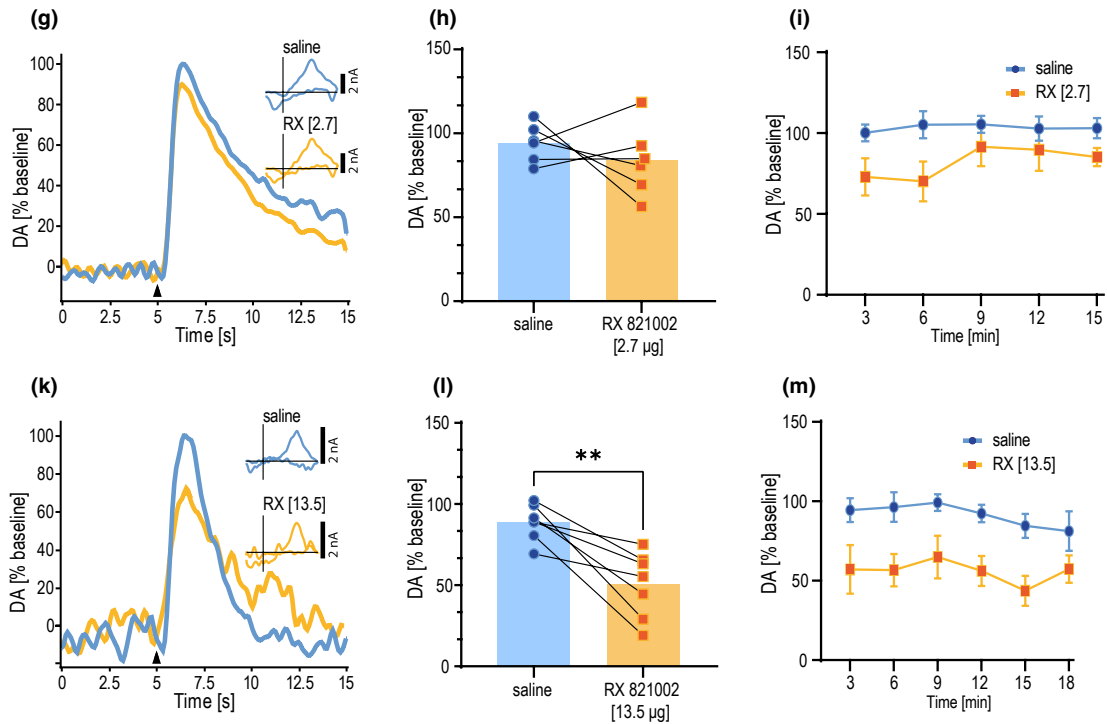
### 4.1 | Regulation of BLA DA release by NA input to the VTA

Owing to its wide reciprocal connectivity, BLA is well-positioned to influence both positive and negative valence attribution and consequent processing of stimuli in the short term, as well as network-level changes in emotional processing that gives rise to anxiety-like behavior in the longer term (Daviu et al., 2019; Janak & Tye, 2015). These functions are modulated by both NA- and DA-ergic inputs (de la Mora et al., 2010; Giustino & Maren, 2018; Janak & Tye, 2015; Lee et al., 2017; Sharp, 2017; Stubbendorff & Stevenson, 2021). Optogenetic experiments have shown that NA can modulate BLA directly, via  $\beta$ -ARs (McCall et al., 2015),

### Naive rats



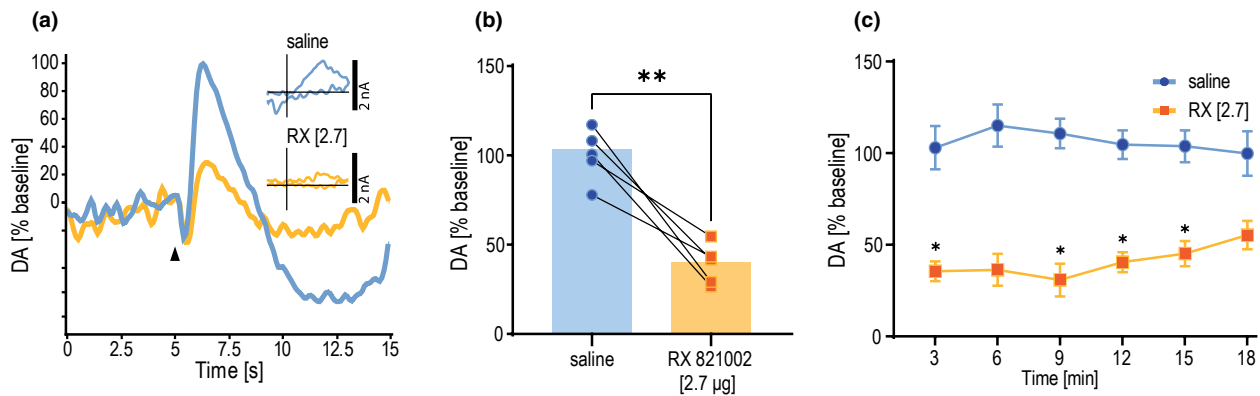
### Stressed rats



however, it was previously unclear whether activation of the NA system is capable of modulating the DA-ergic input into BLA as well – a hypothesis made likely by the observation that intra-VTA administration of AR antagonists modulates conditioned behaviors in which BLA is involved (Solecki et al., 2017, 2018, 2019).

In the present study, we report that – similarly to projections from the VTA to NAc and in contrast to projections into mPFC (Kielbinski et al., 2019) – DA neurons projecting to BLA are also recruited from a pool of cells that respond to NA via both  $\alpha_1$ -AR- and  $D_2$ -R-mediated regulation. In contrast to DA projections from the

**FIGURE 3** Effects of RX-821002 intra-VTA infusion on electrically evoked phasic DA release in the BLA in naïve and stressed animals. (a, d) representative FSCV traces obtained after infusion of saline and 2.7  $\mu\text{g}$  (a) and 13.5  $\mu\text{g}$  (d) RX-821002 in naïve rats. Insets show representative current to voltage traces obtained from BLA in response to VTA stimulation after saline and RX-821002. (b, e) plots of averaged DA values, bars represent the average obtained from all results, points represent individual measurements after administration of saline and RX-821002 at doses of 2.7  $\mu\text{g}$  (b,  $n = 6$ ) and 13.5  $\mu\text{g}$  (e,  $n = 6$ ) in naïve rats. \*\*\* $p < 0.001$  in paired Student's test. (c, f) time course comparisons of relative DA peaks (% of their corresponding baseline) over six consecutive measurements in naïve rats after saline and RX-821002 (c: 2.7  $\mu\text{g}$ ,  $n = 5$  and f: 13.5  $\mu\text{g}$ ,  $n = 5$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  in Sidak multiple comparisons post-hoc test. (g, k) representative FSCV traces obtained after infusion of saline and 2.7  $\mu\text{g}$  (g) and 13.5  $\mu\text{g}$  (k) RX-821002 in stressed rats. (h, l) plots of averaged DA values after administration of saline and RX-821002 at doses of 2.7  $\mu\text{g}$  (h,  $n = 6$ ) and 13.5  $\mu\text{g}$  (l,  $n = 7$ ) in stressed rats. \*\* $p < 0.01$  in paired Student's test. (i, m) time course comparisons of relative DA peaks (% of their corresponding baseline) over six consecutive measurements in stressed rats after saline and RX - 821002 (i: 2.7  $\mu\text{g}$ ,  $n = 6$  and 13.5  $\mu\text{g}$ ,  $n = 6$ : M). \* $p < 0.05$  in Sidak multiple comparisons post-hoc test.



**FIGURE 4** Effects of RX-821002 intra-VTA infusion on electrically evoked phasic DA release in the BLA in rats 7 days after UES. (a) Representative FSCV traces obtained after infusion of saline and RX-821002 (2.7  $\mu\text{g}$ ) in rats at 7 days post-UES. Insets show representative current to voltage traces obtained from BLA in response to VTA stimulation after saline and RX-821002. (b,  $n = 5$ ) plots of averaged DA values, bars represent the means, points represent individual measurements after administration of saline and RX-821002 (2.7  $\mu\text{g}$ ). \*\* $p < 0.01$  in paired Student's test. (c,  $n = 5$ ) time course comparisons of relative DA peaks (% of their corresponding baseline) over six consecutive measurements in rats after saline and RX-821002 (2.7  $\mu\text{g}$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  in Sidak multiple comparisons post-hoc test.

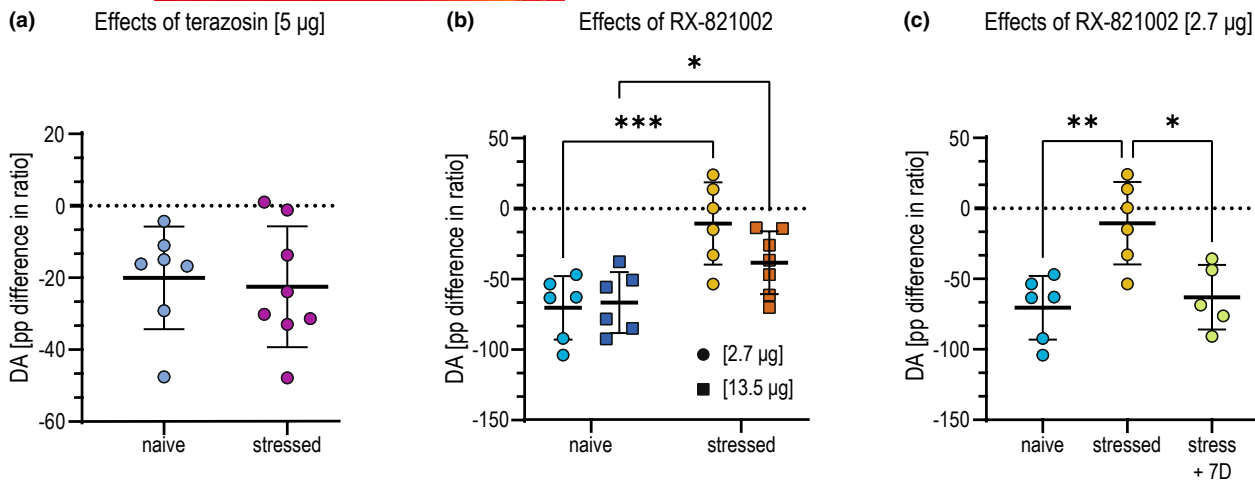
VTA to dorsal and ventral striatum, the VTA-mPFC and VTA-BLA pathways are seldom studied with voltammetric tools, owing to relative technical difficulty – both due to lower DA output, and the fact that these structures receive NA- as well as DA-ergic innervation, which could potentially introduce issues with interpretation of the voltammetric signal. Nonetheless, based on anatomical and pharmacological characterization, stimulation of the VTA indeed seems to specifically elicit DA release with no evidence of mixed catecholamine (DA/NA) output in those areas (Garris et al., 1994; Holloway et al., 2019; Shnitko & Robinson, 2014). The kinetics of electrically evoked VTA-BLA DA are consistent with a much smaller available neurotransmitter pool and thus significantly lower peak release, as well as slower uptake via transporters compared to striatal DA (Garris et al., 1994; Holloway et al., 2019), in line with postulated broader diffusion and neuromodulatory action at this site.

A large anatomical study (Poulin et al., 2018) has previously explored the projection sites of several populations of tyrosine hydroxylase-positive VTA DA neurons defined with intersectional transgenic tools in mice. The predominant population innervating NAc core – cholecystokinin-positive (Cck+) neurons – also densely innervates BLA. In contrast, the comparatively sparse innervation in the prefrontal cortex consists primarily of Vglut-positive neurons,

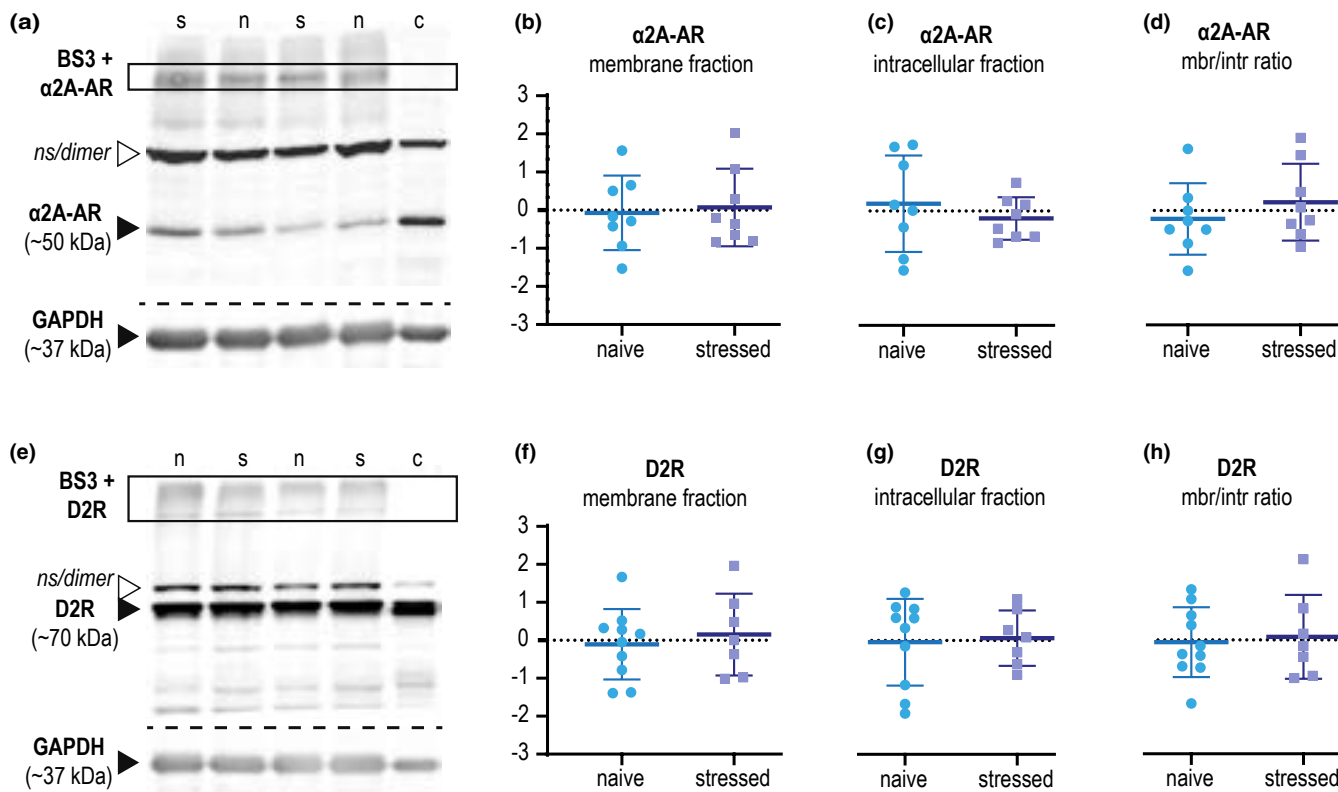
with a small admixture of Cck+. Thus, we presume that these Cck+ cells constitute the common molecular subtype of DA neurons projecting to both BLA and NAc that is responsive to modulation by NA. It is still unclear, however, whether these projections are subserved by the same neurons, and their specialization (responsible for differences in DA release and uptake) is limited to NAc and BLA terminals, or if these are separate cells sharing some molecular characteristics.

#### 4.2 | Mechanisms of $\alpha_1$ -AR and $\alpha_2$ -AR regulation of VTA

In the VTA, the  $\alpha_1$ -AR antagonist terazosin could reduce evoked DA through a variety of candidate mechanisms: direct postsynaptic modulation of cell excitability (Goertz et al., 2015), regulation of neurotransmitter release at local glutamatergic and GABA terminals (Velásquez-Martinez et al., 2020, 2012, 2015) and interaction with other receptors (Paladini et al., 2001; Tovar-Díaz et al., 2018; Williams et al., 2014). When infused into the VTA, the  $\alpha_2$ -AR antagonist RX-821002, in line with our previous findings in NAc core, potently inhibits electrically evoked DA release in BLA, likely by a mechanism involving cross-activation of  $D_2$  receptors



**FIGURE 5** Comparisons of average effects of terazosin and RX-821002 intra-VTA administration in stressed and naïve animals. (a) Difference in average relative DA values (saline – Terazosin) in naïve rats ( $n = 7$ ) and animals 24 h post-UES ( $n = 8$ ). (b) Difference in average relative DA values (saline – RX-821002) after 2.7 µg and 13.5 µg RX-821002 intra-VTA infusion in naïve ( $n = 6$ ;  $n = 6$ , respectively) and 24 h post-UES groups ( $n = 6$ ;  $n = 7$ , respectively). (c) Difference in average relative DA values (saline – RX-821002) after 2.7 µg RX-821002 intra-VTA infusion in naïve ( $n = 6$ ), 24 h post-UES ( $n = 6$ ) and 7 days post-UES ( $n = 5$ ). Differences expressed as percentage points (saline – Drug). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  in multiple comparisons post-hoc tests.



**FIGURE 6** Effect of a single episode of UES on  $\alpha_{2A}$ -AR and D<sub>2</sub>R protein levels in rat VTA - western blot analysis. Representative immunoblots probed with antibodies for (a)  $\alpha_{2A}$ -AR and (e) D<sub>2</sub>R and GAPDH. Membrane (b, f), intracellular (c, g) and ratio of membrane to intracellular protein levels (d, h) of  $\alpha_{2A}$ -AR and D<sub>2</sub>R protein, respectively, in control ( $n = 8$  and  $n = 10$  for  $\alpha_{2A}$ -AR and D<sub>2</sub>R respectively) and stressed ( $n = 8$ ;  $n = 9$ ) groups. Plots show mean Z-score values with standard deviation, points show single measurements.

by NA (Arencibia-Albite et al., 2007; Grenhoff et al., 1995). This is corroborated by studies showing that D<sub>2</sub>-like receptors have a relatively similar affinity towards NA and DA and that NA binding

to these receptors is indeed capable of activating G-protein dependent downstream signaling (Guiard et al., 2008; Sánchez-Soto et al., 2016). In addition, (Park et al., 2017) have observed

that while electrical stimulation of LC evoked putative DA release in NAc, systemic administration of the  $\alpha_2$ -AR antagonist idazoxan inhibited NAc catecholamine release.

### 4.3 | Attenuated $\alpha_2$ -AR autoreceptor control over VTA NA after stress

The second major finding here is that, following a single episode of acute stress in the form of UES, the effects of RX-821002 were significantly reduced. The efficacy of the larger dose used in the study (13.5  $\mu$ g per infusion) was significantly decreased, while the 2.7  $\mu$ g dose, which in naïve animals was effective at reducing electrically evoked DA, had no effect. This change in responsivity to  $\alpha_2$ -AR antagonist was transient, as 7 days after exposure to stress, normalized responses to intra-VTA RX-821002 were observed. This observation fits within the body of data reported previously in other NA release sites, particularly BNST (Fox et al., 2015; McElligott et al., 2013; Schmidt et al., 2018). Using similar techniques of voltammetry and pharmacological challenge, these authors initially reported that the releasable pool of NA in BNST terminals, its uptake, as well as regulation by  $\alpha_2$ -ARs, was altered by either baseline susceptibility to stress in rat lines bred for their anxiety-like phenotypes (Lewis and Tokyo WKY rats), or by exposure to stress or opiate withdrawal (Fox et al., 2015; McElligott et al., 2013). Those alterations were consistent with increased capacity for NA release into BNST. More recently, similar results were reported with combined FSCV and optogenetic stimulation in mice, where repeated restraint stress also significantly decreased the sensitivity of BNST NA release to the  $\alpha_2$ -AR antagonist idazoxan (Schmidt et al., 2018). In another recent study, Deal and coworkers measured catecholamine efflux in BLA in response to electrical stimulation of LC (Deal et al., 2021). They did not find a reduced response to idazoxan, however, their recordings were made 5–7 days after the initial stressor (repeated social defeat or forced swim stress), which, as we show here, likely falls outside the transient window of  $\alpha_2$ -AR adaptation. They did, however, report two more important findings. Firstly, that catecholamine release in BLA in stressed, but not naïve, rats, was responsive to  $D_2$  antagonist raclopride, which the authors interpret in terms of an additional DA component. Secondly, that intraperitoneal administration of ethanol effectively reduced catecholamine efflux in BLA only in stressed, but not naïve subjects. Taken together, these data suggest that there are multiple adaptive changes in the joint DA-NA systems, possibly consisting of loss of  $\alpha_2$ -AR (and, perhaps, also  $D_2$ R) sensitivity, increased catecholaminergic neuron activity, and transmitter release accompanied by decreased uptake. These alterations could have different temporal windows – especially given other studies showing that increased NA release and hyperactivity persist for at least 7 days after stress, therefore lasting longer than the putative  $\alpha_2$ -AR adaptation (Borodovitsyna, Flamini, et al., 2018; Borodovitsyna, Joshi, et al., 2018; Ronzoni et al., 2016). In the context of the VTA, the implication is that for a limited time following a stressful experience, NA release into the VTA is likely potentiated, and thus the capacity of NA to modulate DA-ergic signaling is increased.

### 4.4 | Potential mechanisms of impaired $\alpha_2$ -AR regulation of NA efflux

While a loss in sensitivity at the  $\alpha_2$ -AR after stress exposure has been experimentally well demonstrated in both rats and mice (Fox et al., 2015; McElligott et al., 2013; Schmidt et al., 2019), the molecular mechanism underlying this change has not yet been proposed. Here, we began to address this by testing whether stress affects receptor expression. We performed western blotting for both  $\alpha_2$ -AR and  $D_2$  receptors with the use of BS<sup>3</sup> crosslinking to attempt to separate the membrane-bound and intracellular fractions. However, no differences in total expression or membrane trafficking of either of those proteins were found between naïve and stressed animals based on this assay.

The two dominant subtypes of  $\alpha_2$ -AR responsible for regulating NA release in the brain are  $\alpha_{2A}$  and  $\alpha_{2C}$  receptors, with  $\alpha_{2A}$  being characterized as the subtype predominantly involved in transmitter regulation in conditions of high activity (Gilsbach & Hein, 2012; Hein et al., 1999). Our finding that both the total and membrane-bound fractions of the  $\alpha_{2A}$  and  $D_2$  receptors remain unchanged after stress is in agreement with findings in amphetamine-treated mice, where sensitization to high levels of catecholamines was accompanied by unchanged  $\alpha_{2A}$  receptor binding in LC (Doucet et al., 2013). These data suggest that classical desensitization (receptor protein tagging by phosphorylation, followed by internalization) is not the predominant molecular pathway involved. Rather, it seems likely that changes in intracellular signaling, such as uncoupling from effector G proteins such as Ga1 and Ga2 (Doucet et al., 2013), or changes in interaction with other intracellular effectors, such as  $\beta$ -arrestin, could be implicated (Gilsbach & Hein, 2012). There is also the possibility that  $\alpha_{2A}$  interacts with other receptors, such as NMDA glutamate receptors, as this interaction has been shown to attenuate NMDA-dependent excitatory transmission in retinal ganglion cells (Dong et al., 2008). Uncoupling of  $\alpha_2$ -AR from such receptor–receptor interaction could be of relevance, as NMDA signaling is involved in driving LC activity, and at least some adaptations underlying drug sensitization are disrupted in the receptor subunit NR1 knockout mice – although here the picture is less clear due to potential compensatory changes in glutamate afferents in LC (Parkitna et al., 2012). It is also likely that  $D_2$  receptors undergo similar adaptive changes, i.e. uncoupling from their G protein effector pathways, as this has also been demonstrated (Nimitvilai et al., 2013, 2014; Robinson et al., 2017). Ultimately, however, these are speculations based on prior studies in different systems and further research will be required to understand the source of adaptations in autoreceptor control over NA release in the brain.

### 4.5 | Caveats and outlook

Our results strongly suggest that NA-ergic modulation of the VTA is altered in response to stress, pointing to a potential novel locus for stress-related alterations in the catecholamine system. Stress-related

adaptations in the catecholaminergic systems could be relevant for affective and drug use disorders (Belujon & Grace, 2017; Caccamise et al., 2021; Koob, 2021; Sofuoglu & Sewell, 2009). With  $\alpha_2$ -AR agonists being proposed for clinical use in the treatment of these disorders (Gowing et al., 2016; Sofuoglu et al., 2014; Upadhyay et al., 2021), a better understanding of neuroadaptations in the NA system across the brain could translate into future advances in treatment.

There are, however, several caveats and technical limitations which will need to be resolved before a firm conclusion is established. Firstly, the present study included only male rats. Similarly, prior studies showing reduced sensitivity at  $\alpha_2$ -ARs either used male subjects (Fox et al., 2015, 2017; McElligott et al., 2013), or used counterbalanced males and females, but did not report on sex differences in  $\alpha_2$ -AR signaling and NA uptake (Schmidt et al., 2019). While demanding, obtaining detailed information about male/female variations in NA regulation after stress would be advantageous, as both NA and corticotropin systems exhibit sex differences in animals (Cason et al., 2016; den Hartog et al., 2020), and there is strong evidence for sex and gender as important factors influencing mental health outcomes in the clinic (Koob, 2021; Upadhyay et al., 2021). Secondly, while FSCV measurements performed in anesthetized rats in combination with pharmacological tools have provided valuable insights into catecholamine signaling in VTA, NAc, BNST, and BLA (Deal et al., 2021; Kielbinski et al., 2019; Park et al., 2017; Schmidt et al., 2019), insights from other techniques should be used to confirm and extend these findings. With the advent of novel fluorescent sensors for both NA and DA (Patriarchi et al., 2018; Sun et al., 2020), which are compatible with in-vivo fiber photometry, differentiating between catecholamines released at a single site, which is a long-standing challenge for FSCV, could be made possible. This technique is also more suited for recording in freely moving, awake animals, allowing for both verification of findings obtained in an anesthetized preparation, as well as studying the impact of  $\alpha_2$ -AR alterations on behavior. Similarly, targeting select neuronal population for optogenetic manipulation could increase the specificity: while the role of the VTA-amygdala circuit in fear processing is well established (Jo et al., 2018; Luo et al., 2018; Tang et al., 2020), projections from neighboring areas, including A8 and A10 (Yetnikoff et al., 2014), could play a similar role, or, indeed, be recruited by electrical stimulation of the VTA. Finally, longer-term goals would include bringing these techniques together with the aim of clarifying the stress-related mechanisms responsible for ostensible  $\alpha_2$ -AR desensitization and establishing the relations between changes in NA transmission found in the VTA, BLA, BNST, and possibly other loci.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

MK and JB planned and performed FSCV experiments, analyzed and presented the data and wrote the manuscript, JB and KZ performed behavioral procedures, JB and W-BA performed western blotting experiments, MM supervised western blotting experiments, reviewed and edited the manuscript, RP conceptualized, reviewed, and edited the manuscript; WS acquired funding, conceptualized,

managed and supervised the projects as well as reviewed and edited the manuscript.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Polish National Science Center Research grant UMO-2018/29/B/NZ7/02672 awarded to WBS as well as statutory funds of the Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, contributed by MM. The authors declare no conflicts of interest. Figure 1 and graphical abstract were created with BioRender.com.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data available on request from the authors.

#### ORCID

Wojciech Solecki  <https://orcid.org/0000-0002-0473-5472>

#### REFERENCES

- Arencibia-Albite, F., Paladini, C., Williams, J. T., & Jiménez-Rivera, C. A. (2007). Noradrenergic modulation of the hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 149, 303–314.
- Aston-Jones, G., & Harris, G. C. (2004). Brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. *Neuropharmacology*, 47, 167–179.
- Baik, J.-H. (2020). Stress and the dopaminergic reward system. *Experimental & Molecular Medicine*, 52, 1879–1890.
- Bator, E., Latusz, J., Głowacka, U., Radaszkiewicz, A., Mudlaff, K., & Maćkowiak, M. (2018). Adolescent social isolation affects schizophrenia-like behavior in the MAM-E17 model of schizophrenia. *Neurotoxicity Research*, 34, 305–323.
- Beier, K. T., Steinberg, E. E., DeLoach, K. E., Xie, S., Miyamichi, K., Schwarz, L., Gao, X. J., Kremer, E. J., Malenka, R. C., & Luo, L. (2015). Circuit architecture of VTA dopamine neurons revealed by systematic input-output mapping. *Cell*, 162, 622–634.
- Belujon, P., & Grace, A. A. (2017). Dopamine system dysregulation in major depressive disorders. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 20, 1036–1046.
- Borodovitsyna, O., Flamini, M. D., & Chandler, D. J. (2018). Acute stress persistently alters locus coeruleus function and anxiety-like behavior in adolescent rats. *Neuroscience*, 373, 7–19.
- Borodovitsyna, O., Joshi, N., & Chandler, D. (2018). Persistent stress-induced neuroplastic changes in the locus coeruleus/norepinephrine system. *Neural Plasticity*, 2018, 1–14.
- Boudreau, A. C., Milovanovic, M., Conrad, K. L., Nelson, C., Ferrario, C. R., & Wolf, M. E. (2012). A protein cross-linking assay for UNIT 5.30 measuring cell surface expression of glutamate receptor subunits in the rodent brain after in vivo treatments.
- Boudreau, A. C., & Wolf, M. E. (2005). Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus Accumbens. *The Journal of Neuroscience*, 25, 9144–9151.
- Bucher, E. S., Brooks, K., Verber, M. D., Keithley, R. B., Owesson-White, C., Carroll, S., Takmakov, P., McKinney, C. J., & Wightman, R. M. (2013). Flexible software platform for fast-scan cyclic voltammetry data acquisition and analysis. *Analytical Chemistry*, 85, 10344–10353.



- Caccamise, A., Newenhizen, E. V., & Mantsch, J. R. (2021). *Neurochemical mechanisms and neurocircuitry underlying the contribution of stress to cocaine seeking*. John Wiley and Sons Inc.
- Cason, A. M., Kohtz, A., & Aston-Jones, G. (2016). Role of corticotropin releasing factor 1 signaling in cocaine seeking during early extinction in female and male rats. *PLoS One*, *11*, 1–12.
- Chocyk, A., Bobula, B., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher-Maślanka, I., Hess, G., & Wedzony, K. (2013). Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *The European Journal of Neuroscience*, *38*, 2089–2107.
- Daviu, N., Bruchas, M. R., Moghaddam, B., Sandi, C., & Beyeler, A. (2019). Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiology of Stress*, *11*, 100191.
- de la Mora, M. P., Gallegos-Cari, A., Arizmendi-García, Y., Marcellino, D., & Fuxe, K. (2010). Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in Neurobiology*, *90*, 198–216.
- Deal, A. L., Park, J., Weiner, J. L., & Budygin, E. A. (2021). Stress alters the effect of alcohol on catecholamine dynamics in the basolateral amygdala. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *15*, 1–10.
- den Hartog, C. R., Blandino, K. L., Nash, M. K. L., Sjogren, E. R., Grampetro, M. A., Moorman, D. E., & Vazey, E. M. (2020). Noradrenergic tone mediates marble burying behavior after chronic stress and ethanol. *Psychopharmacology*, *237*, 3021–3031.
- Dong, C. J., Guo, Y., Agey, P., Wheeler, L., & Hare, W. A. (2008).  $\alpha 2$  adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *49*, 4515–4522.
- Doucet, E. L., Bobadilla, A. C., Houades, V., Lanteri, C., Godeheu, G., Lanfumey, L., Sara, S. J., & Tassin, J. P. (2013). Sustained impairment of  $\alpha 2A$ -adrenergic autoreceptor signaling mediates neurochemical and behavioral sensitization to amphetamine. *Biological Psychiatry*, *74*, 90–98.
- Douma, E. H., & de Kloet, E. R. (2020). Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *108*, 48–77.
- Field, K. J., White, W. J., & Lang, C. M. (1993). Anaesthetic effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats. *Laboratory Animals*, *27*, 258–269.
- Fox, M. E., Rodeberg, N. T., & Wightman, R. M. (2017). Reciprocal catecholamine changes during opiate exposure and withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, *42*, 671–681.
- Fox, M. E., Studebaker, R. I., Swofford, N. J., & Wightman, R. M. (2015). Stress and drug dependence differentially modulate norepinephrine signaling in animals with varied HPA axis function. *Neuropsychopharmacology*, *40*, 1752–1761.
- Garris, P. A., Wightman, R. M., Hill, C., & Carolina, N. (1994). Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: An in vivo voltammetric study. *The Journal of Neuroscience*, *14*, 442–450.
- Gilsbach, R., & Hein, L. (2012). Are the pharmacology and physiology of  $\alpha 2$  adrenoceptors determined by  $\alpha 2$ -heteroreceptors and autoreceptors respectively? *British Journal of Pharmacology*, *165*, 90–102.
- Giustino, T. F., & Maren, S. (2018). Noradrenergic modulation of fear conditioning and extinction. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*, 1–20.
- Goertz, R. B., Wanat, M. J., Gomez, J. A., Brown, Z. J., Phillips, P. E., & Paladini, C. A. (2015). Cocaine increases dopaminergic neuron and motor activity via midbrain  $\alpha 1$  adrenergic signaling. *Neuropsychopharmacology*, *40*, 1151–1162.
- Gowing, L., Farrell, M., Ali, R., & White, J. M. (2016). *Alpha2-adrenergic agonists for the management of opioid withdrawal*. The Cochrane Database of Systematic Reviews.
- Grenhoff, J., North, R. A., & Johnson, S. W. (1995).  $\alpha 1$ -adrenergic effects on dopamine neurons recorded intracellularly in the rat midbrain slice. *The European Journal of Neuroscience*, *7*, 1707–1713.
- Guiard, B. P., Mansari, M. E., & Blier, P. (2008). Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus ceruleus, and dorsal hippocampus. *Molecular Pharmacology*, *74*, 1463–1475.
- Haubrich, J., Bernabo, M., & Nader, K. (2020). Noradrenergic projections from the locus coeruleus to the amygdala constrain fear memory reconsolidation. *eLife*, *9*, 1–29.
- Hein, L., Altman, J. D., & Kobilka, B. K. (1999). Two functionally distinct  $\alpha 2$ -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*, *402*, 181–184.
- Holloway, Z. R., Freels, T. G., Comstock, J. F., Nolen, H. G., Sable, H. J., & Lester, D. B. (2019). Comparing phasic dopamine dynamics in the striatum, nucleus accumbens, amygdala, and medial prefrontal cortex. *Synapse*, *73*, 1–15.
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, *517*, 284–292.
- Jo, Y. S., Heymann, G., & Zweifel, L. S. (2018). Dopamine neurons reflect the uncertainty in fear generalization. *Neuron*, *100*, 916–925.e3.
- Keithley, R. B., & Wightman, R. M. (2011). Assessing principal component regression prediction of neurochemicals detected with fast-scan cyclic voltammetry. *ACS Chemical Neuroscience*, *2*, 514–525.
- Kielbinski, M., Bernacka, J., & Solecki, W. B. (2019). Differential regulation of phasic dopamine release in the forebrain by the VTA noradrenergic receptor signaling. *Journal of Neurochemistry*, *149*, 747–759.
- Koob, G. F. (2014). Neurocircuitry of alcohol addiction. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 125, pp. 33–54). Elsevier B.V.
- Koob, G. F. (2021). Drug addiction: Hyperkatifeia/negative reinforcement as a framework for medications development. *Pharmacological Reviews*, *73*, 163–201.
- Koob, G. F., Buck, C. L., Cohen, A., Edwards, S., Park, P. E., Schlosburg, J. E., Schmeichel, B., Vendruscolo, L. F., Wade, C. L., Whitfield, T. W., Jr., & George, O. (2014). Addiction as a stress surfeit disorder. *Neuropharmacology*, *76*, 370–382.
- Kwon, O. B., Lee, J. H., Kim, H. J., Lee, S., Lee, S., Jeong, M. J., Kim, S. J., et al. (2015). Dopamine regulation of amygdala inhibitory circuits for expression of learned fear. *Neuron*, *88*, 378–389.
- Lee, J. H., Lee, S., & Kim, J. H. (2017). *Amygdala circuits for fear memory: A key role for dopamine regulation*. SAGE Publications Inc.
- Luo, R., Uematsu, A., Weitemier, A., Aquili, L., Koivumaa, J., McHugh, T. J., & Johansen, J. P. (2018). A dopaminergic switch for fear to safety transitions. *Nature Communications*, *9*, 1–11.
- McCall, J. G., Al-Hasani, R., Siuda, E. R., Hong, D. Y., Norris, A. J., Ford, C. P., & Bruchas, M. R. (2015). CRH engagement of the locus coeruleus noradrenergic system mediates stress-induced anxiety. *Neuron*, *87*, 605–620.
- McCall, J. G., Siuda, E. R., Bhatti, D. L., Lawson, L. A., McElligott, Z. A., Stuber, G. D., & Bruchas, M. R. (2017). Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior. *eLife*, *6*, 1–23.
- McElligott, Z. A., Fox, M. E., Walsh, P. L., Urban, D. J., Ferrel, M. S., Roth, B. L., & Wightman, R. M. (2013). Noradrenergic synaptic function in the bed nucleus of the stria terminalis varies in animal models of anxiety and addiction. *Neuropsychopharmacology*, *38*, 1665–1673.
- Mejias-Aponte, C. A. (2016). Specificity and impact of adrenergic projections to the midbrain dopamine system. *Brain Research*, *1641*, 258–273.
- Mejias-Aponte, C. A., Drouin, C., & Aston-Jones, G. (2009). Adrenergic and noradrenergic innervation of the midbrain ventral tegmental area and retrorubral field: Prominent inputs from medullary homeostatic centers. *The Journal of Neuroscience*, *29*, 3613–3626.
- Morilak, D. A., Barrera, G., Echevarria, D. J., Garcia, A. S., Hernandez, A., Ma, S., & Petre, C. O. (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *29*, 1214–1224.
- Nimitvilai, S., Herman, M., You, C., Arora, D. S., McElvain, M. A., Roberto, M., & Brodie, M. S. (2014). Dopamine D2 receptor desensitization

- by dopamine or corticotropin releasing factor in ventral tegmental area neurons is associated with increased glutamate release. *Neuropharmacology*, 82, 28–40.
- Nimitvilai, S., McElvain, M. A., & Brodie, M. S. (2013). Reversal of dopamine D2 agonist-induced inhibition of ventral tegmental area neurons by Gq-linked neurotransmitters is dependent on protein kinase C, G protein-coupled receptor kinase, and dynamin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 344, 253–263.
- Paladini, C. A., Fiorillo, C. D., Morikawa, H., & Williams, J. T. (2001). Amphetamine selectively blocks inhibitory glutamate transmission in dopamine neurons. *Nature Neuroscience*, 4, 275–281.
- Park, J. W., Bhimani, R. V., & Park, J. (2017). Noradrenergic modulation of dopamine transmission evoked by electrical stimulation of the locus coeruleus in the rat brain. *ACS Chemical Neuroscience*, 8, 1913–1924.
- Parkitna, J. R., Solecki, W., Gotembowska, K., Tokarski, K., Kubik, J., Gołda, S., Novak, M., Parlato, R., Hess, G., Sprengel, R., & Przewłocki, R. (2012). Glutamate input to noradrenergic neurons plays an essential role in the development of morphine dependence and psychomotor sensitization. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15, 1457–1471.
- Patriarchi, T., Cho, J. R., Merten, K., Howe, M. W., Marley, A., Xiong, W. H., Folk, R. W., Broussard, G. J., Liang, R., Jang, M. J., Zhong, H., Dombeck, D., von Zastrow, M., Nimmerjahn, A., Gradinaru, V., Williams, J. T., & Tian, L. (2018). Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science*, 360(6396), eaat4422.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2013). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam Academic Press.
- Poulin, J.-F., Caronia, G., Hofer, C., Cui, Q., Helm, B., Ramakrishnan, C., Chan, C. S., Dombeck, D. A., Deisseroth, K., & Awatramani, R. (2018). Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nature Neuroscience*, 21, 1260–1271.
- Robinson, B. G., Bunzow, J. R., Grimm, J. B., Lavis, L. D., Dudman, J. T., Brown, J., Neve, K. A., & Williams, J. T. (2017). Desensitized D2 autoreceptors are resistant to trafficking. *Scientific Reports*, 7, 1–14.
- Rodeberg, N. T., Johnson, J. A., Cameron, C. M., Saddoris, M. P., Carelli, R. M., & Wightman, R. M. (2015). Construction of training sets for valid calibration of in vivo cyclic voltammetric data by principal component analysis. *Analytical Chemistry*, 87, 11484–11491.
- Ronzoni, G., del Arco, A., Mora, F., & Segovia, G. (2016). Enhanced noradrenergic activity in the amygdala contributes to hyperarousal in an animal model of PTSD. *Psychoneuroendocrinology*, 70, 1–9.
- Sánchez-Soto, M., Bonifazi, A., Cai, N. S., Ellenberger, M. P., Newman, A. H., Ferré, S., & Yano, H. (2016). Evidence for noncanonical neurotransmitter activation: Norepinephrine as a dopamine D2-like receptor agonist. *Molecular Pharmacology*, 89, 457–466.
- Schmidt, K. T., Makhijani, V. H., Boyt, K. M., Cogan, E. S., Pati, D., Pina, M. M., Bravo, I. M., Locke, J. L., Jones, S. R., Besheer, J., & McElligott, Z. A. (2019). Stress-induced alterations of norepinephrine release in the bed nucleus of the stria terminalis of mice. *ACS Chemical Neuroscience*, 10, 1908–1914.
- Schmidt, K. T., Makhijani, V. H., Boyt, K. M., Cogan, E. S., Pati, D., Pina, M. M., Bravo, I. M., et al. (2018). *Stress-induced alterations of norepinephrine release in the bed nucleus of the stria terminalis of mice*. ACS Chemical Neuroscience.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671–675.
- Schwarz, L. A., & Luo, L. (2015). Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Current Biology*, 25, R1051–R1056.
- Sharp, B. M. (2017). Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction. *Translational Psychiatry*, 7, e1194.
- Shnitko, T. A., & Robinson, D. L. (2014). Anatomical and pharmacological characterization of catecholamine transients in the medial prefrontal cortex evoked by ventral tegmental area stimulation. *Synapse*, 68, 131–143.
- Smith, R. J., & Aston-Jones, G. (2008). Noradrenergic transmission in the extended amygdala: Role in increased drug-seeking and relapse during protracted drug abstinence. *Brain Structure & Function*, 213, 43–61.
- Sofuoglu, M., Rosenheck, R., & Petrakis, I. (2014). Pharmacological treatment of comorbid PTSD and substance use disorder: Recent progress. *Addictive Behaviors*, 39, 428–433.
- Sofuoglu, M., & Sewell, R. A. (2009). Norepinephrine and stimulant addiction. *Addiction Biology*, 14, 119–129.
- Solecki, W. B., Kielbinski, M., Karwowska, K., Zajda, K., Wilczkowski, M., Rajfur, Z., & Przewłocki, R. (2019). Alpha 1-adrenergic receptor blockade in the ventral tegmental area modulates conditional stimulus-induced cocaine seeking. *Neuropharmacology*, 158, 107680.
- Solecki, W. B., Szklarczyk, K., Klasa, A., Pradel, K., Dobrzański, G., & Przewłocki, R. (2017). Alpha 1-adrenergic receptor blockade in the VTA modulates fear memories and stress responses. *European Neuropsychopharmacology*, 27, 782–794.
- Solecki, W. B., Szklarczyk, K., Pradel, K., Kwiatkowska, K., Dobrzański, G., & Przewłocki, R. (2018). Noradrenergic signaling in the VTA modulates cocaine craving. *Addiction Biology*, 23, 596–609.
- Stubbendorff, C., & Stevenson, C. W. (2021). Dopamine regulation of contextual fear and associated neural circuit function. *The European Journal of Neuroscience*, 54, 6933–6947.
- Sun, F., Zhou, J., Dai, B., Qian, T., Zeng, J., Li, X., Zhuo, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Qian, C., Tan, K., Feng, J., Dong, H., Lin, D., Cui, G., & Li, Y. (2020). Next-generation GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity in vivo. *Nature Methods*, 17, 1156–1166.
- Tang, W., Kochubey, O., Kintscher, M., & Schneggenburger, R. (2020). A VTA to basal amygdala dopamine projection contributes to signal salient somatosensory events during fear learning. *The Journal of Neuroscience*, 40, 3969–3980.
- Tovar-Díaz, J., Pomrenze, M. B., Kan, R., Pahlavan, B., & Morikawa, H. (2018). Cooperative CRF and  $\alpha 1$  adrenergic signaling in the VTA promotes NMDA plasticity and drives social stress enhancement of cocaine conditioning. *Cell Reports*, 22, 2601–2614.
- Upadhyay, J., Verrico, C. D., Cay, M., Kodele, S., Yammine, L., Koob, G. F., & Schreiber, R. (2021). Neurocircuitry basis of the opioid use disorder–post-traumatic stress disorder comorbid state: Conceptual analyses using a dimensional framework. *The Lancet Psychiatry*, 0366, 1–13.
- Velásquez-Martínez, M. C., Santos-Vera, B., Velez-Hernandez, M. E., Vázquez-Torres, R., & Jiménez-Rivera, C. A. (2020). Alpha-1 adrenergic receptors modulate glutamate and GABA neurotransmission onto ventral tegmental dopamine neurons during cocaine sensitization. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 790.
- Velásquez-Martínez, M. C., Vázquez-Torres, R., & Jiménez-Rivera, C. A. (2012). Activation of alpha1-adrenoceptors enhances glutamate release onto ventral tegmental area dopamine cells. *Neuroscience*, 216, 18–30.
- Velásquez-Martínez, M. C., Vázquez-Torres, R., Rojas, L. V., Sanabria, P., & Jiménez-Rivera, C. A. (2015). Alpha-1 adrenoceptors modulate GABA release onto ventral tegmental area dopamine neurons. *Neuropharmacology*, 88, 110–121.
- Wickham, R., Solecki, W., Rathbun, L., McIntosh, J. M., & Addy, N. A. (2013). Ventral tegmental area  $\alpha 6\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors modulate phasic dopamine release in the nucleus accumbens core. *Psychopharmacology*, 229, 73–82.
- Williams, M. A., Li, C., Kash, T. L., Matthews, R. T., & Winder, D. G. (2014). Excitatory drive onto dopaminergic neurons in the rostral linear nucleus is enhanced by norepinephrine in an  $\alpha 1$  adrenergic receptor-dependent manner. *Neuropharmacology*, 86, 116–124.

Yetnikoff, L., Lavezzi, H. N., Reichard, R. A., & Zahm, D. S. (2014). An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience*, 282, 23–48.

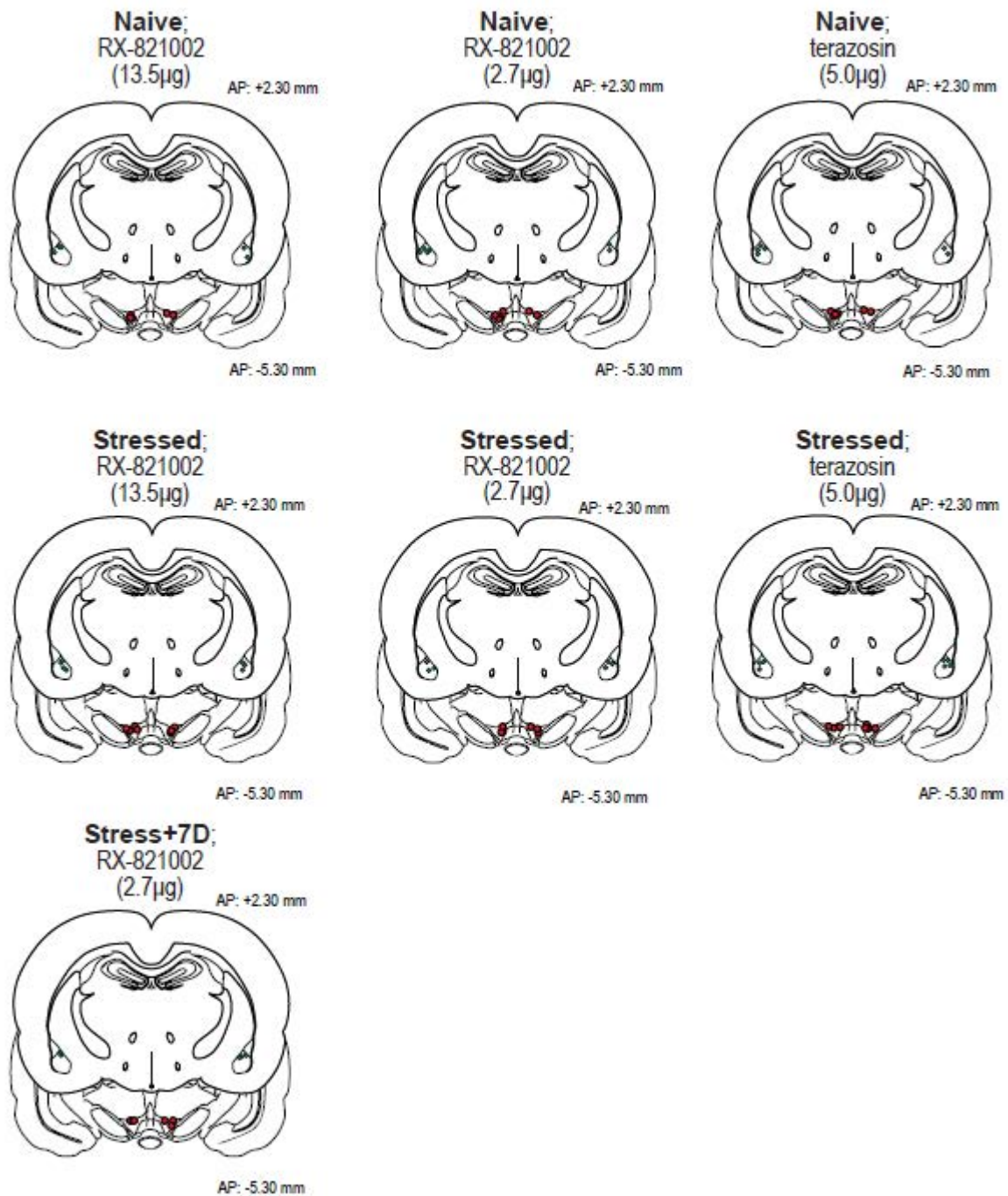
### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Kielbinski, M., Bernacka, J., Zajda, K., Wawrzczak-Bargieła, A., Maćkowiak, M., Przewlocki, R., & Solecki, W. (2022). Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit. *Journal of Neurochemistry*, 00, 1–15. <https://doi.org/10.1111/jnc.15698>

## Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit

Kielbinski, Michal; Bernacka, Joanna; Zajda, Katarzyna; Wawrzczak-Bargieła, Agnieszka; Maćkowiak, Marzena; Przewlocki, Ryszard; Solecki, Wojciech



**Supp. Fig. 1.** Verification of recording and stimulation sites, with schematic coronal sections from the brain atlas (Paxinos and Watson, 2013), showing stimulation (red) and recording (green) sites.



## INSIGHTS

# Functional significance of dopamine release in the mesolimbic forebrain by modulation of adrenergic receptors



Joanna Bernacka<sup>a,b</sup>, Wojciech B. Solecki<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Neurobiology and Neuropsychology, Institute of Applied Psychology, Jagiellonian University, 4 Lojasiewicza Street, Krakow 30-348, Poland

<sup>b</sup>Department of Pharmacology, Laboratory of Pharmacology and Brain Biostructure, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, Smetna Street 12, Krakow 31-343, Poland

Received 13 June 2023; received in revised form 28 June 2023; accepted 29 June 2023

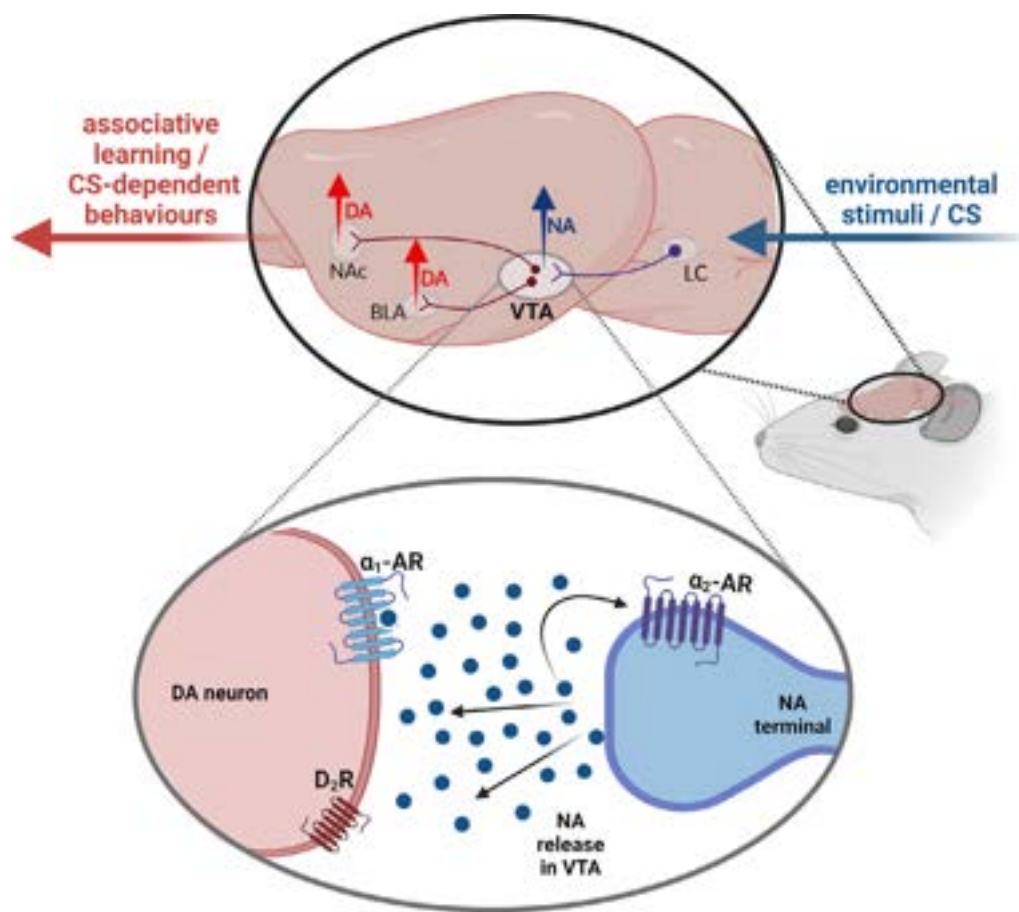
Dopamine (DA) release from the ventral tegmental area (VTA) plays an important role in the brain's reward system, which vary depending on the pattern of DAergic cells activity and DA release in the forebrain. Tonic DA release maintains low levels of the neurotransmitter, whereas phasic DA release (which results from burst firing of DAergic neurons) arises rapidly in large volumes in response to significant environmental stimuli and requires dynamic and complex regulation for heterogeneous behavioral functionality. Indeed, phasic DA release in the nucleus accumbens (NAc), amygdala (AMY), and prefrontal cortex (PFC) regulates numerous functions of the brain reward system such as associative learning, memory formation, effort, motivation, attention, and expression of conditioned behaviors. Accordingly, VTA activity is modulated by many neurotransmitter systems (e.g. glutamatergic, GABAergic, cholinergic), including the noradrenergic system. DAergic and noradrenergic systems exhibit similarities such as neuronal projections, biochemical synthesis, time scales of neurotransmitter activity, and receptor affinity. DAergic and noradrenergic activity increases in response to salient environmental stimuli to mediate similar behavioral functions (e.g. atten-

tion, arousal). Such activity is suggested to be pivotal in encoding the relevance of a stimulus (encompassing its novelty/salience/reward value), and determining whether or not an episode of salient stimulus exposition is consolidated as a long-term memory trace. However, the overlapping involvement of those catecholamines and their specific contributions in behavioral functions remain obscure. Recently, we demonstrated that noradrenergic activity in the VTA acts as a modulator of its neuronal activity and phasic DA release in the forebrain to achieve behavioral control.

Noradrenergic innervation of the VTA comes mainly from the locus coeruleus (LC), while notable noradrenergic projections also come from brainstem areas A1 and A2 (Mejias-Aponte, 2016; Solecki et al., 2019, 2022a). All types of adrenergic receptors (ARs) are present in the VTA:  $\alpha_1$ -ARs - mainly on DAergic cell bodies (but also partly on GABAergic interneurons and astrocytes as well as VTA inputs) and  $\alpha_2$ -ARs - acting mainly as autoreceptors at noradrenergic terminals (Kielbinski et al., 2019; Solecki et al., 2019). There is also some evidence of  $\beta$ -ARs on DAergic and non-DAergic cells in the VTA (for review see: Mejias-Aponte 2016). Studies on the impact of noradrenaline (NA) on DAergic cell activity in the VTA date back to the 1970s. Using electrophysiological and electrochemical methods, it has been shown, both with pharmacological manipulation of adrenergic receptors and by stimulating the LC, that the NAer-

\* Corresponding author.

E-mail address: [wojciech.solecki@uj.edu.pl](mailto:wojciech.solecki@uj.edu.pl) (W.B. Solecki).



**Fig. 1** Phasic dopamine (DA) release in the nucleus accumbens (NAc) and basolateral amygdala (BLA) is modulated by noradrenaline (NA) and  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenergic receptor (AR) activity in the ventral tegmental area to facilitate associative learning and CS-dependent behaviors. Figure was created with BioRender.com.

gic system modulates the activity of DAergic neurons and DA release. Systemic, pharmacological  $\alpha_1$ -ARs blockade decreases, whereas  $\alpha_2$ -ARs blockade increases the burst firing of the VTA DAergic neurons. Locally, within the VTA, NA can either inhibit DAergic neuronal activity through DA  $D_2$ R and  $\alpha_2$ -ARs-dependent mechanisms or increase firing rate and burst firing of the DA neurons via  $\alpha_1$ -ARs (for review see: [Mejias-Aponte 2016](#)). Accordingly, electric stimulation of the LC leads to phasic NA release in the VTA which, via the activation of VTA  $\alpha_1$ -ARs, induces phasic DA release at terminals ([Park et al., 2017](#)). In contrast, intra-VTA iontophoretic administration of  $\alpha_1$ -AR agonist in the absence of electrical stimulation of the LC leads to an increase in GABAergic but a decrease in DAergic activity, indicating more complex role of AR in the VTA ([Pradel et al., 2018](#)). We also demonstrated that NAergic modulation of the VTA neuronal activity particularly affects phasic but not tonic DA release in the structures of mesolimbic (e.g. NAc, basolateral amygdala; BLA) but not mesocortical (e.g. mPFC) DA system. Interestingly, blockade of  $\alpha_2$ -ARs in the VTA resulted in almost complete inhibition of phasic DA release into the NAc - an effect dependent on DA  $D_2$ R activity ([Kielbinski et al., 2019](#)). Based on those reports, we hypothesized that NAergic signaling in the VTA regulates its neuronal activity principally via  $\alpha_1$ -AR to enhance neuronal gain, whereas lo-

cal  $\alpha_2$ -ARs control NAergic tone. The consequence of NA-dependent neural gain in the VTA is that salient signals are encoded by the  $\alpha_1$ -AR-regulated physiological state of VTA inputs (e.g., increased activity of excitatory vs inhibitory inputs) and DAergic neurons activity, sufficiently modulating DA release in the forebrain. Such NAergic regulation of the VTA activity follows the inverted U shape relationship with a crucial role of  $\alpha_2$ -autoreceptors as substantial increase in NA levels could effectively inhibits DAergic activity ([Kielbinski et al., 2019](#)).

Such role of ARs in VTA is supported by our preclinical behavioral studies. First, we demonstrated that intra-VTA pharmacological blockade of  $\alpha_1$ -AR impairs acquisition of Pavlovian associative learning both with positive and negative outcomes ([Solecki et al., 2017, 2022a](#)) suggesting that activity of those ARs in VTA promotes proper and sustained pairings of conditioned stimulus (CS) with unconditioned stimulus (US), irrespective of its hedonic value. Indeed, intra-VTA  $\alpha_1$ -AR blockade attenuates acquisition of fear memories in fear conditioning and cocaine-induced conditioned place preference signifying  $\alpha_1$ -AR's role as a facilitator of Pavlovian associative learning. Next, we showed intra-VTA NAergic regulation of conditioned behaviors such as CS-induced freezing during retrieval of fear memory ([Solecki et al., 2017](#)), CS-induced cocaine craving in co-

caine seeking under extinction conditions, and CS-induced reinstatement of cocaine seeking (Solecki et al., 2018, 2019). In particular, we demonstrated that intra-VTA  $\alpha_1$ -AR blockade attenuates these behaviors, whereas intra-VTA agonist administration facilitate conditioned drug seeking (Solecki et al., 2018). Our pharmacological studies also confirm hypothesized role of the  $\alpha_2$ -AR in the VTA as autoreceptors, as intra-VTA antagonist microinfusion increased cocaine seeking, an effect blocked by concomitant intra-VTA  $\alpha_1$ -AR blockade (Solecki et al., 2018). Finally, optogenetic inhibition of the LC NAergic inputs in the VTA attenuates cocaine seeking but only when delivered non-contingently with instrumental responses. In contrast, contingent inhibition increased, while contingent stimulation reduced cocaine seeking, effectively modulating rate of within-session extinction learning (Solecki et al., 2022b).

Together these results signify that NAergic signaling in the VTA, potentially via the mechanism of neuronal gain, encodes salience of environmental stimuli to facilitate new learning and modulate CS-induced behaviors (Fig. 1). Such effects reflect an ability of alerting/orienting functions, originating from bottom-up information processing and interactions of catecholaminergic systems in the VTA, to effectively guide present and future behaviors.

Such mechanistic insight into the neurophysiology of salience detection has potential translational value for a clinical public and may enable the development of innovative pharmacotherapy of trauma/stress-related disorders and SUD. Previous clinical studies showed that several AR ligands alleviate PTSD symptoms as well as drug craving in humans (e.g. Shorter et al. 2013), indicating the utility of pharmacological manipulation of NAergic signaling in patients but lacking clear evidence of the locus of the relevant brain mechanisms. Here, we posit that the clinical utility of AR ligands (in particular in patients with CS-related symptoms - retrieval of trauma-related memories, drug craving) may depend on their effectiveness to modulate CS-induced mesolimbic DAergic activity.

## Role of the funding source

This work was supported by the Polish National Science Center (research grant UMO- 2018/29/B/NZ7/02672 to WS). The Polish National Science Center had no further role in the writing of the report and in the decision to submit the paper for publication.

## Author contributions

JB wrote parts of the manuscript, designed and created the figure. WBS designed the manuscript and wrote parts of the

manuscript. Both authors contributed to and have approved the final manuscript.

## conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Kielbinski, M., Bernacka, J., Solecki, W.B., 2019. Differential regulation of phasic dopamine release in the forebrain by the VTA noradrenergic receptor signaling. *J. Neurochem.* 149. doi:10.1111/jnc.14706.
- Mejias-Aponte, C.A., 2016. Specificity and impact of adrenergic projections to the midbrain dopamine system. *Brain Res.* 1641, 258–273. doi:10.1016/j.brainres.2016.01.036.
- Park, J.W., Bhimani, R.V., Park, J., 2017. Noradrenergic modulation of dopamine transmission evoked by electrical stimulation of the locus coeruleus in the rat brain. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 1913–1924. doi:10.1021/acscchemneuro.7b00078.
- Pradel, K., Blasiak, T., Solecki, W.B., 2018. Adrenergic receptor agonists' modulation of dopaminergic and non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 375, 119–134. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.11.002.
- Shorter, D., Lindsay, J.A., Kosten, T.R., 2013. The alpha-1 adrenergic antagonist doxazosin for treatment of cocaine dependence: a pilot study. *Drug Alcohol Depend* 131, 66–70.
- Solecki, W.B., Kielbinski, M., Bernacka, J., Gralac, K., Klasa, A., Pradel, K., et al., 2022a. Alpha1-adrenergic receptor blockade in the ventral tegmental area attenuates acquisition of cocaine-induced pavlovian associative learning. *Front. Behav. Neurosci.* 0, 319. doi:10.3389/FNBEH.2022.969104.
- Solecki, W.B., Kielbinski, M., Karwowska, K., Zajda, K., Wilczkowski, M., Rajfur, Z., et al., 2019. Alpha1-adrenergic receptor blockade in the ventral tegmental area modulates conditional stimulus-induced cocaine seeking. *Neuropharmacology* 158, 107680. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.107680.
- Solecki, W.B., Kielbinski, M., Wilczkowski, M., Zajda, K., Karwowska, K., Bernacka, J., et al., 2022b. Regulation of cocaine seeking behavior by locus coeruleus noradrenergic activity in the ventral tegmental area is time- and contingency-dependent. *Front. Neurosci.* 16. doi:10.3389/FNINS.2022.967969/FULL.
- Solecki, W.B., Szklarczyk, K., Klasa, A., Pradel, K., Dobrzański, G., Przewłocki, R., 2017. Alpha 1 -adrenergic receptor blockade in the VTA modulates fear memories and stress responses. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27, 782–794. doi:10.1016/j.euroneuro.2017.05.008.
- Solecki, W.B., Szklarczyk, K., Pradel, K., Kwiatkowska, K., Dobrzański, G., Przewłocki, R., 2018. Noradrenergic signaling in the VTA modulates cocaine craving. *Addict. Biol.* 23, 596–609. doi:10.1111/adb.12514.

# Badania dodatkowe

## 1. Blokada receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych w polu brzusznej nakrywki zaburza nabywanie, ale nie przywołanie pamięci stachu<sup>1</sup>

### Materiały i Metody

#### 1. Zwierzęta

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono na samcach szczurów szczepu Sprague Dawley ważących ~300g w czasie rozpoczęcia procedur. Zwierzęta były hodowane w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego (Kraków, Polska) w dwunastogodzinnym trybie dnia i nocy (światło o 7. rano) w pomieszczeniu z kontrolowaną temperaturą (~22°C) i wilgotnością (~40%), z nieograniczonym dostępem do jedzenia i wody. Protokoły eksperymentalne zostały zatwierdzone przez Komitet ds. Dobrostanu Zwierząt Laboratoryjnych oraz Lokalną Komisję Etyczną Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, Kraków, Polska nr. 224/2019.

#### 2. Użyte substancje

RX-821002 (antagonista receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, 2.7  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$  lub 13.5  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ ; końcowe stężenie 23,06 mM i 115,26 mM; kat. n. 1324, Tocris Bioscience, Wielka Brytania) został rozpuszczony w sterylnym 0.9% roztworze soli fizjologicznej i podawany w łącznej objętości 0.5  $\mu\text{l}$  za pomocą mikropompy (53127V, Stoelting Europe, Irlandia) ze strzykawką 10  $\mu\text{l}$  (26s ga, Hamilton 701N). Podanie substancji do struktury przeprowadzono przez 1 min, a następnie wewnętrzna kaniula podająca pozostawała w miejscu iniekcji przez kolejną 1 min, w celu całkowitej dyfuzji substancji do tkanki. Stosowane dawki wybrano na podstawie wcześniejszych badań (Kielbiński et al., 2019, 2022).

#### 3. Implantacje kaniul prowadzących do VTA

Szczury znieczulane były poprzez podanie roztworu ketaminy HCl (100 mg/kg, i.m., Biowet-Pulawy, Polska) i ksylazyny (10 mg/kg, i.m., Biowet-Pulawy, Polska), a następnie

---

<sup>1</sup> Opisane badania zostały zebrane w publikacji naukowej wysłanej do recenzji w czasopiśmie *Pharmacological Reports*

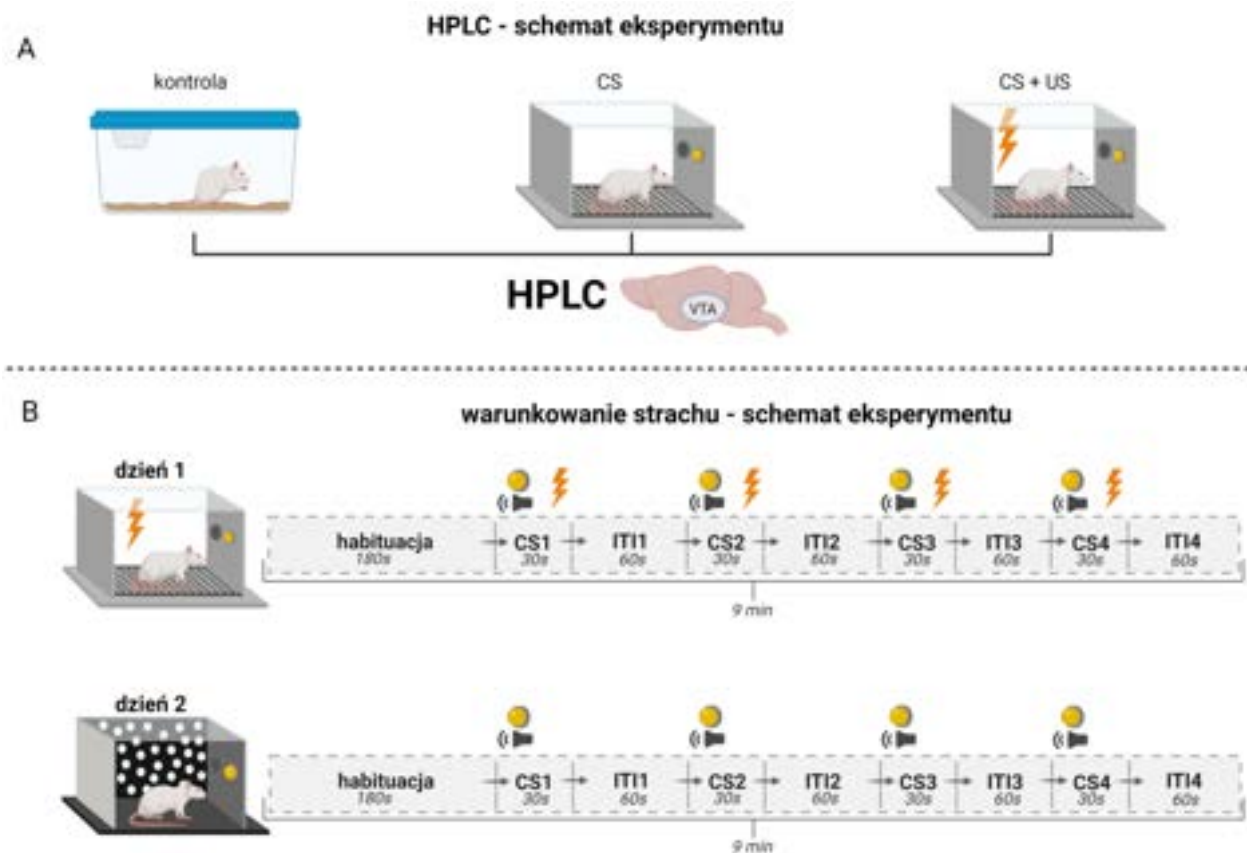


umieszczane na stoliku stereotaktycznym (Stoelting Europe, Irlandia) w celu implantacji kaniul domózgowych. Współrzędne operacji zostały ustalone na podstawie atlasu mózgu szczura (Paxinos & Watson, 2013), z pozycjami *anteroposterior* (AP), *mediolateral* (ML) i *dorsoventral* (DV) odniesionymi do bregmy. Podwójne kaniule prowadzące do mikropodań (Plastics One, Roanoke, VA, USA) zostały umieszczone w VTA według współrzędnych AP - 5.3, ML  $\pm$  0.5, DV -7.8. W celu zabezpieczenia kaniul w czaszce zostały zamontowane 4 śruby kotwiczące (Agnthos, Szwecja), a następnie cała struktura została ustabilizowana cementem dentystycznym (Duracryl, SpofaDental, Czechy). Po operacji zwierzęta otrzymywały lek przeciwwzapalny i przeciwbólowy (Tolfedine Biowet, Polska) oraz antybiotyki dodawane do wody pitnej (Sul-Tridin, Biowet-Pulawy, Polska). Szczury przez co najmniej 7 dni przechodziły rekonwalescencję po implantacji kaniuli do VTA.

#### 4. Warunkowanie strachu

Procedura warunkowania strachu była przeprowadzana w klatce Skinnera (Med Associates, St. Albans, USA), zbudowanej z podłogi w postaci metalowych prętów, jednej nieprzezroczystej ścianki bocznej z Plexiglasu, trzech metalowych ścianek bocznych, światła domowego 24V umieszczonego na nieprzezroczystym suficie z Plexiglasu oraz z białej lampy stymulacyjnej oświetlonej przez żarówkę 24V i generatora tonów, umieszczonych na metalowej ścianie bocznej. Procedura była podzielona na dwie fazy: nabywanie (ang. *acquisition*) w dniu 1. i przywołanie (ang. *retrieval*) pamięci strachu w dniu 2. Podczas treningu, prezentacja bodźca warunkowanego (światło i dźwięk; ang. *conditioned stimulus* - CS) była skojarzona z szokiem elektrycznym (0.9 mA, 2s; bodziec bezwarunkowy, ang. *unconditioned stimulus* - US) w czterech seriach co 180 sekund (180 sekund habituacji, następnie cztery 30-sekundowe prezentacje CS połączone z prezentacją US w ostatnich dwóch sekundach + 60-sekundowy interwał między prezentacjami, ang. *intertrial interval* - ITI; cała procedura trwała 9 min). Przywołanie pamięci o warunkowanym strachu było testowane podczas sesji, w której prezentowano tylko CS w nowym kontekście. W dwóch oddzielnych eksperymentach, podanie antagonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych RX-821002 do VTA miało miejsce bezpośrednio przed sesją nabywania lub przywołania pamięci strachu. Substancję podawano w dwóch dawkach: 2.7  $\mu$ g/stronę lub 13.5  $\mu$ g/stronę, kontrolne zwierzęta otrzymywały sól fizjologiczną. Schemat eksperymentu warunkowania strachu przedstawiono na Ryc. 2, panel B. W oddzielnym eksperymencie zwierzęta były poddawane tylko sesji treningowej, po której natychmiastowo je uśmiercano w celu pobrania tkanek. Izolowano VTA w celu pomiaru poziomu dopaminy, noradrenaliny i ich metabolitów metodą

wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Schemat procedury poprzedzającej eksperymenty przeprowadzone metodą HPLC przedstawiono na Ryc. 2 panel A.



Ryc. 2 Schemat eksperymentu. (A) Tkanka do procedury HPLC została pobrana od zwierząt podzielonych na 3 grupy: „kontrola” przebywające w klatce domowej, „CS” poddane procedurze identycznej z warunkowaniem strachu, ale jedynie z prezentacją światła i dźwięku bez szoku elektrycznego oraz „CS+US” poddane pełnej procedurze warunkowania strachu z prezentacją światła i dźwięku wraz z szokiem elektrycznym. (B) Procedura warunkowania strachu podzielona była na 2 etapy, nabywanie pamięci strachu (dzień 1.) i przywołanie pamięci strachu (dzień 2.). Podczas nabywania pamięci strachu prezentacja bodźców warunkowych (światła i dźwięku; CS) połączona była z bodźcem bezwarunkowym – szokiem elektrycznym (0.9 mA, 2 s; US) w czterech seriach co 180 sekund (180 s habituacji, a następnie cztery 30-sekundowe prezentacje CS połączone z prezentacją US w ciągu ostatnich dwóch sekund + 60-sekundowy interwał między próbami, ITI; cała procedura trwała 9 minut). Przywołanie pamięci strachu (24h po nabywaniu; dzień 2.) było testowane podczas sesji, w której prezentowany był tylko CS w nowym kontekście.

## 5. Test otwartego pola

Test otwartego pola przeprowadzany był w kwadratowym aparacie (80 x 80 x 60 cm) z czarnymi ścianami i podłogą. Środek aparatu (o średnicy około 28 cm) był oświetlony światłem o natężeniu 150 luksów. Bezpośrednio po infuzji RX-821002 lub soli fizjologicznej do VTA, szczury były umieszczane w centrum otwartego pola i pozostawiane tam na 15

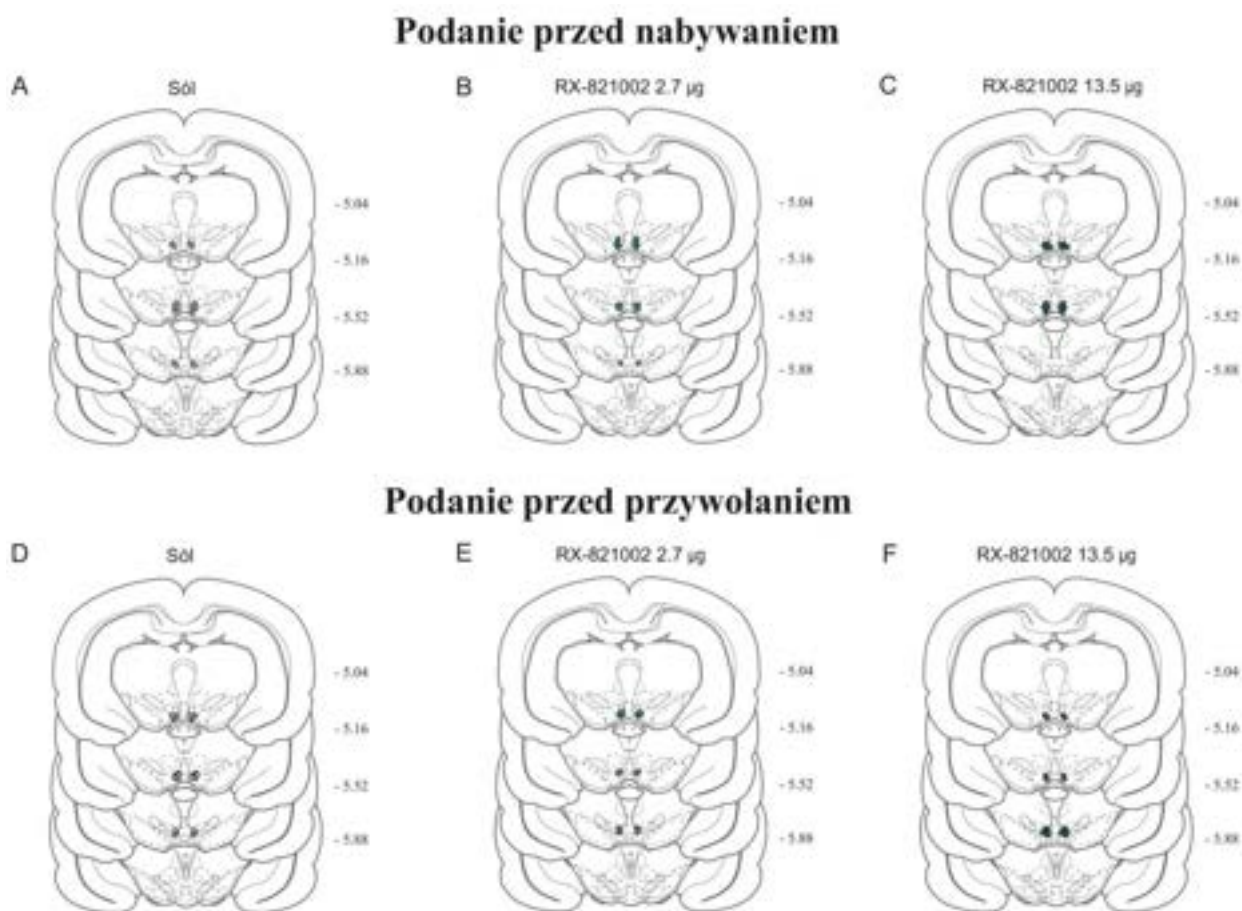
minut. Zachowanie zwierząt było rejestrowane i analizowane za pomocą oprogramowania ANY-maze. Przebyty dystans oraz średnia prędkość szczura w trakcie testu była miarą aktywności lokomotorycznej, a czas spędzony w strefie centralnej (oświetlonej) aparatu był miarą zachowania lękowego. Po każdym zwierzęciu, aparat był czyszczony 10% roztworem etanolu i suszony czystą ściereczką.

## 6. Weryfikacja histologiczna

Po wszystkich procedurach behawioralnych, szczurom w znieczuleniu ogólnym (150 mg/kg i.p., Biowet-Pulawy, Polska) przez kaniulę prowadzącą podawano do VTA 0.2  $\mu$ l niebieskiego barwnika Chicago Sky-Blue (Sigma-Aldrich, Niemcy). Bezpośrednio po iniekcji barwnika zwierzęta były dekapitowane, a mózgi izolowane i umieszczane w 4% formaldehydzie. Po 7 dniach mózgi krojono na 100  $\mu$ m skrawki za pomocą wibratomu (VT1000S, Leica Biosystems, Niemcy), a następnie przy użyciu mikroskopu świetlnego analizowano miejsca dyfuzji barwnika, aby zweryfikować poprawność umieszczenia kaniuli (Ryc. 3). Zwierzęta z niewłaściwie umieszczonymi kaniulami zostały wykluczone z dalszych analiz (Tabela 1).

Test	Substancja	Liczba zoperowanych zwierząt	VTA – prawidłowo zaimplantowane	VTA – nieprawidłowo zaimplantowane
Podanie przed nabywaniem pamięci strachu w dniu 1	Sól fizjologiczna	10	8	2
	RX-821002 2.7	10	9	1
	RX-821002 13.5	10	8	2
Podanie przed przywołaniem pamięci strachu w dniu 2	Sól fizjologiczna	14	12	2
	RX-821002 2.7	12	9	3
	RX-821002 13.5	9	9	0
Suma		65 (100%)	55 (84.6%)	10 (15.4%)

Tabela 1 Liczba zwierząt z poprawnie i niepoprawnie zaimplantowanymi kaniulami prowadzącymi służącymi do podań substancji do VTA



Ryc. 3 Schematyczne zobrazowanie rozmieszczenia kaniul prowadzących do infuzji substancji do VTA

## 7. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Bezpośrednio po sesji treningowej, szczury były dekapitowane. VTA było izolowane i zamrażane na stałym CO<sub>2</sub> (-70 °C), a następnie przechowywane do testów biochemicznych. DA wraz z jej metabolitami – kwasem 3,4-dihydroksyfenylooctowym (DOPAC), 3-metoksytyraminą (3-MT) i kwasem homowanilinowym (HVA, ostateczny metabolit); oraz NA wraz z jej metabolitem normetanefryną (NM) były oznaczane za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją elektrochemiczną. Chromatograf (Shimadzu, SCL-40, Japonia) był wyposażony w kolumny C18 (Hypersil 3 BDS-C18). Próbki tkanek były ważone i homogenizowane w lodowatym 0.1M kwasie trójchlorooctowym zawierającym 0.05mM kwasu askorbinowego. Po wirowaniu (10 000 x g, 5 min), supernatanty były filtrowane przez 0.2-µm membrany celulozowe RC 58 (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA). Faza ruchoma składała się z 0.05M buforu cytrynianowo-fosforanowego, pH 3.5, 0.1mM EDTA, 1mM oktylu sodowego sulfonatu i 3,5% metanolu. Przepływ utrzymywano na poziomie 1 ml/min. DA, NA i ich metabolity były

kwantyfikowane przez porównanie wysokości pików ze standardami skalibrowanymi w dniu analizy.

## **8. Analiza danych**

Dane z eksperymentów behawioralnych analizowano pod kątem normalności rozkładu za pomocą testu Shapiro-Wilka. Efekty podawania substancji do VTA na zachowanie analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post-hoc* Tukeya lub testem Kruskala-Wallisa z testem *post-hoc* Dunna. Ponadto, efekty podawania substancji lub soli fizjologicznej do VTA na poziom reakcji znieruchomienia podczas kolejnych prezentacji CS lub ITI oraz dystans w teście otwartego pola analizowano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z porównaniem *post-hoc* Dunnetta.

Wszystkie dane uzyskane metodą HPLC analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post-hoc* Tukeya. Istotność statystyczną ustalono na  $p < 0.05$ . Wszystkie wartości danych są prezentowane jako średnia  $\pm$  SEM.

Wszystkie dane analizowano za pomocą oprogramowania GraphPad Prism 9.

## Rezultaty

### 1. Szok elektryczny i prezentacja CS powoduje zmiany w poziomie dopaminy i jej metabolitów w VTA

Analiza otrzymanych wyników wykazała istotny (ANOVA:  $F_{(2, 27)}=4.159$ ,  $p<0.05$ ) wpływ procedury behawioralnej warunkowania strachu na poziom DA w VTA. Test *post-hoc* Tukey'a ujawnił zwiększony poziom DA po prezentacji CS+US w porównaniu do kontroli ( $p<0.05$ ), ale nie w porównaniu samego CS do kontroli ( $p=0.06$ ) (Ryc. 4A). Dodatkowo analiza wykazała istotny (ANOVA:  $F_{(2, 27)}=9.730$ ,  $p<0.001$ ) wpływ procedury na poziom DOPAC w VTA. Wzrost poziomu DOPAC w VTA wystąpił zarówno po prezentacji samego CS ( $p<0.01$  w teście *post-hoc*), jak i CS+US w porównaniu do kontroli ( $p<0.01$ ) (Ryc. 4B). Poziomy 3MT i HVA również zmieniały się pod wpływem procedury; dla 3MT: ANOVA:  $F_{(2, 27)}=14.22$ ,  $p<0.001$ , ze znaczącymi różnicami między samym CS a kontrolą ( $p<0.01$ ), a także samym CS i CS+US ( $p<0.001$ ) w teście *post-hoc* Tukey'a (Ryc. 4C), dla HVA: ANOVA:  $F_{(2, 27)}=7.595$ ,  $p<0.01$ , z różnicami między samym CS a kontrolą ( $p<0.01$ ) oraz samym CS i CS+US ( $p<0.05$ ) (Ryc. 4D).

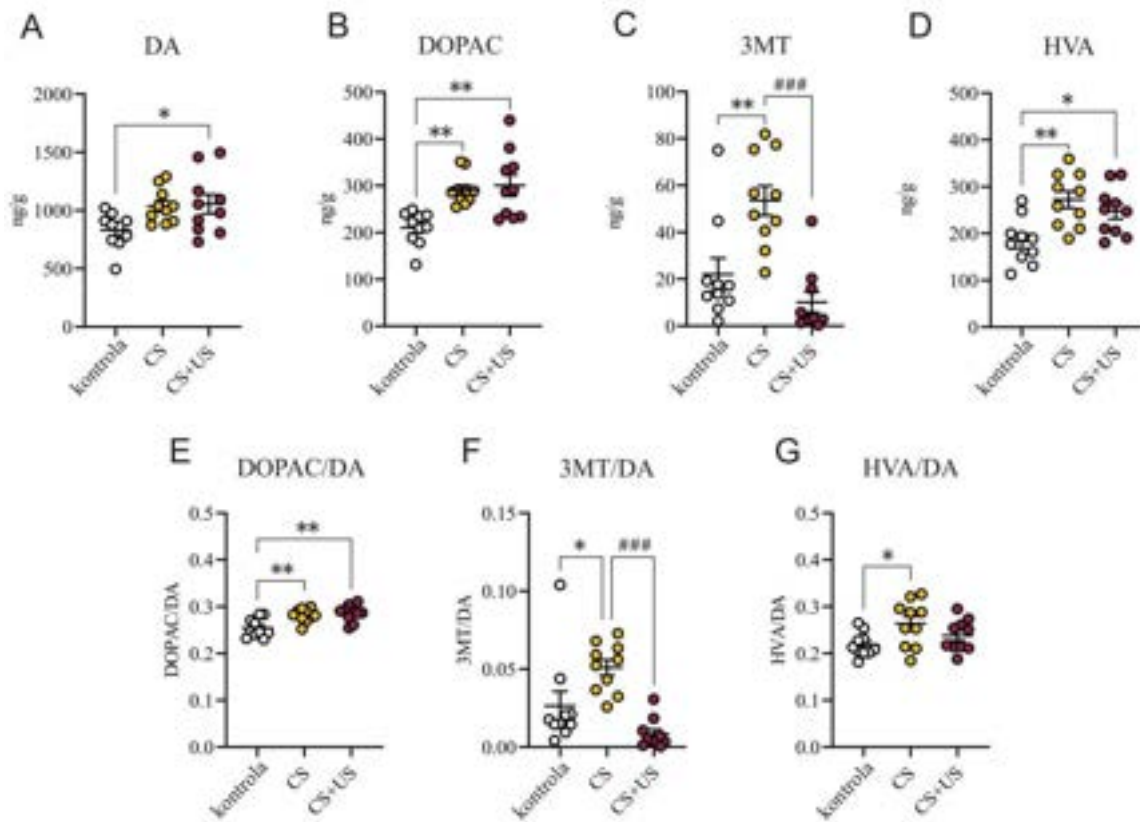
Co więcej, analiza szybkości utleniania DA, mierzona jako indeks [DOPAC]/[DA], również wykazała istotne różnice między grupami (ANOVA:  $F_{(2, 27)}=9.757$ ,  $p<0.001$ ), zarówno porównanie samego CS, jak i CS+US do kontroli wykazało wzrost stosunku [DOPAC]/[DA] (Tukey's *post-hoc*;  $p<0.01$ ,  $p<0.01$  odpowiednio; Ryc 4E). Podobnie, stwierdzono istotne różnice w szybkości O-metylacji DA mierzonej jako indeks [3MT]/[DA] (ANOVA:  $F_{(2, 27)}=11.52$ ,  $p<0.001$ ) oraz w szybkości całkowitego katabolizmu DA mierzonej jako indeks [HVA]/[DA] (ANOVA:  $F_{(2, 27)}=3.625$ ;  $p<0.05$ ). Dla stosunku [3MT]/[DA], test *post-hoc* Tukey'a wykazał różnice między grupą kontrolną a samym CS ( $p<0.05$ ) i samym CS w porównaniu do CS+US ( $p<0.001$ ; Ryc. 4F), natomiast dla stosunku [HVA]/[DA], istotne różnice stwierdzono tylko między kontrolą a samym CS (Tukey's *post-hoc*:  $p<0.05$ ; Ryc. 4G).

### 2. Szok elektryczny powoduje zmiany w poziomie noradrenaliny i jej metabolitów w VTA

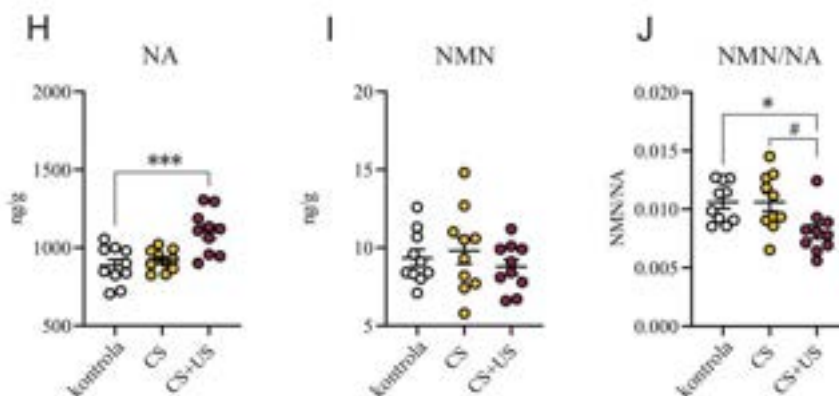
Po sesji warunkowania zaobserwowano zmienione poziomy NA w VTA (ANOVA:  $F_{(2, 27)}=10.54$ ,  $p<0.001$ ). Wykazano wzrost poziomów NA w grupie CS+US w porównaniu zarówno do samego CS (Tukey's *post-hoc*:  $p<0.01$ ), jak i do grupy kontrolnej (Tukey's *post-*

hoc:  $p < 0.001$ ; Ryc. 4H). Z kolei nie stwierdzono różnic między grupami w poziomach metabolitu NA NMN (ANOVA:  $F_{(2, 27)} = 0,63$ ; ns; Ryc. 4I). Dla katabolizmu NA mierzonego jako stosunek  $[NMN]/[NA]$ , wykryto istotne różnice między grupami (ANOVA:  $F_{(2, 27)} = 5,085$ ;  $p < 0,05$ ; Ryc. 4J). Test *post-hoc* Tukey'a wykazał zmniejszenie stosunku  $[NMN]/[NA]$  w grupie CS+US w porównaniu zarówno do kontroli ( $p < 0,05$ ), jak i do grupy której prezentowano tylko CS ( $p < 0,05$ ).

## DA i metabolity w VTA



## NA i metabolity w VTA



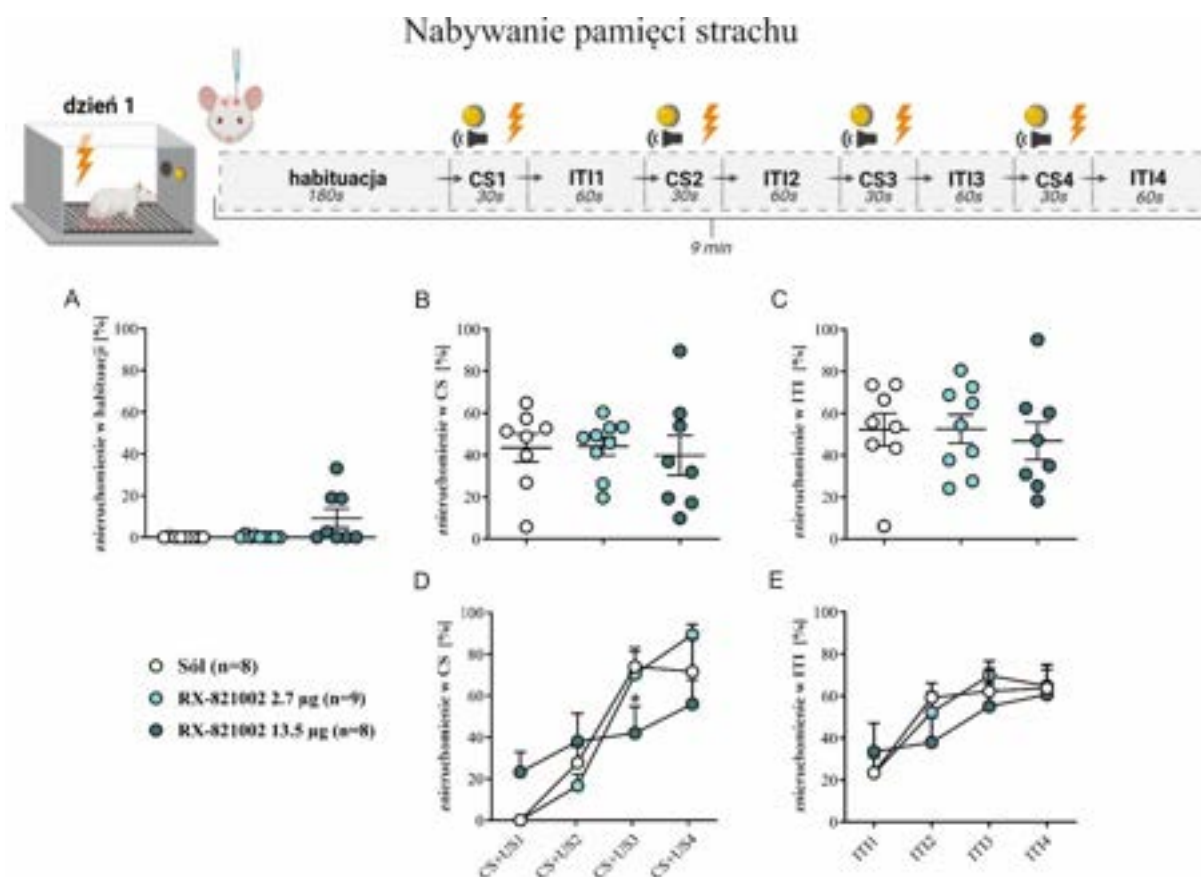
Ryc. 4 (A-D) Porównanie poziomów DA i jej metabolitów w VTA między grupą kontrolną, „CS” i „CS + US”. (E-G) Porównanie stosunku metabolitów DA do DA między grupami. (H, I) Porównanie poziomów NA i jego metabolitów między grupami. (J) Porównanie stosunku NA do jej metabolitu między grupami. Dane przedstawiono jako pojedyncze punkty danych oraz średnią  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  / # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$

### 3. Blokada receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA zaburza nabywanie pamięci strachu

Podczas fazy nabywania pamięci strachu (dzień 1), grupy różniły się w żadnym z testowanych parametrów: poziomie reakcji znieruchomienia w czasie habituacji (Ryc. 5A; Kruskal-Wallis:  $H=3.949$ ,  $df=2$ ,  $p=0.139$ ), poziomie reakcji znieruchomienia podczas CS (Ryc. 5B; ANOVA:  $F_{(2, 22)}=0.1104$ ,  $p=0.896$ ) oraz poziomie reakcji znieruchomienia podczas ITI (Ryc. 5C; ANOVA:  $F_{(2, 22)}=0.165$ ,  $p=0.849$ ).

Bardziej szczegółowa analiza wpływu podawanej substancji na poziom reakcji znieruchomienia w kolejnych punktach czasowych wykazała niewielką różnicę między grupą kontrolną a RX-821002 13.5  $\mu\text{g}$  w reakcji na trzecie parowanie CS+US (Ryc. 5D; ANOVA: prezentacja CS+US  $\times$  grupa:  $F_{(6, 88)}=3.155$ ,  $p < 0.01$ ; prezentacja CS+US:  $F_{(3, 88)}=29.92$ ,  $p < 0.0001$ ; grupa:  $F_{(2, 88)}=0.234$ ,  $p=0.792$ ; *post-test* Dunnetta dla sól vs RX 13.5  $\mu\text{g}$  podczas CS+US3  $p < 0.05$ ) i brak różnicy w reakcji znieruchomienia w poszczególnych ITI (Ryc. 5E; ANOVA: ITI  $\times$  grupa:  $F_{(6, 88)}=0.556$ ,  $p=0.765$ ; ITI:  $F_{(3, 88)}=8.668$ ,  $p < 0.0001$ ; grupa:  $F_{(2, 88)}=0.403$ ,  $p=0.669$ ).

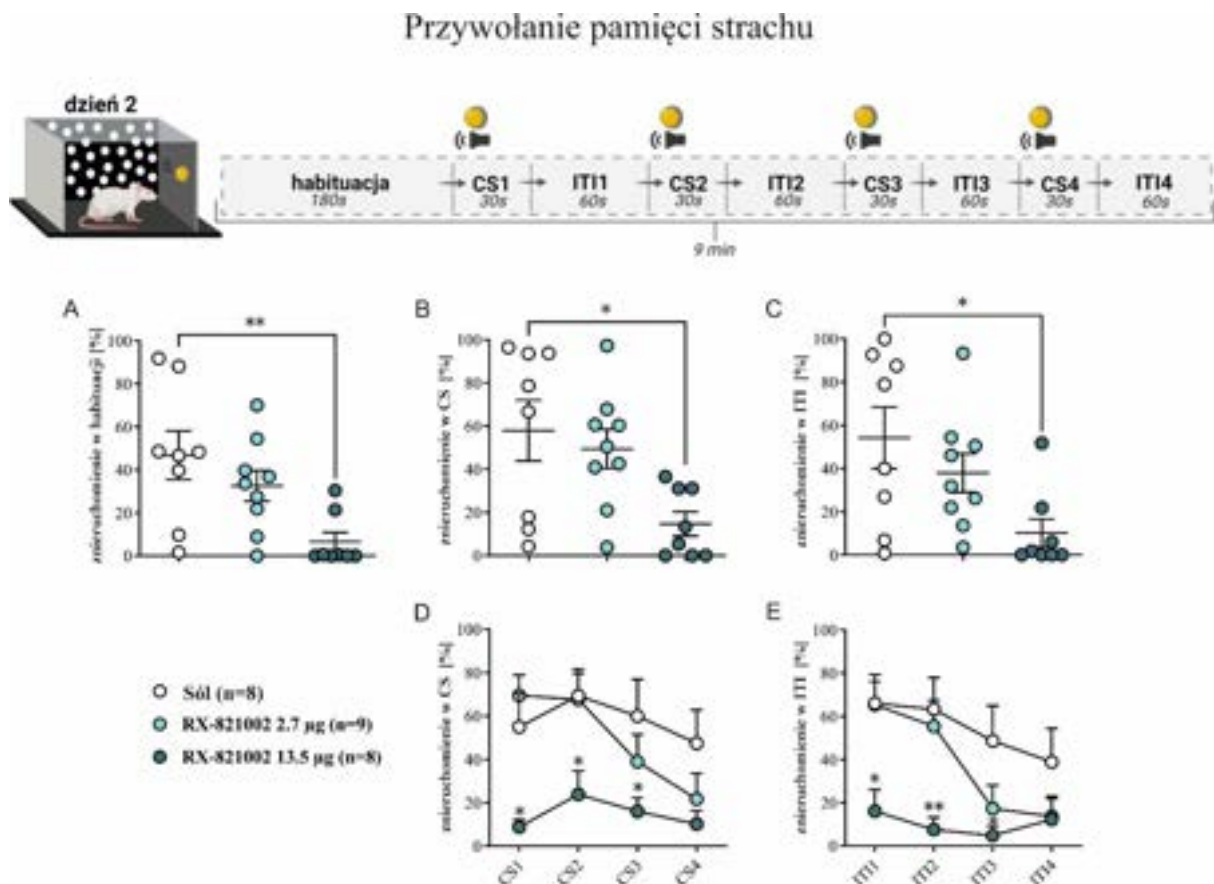




Ryc. 5 Efekty blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA podczas nabywania pamięci strachu. Schemat eksperymentu przedstawiono w górnej części ryciny. (A) Wykresy ilustrują procentowe poziomy reakcji zneruchomienia dla grup po podaniu soli fizjologicznej i RX-821002 (2.7 i 13.5  $\mu\text{g}/\text{stronę}$ ) podczas habituacji (A), średnie poziomy zneruchomienia podczas wszystkich CS (B) i podczas wszystkich ITI (C). Porównanie poziomu zneruchomienia w poszczególnych punktach czasowych dla każdego CS (D) i ITI (E) w trakcie procedury. Dane przedstawiono jako pojedyncze punkty danych oraz średnią  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$

Podanie RX-821002 do VTA bezpośrednio przed nabywaniem pamięci strachu zmniejszało warunkowe reakcje strachu (zmierzone jako poziom reakcji zneruchomienia podczas fazy przywoływania pamięci strachu w dniu 2.) w sposób zależny od dawki. Podanie do VTA dużej dawki antagonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych zmniejszało reakcje zneruchomienia w odpowiedzi na nowy kontekst (poziom reakcji zneruchomienia w fazie habituacji) 24 h po podaniu (Ryc. 6A; Kruskal-Wallis:  $H=10.98$ ,  $df=2$ ,  $p < 0.01$ ). Analiza *post-hoc* przy użyciu testu Dunna wykazała, że grupa otrzymująca RX-821002 w dawce 13.5  $\mu\text{g}/\text{stronę}$  wykazywała niższy poziom reakcji zneruchomienia niż grupa kontrolna ( $p < 0.01$ ), podczas gdy podanie dawki 2.7  $\mu\text{g}/\text{stronę}$  nie wpłynęło na poziom reakcji zneruchomienia podczas habituacji ( $p=0.9516$ ). Podobnie, poziom reakcji zneruchomienia podczas CS (Ryc. 6B; Kruskal-Wallis:  $H=7.885$ ,  $df=2$ ,  $p < 0.05$ ) oraz poziom reakcji zneruchomienia podczas ITI (Ryc. 6C; Kruskal-Wallis:  $H=8.761$ ,  $df=2$ ,  $p < 0.05$ ) pokazały różnice między grupą

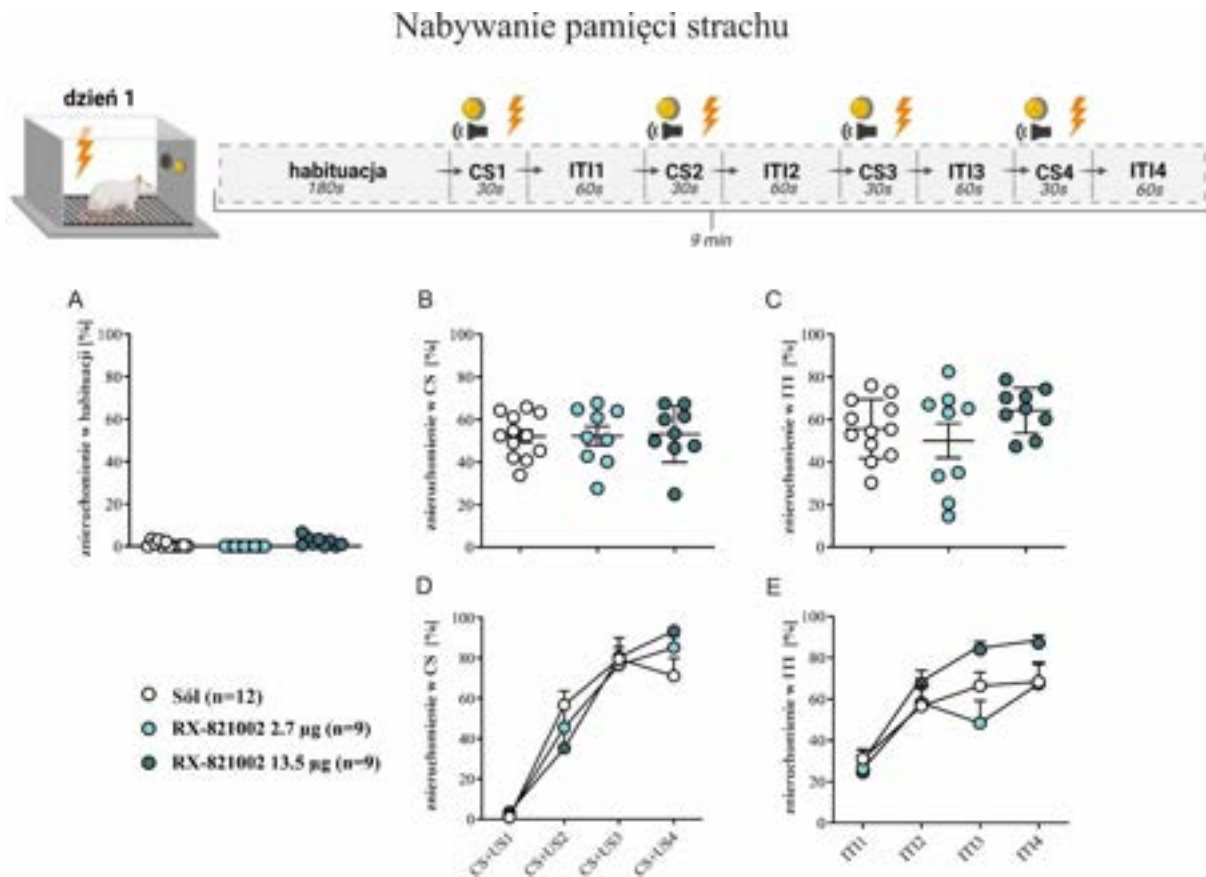
kontrolną, a grupą po podaniu dużej dawki RX-821002 (*post-test* Dunna: poziom reakcji zneruchomienia podczas CS  $p<0.05$ , poziom reakcji zneruchomienia podczas ITI  $p<0.05$ ). Analiza poziomów reakcji zneruchomienia w czasie (CS1-CS4) wykazała różnice między grupą kontrolną a grupą otrzymującą RX-821002 w dawce 13.5  $\mu\text{g}$  w poziomie reakcji zneruchomienia w odpowiedzi zarówno na pierwsze trzy CS (Ryc. 6D; ANOVA: prezentacja CS  $\times$  grupa:  $F_{(6, 88)}=1.048$ ,  $p=0.4$ ; prezentacja CS:  $F_{(3, 88)}=2.824$ ,  $p<0.05$ ; grupa:  $F_{(2, 88)}=14.75$ ,  $p<0.0001$ ; *post-test* Dunnetta dla sól vs. RX 13.5  $\mu\text{g}$  podczas: CS1  $p<0.05$ , CS2  $p<0.05$ , CS3  $p<0.05$ ) jak i na pierwsze trzy ITI (Ryc. 6E; ANOVA: ITI  $\times$  grupa:  $F_{(6, 88)}=1.217$ ,  $p=0.31$ ; ITI:  $F_{(3, 88)}=4.138$ ,  $p<0.01$ ; grupa:  $F_{(2, 88)}=14.23$ ,  $p<0.0001$ ; *post-test* Dunnetta dla sól vs RX 13.5  $\mu\text{g}$  podczas: ITI1  $p<0.01$ , ITI2  $p<0.01$ , ITI3  $p<0.05$ ).



Ryc. 6 Wpływ blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA podczas nabywania pamięci strachu na przywołanie pamięci strachu. Schemat eksperymentu przedstawiono w górnej części ryciny. (A) Wykresy przedstawiają procentowe poziomy reakcji zneruchomienia dla grup 24 godziny po podaniu soli fizjologicznej lub RX-821002 (2.7 i 13.5  $\mu\text{g}$ /stronę) podczas habituacji (A), średnie poziomy zneruchomienia podczas wszystkich CS (B) i podczas wszystkich ITI (C). Porównanie poziomu zneruchomienia w poszczególnych punktach czasowych dla każdego CS (D) i ITI (E) w trakcie procedury. Dane przedstawiono jako pojedyncze punkty danych oraz średnią  $\pm$  SEM. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

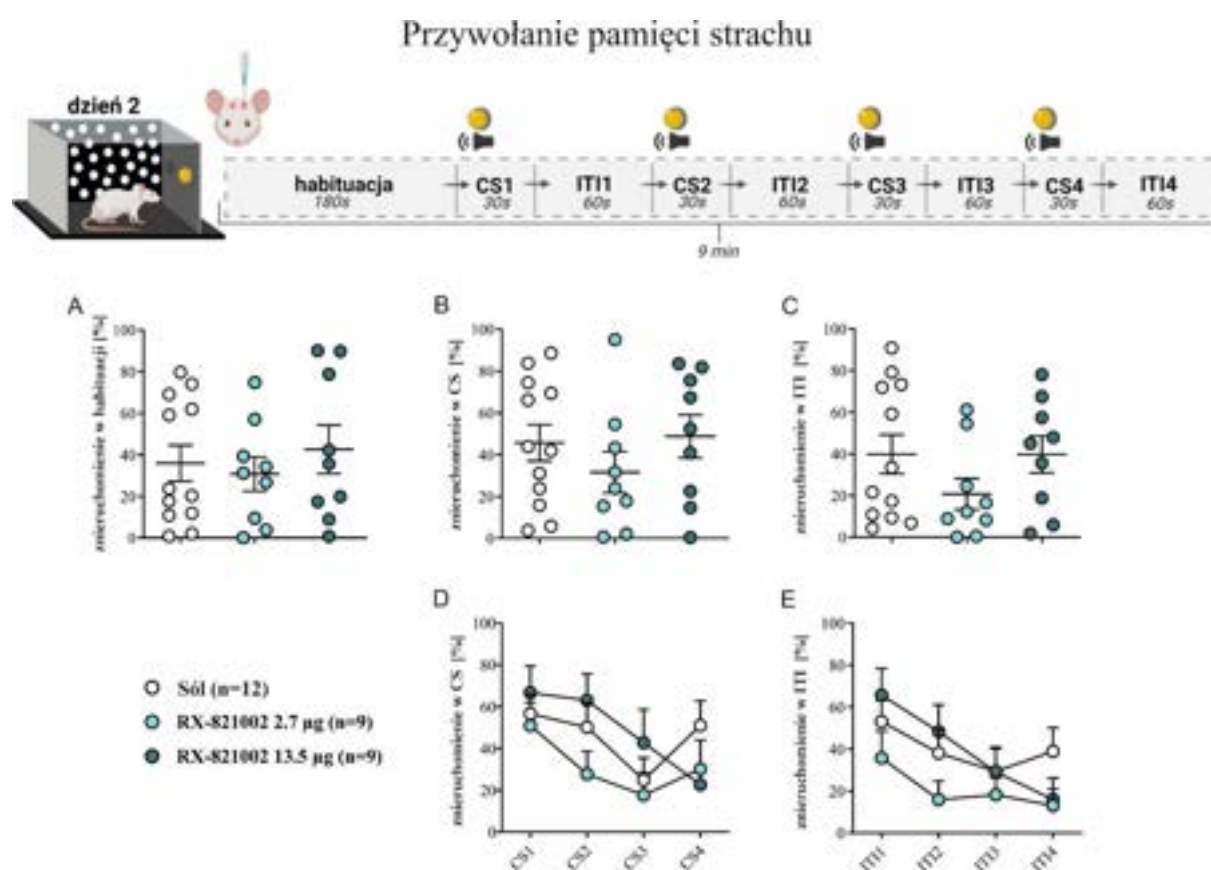
#### 4. Blokada receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA nie wpływa na przywołanie pamięci strachu

Podczas fazy nabywania pamięci strachu wykryto marginalne różnice w poziomach zneruchomienia podczas habituacji (Ryc. 7A; Kruskal-Wallis:  $H=15.27$ ,  $df=2$ ,  $p<0.001$ ; *post-test* Dunna: sól vs. RX 2.7  $\mu\text{g}$   $p=0.126$ , sól vs. RX 13.5  $\mu\text{g}$   $p=0.096$ ), natomiast nie stwierdzono różnic w odpowiedzi na CS (Ryc. 7B; ANOVA:  $F_{(2, 27)}=0.02$ ,  $p=0.979$ ) lub ITI (Ryc. 7C; ANOVA:  $F_{(2,27)}=1.608$ ,  $p=0.219$ ). Szczegółowe analizy poziomów zneruchomienia w kolejnych prezentacjach CS+US (Ryc. 7D; ANOVA: prezentacja CS+US  $\times$  grupa:  $F_{(6, 81)}=1.862$ ,  $p=0.098$ ; prezentacja CS+US:  $F_{(2,379, 64,24)}=89.12$ ,  $p<0.0001$ ; grupa:  $F_{(2, 27)}=0.021$ ,  $p=0.194$ ) i kolejnych ITI (Ryc. 7E; ANOVA: ITI  $\times$  grupa:  $F_{(6, 81)}=1.712$ ,  $p=0.128$ ; ITI:  $F_{(2,601, 70,23)}=31.51$ ,  $p<0.0001$ ; grupa:  $F_{(2, 27)}=1.601$ ,  $p=0.22$ ) nie wykazały różnic między grupami.



Ryc. 7 Nabywanie pamięci strachu. Schemat eksperymentu przedstawiono w górnej części ryciny. Wykresy przedstawiają procentowe poziomy reakcji zneruchomienia dla grup 24 godziny po podaniu soli fizjologicznej lub RX-821002 (2.7 i 13.5  $\mu\text{g}$ /stronę) podczas habituacji (A), średnie poziomy zneruchomienia podczas wszystkich CS (B) i podczas wszystkich ITI (C). Porównanie poziomu zneruchomienia w poszczególnych punktach czasowych dla każdego CS (D) i ITI (E) w trakcie procedury. Dane przedstawiono jako pojedyncze punkty danych oraz średnią  $\pm$  SEM.

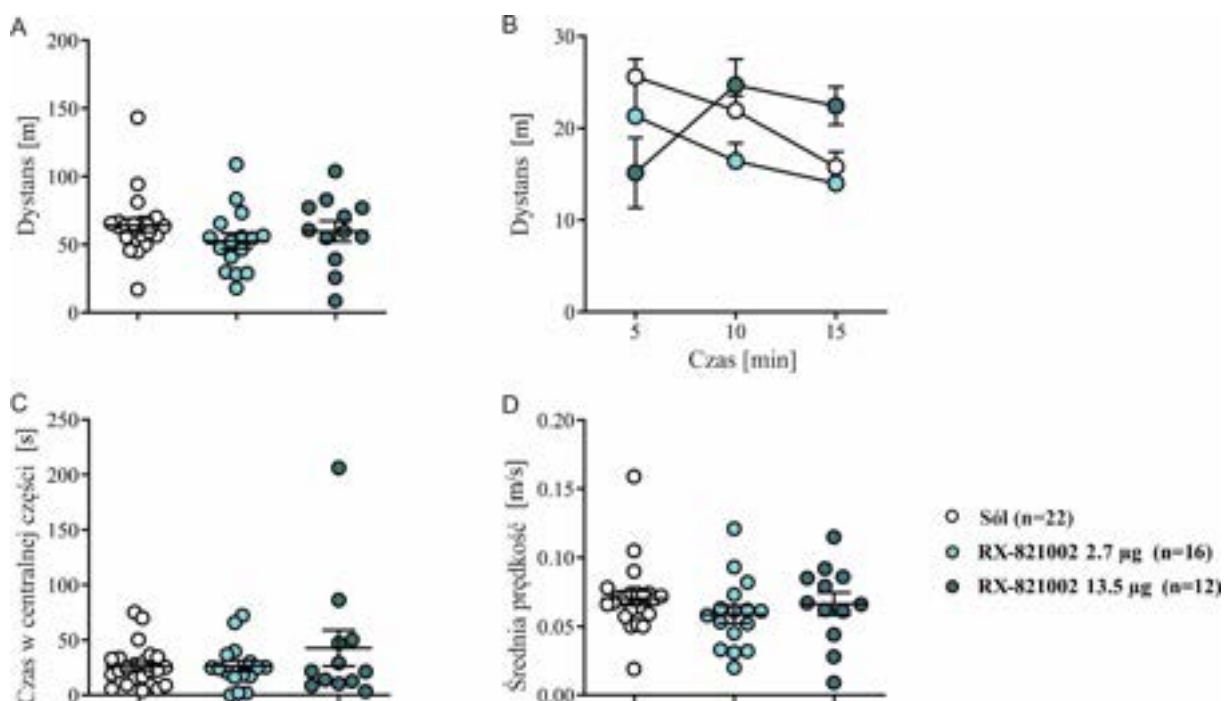
Podanie antagonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych do VTA przed przywołaniem pamięci strachu nie wpłynęło na behawioralne reakcje szczurów na żadnym etapie eksperymentu: poziom reakcji zneruchomienia w czasie habituacji (Ryc. 8A; ANOVA:  $F_{(2, 27)}=0.348$ ,  $df=2$ ,  $p=0.71$ ), poziom reakcji zneruchomienia podczas CS (Ryc. 8B; ANOVA:  $F_{(2, 27)}=0.844$ ,  $df=2$ ,  $p=0.441$ ), oraz poziom reakcji zneruchomienia podczas ITI: (Ryc. 8C; ANOVA:  $F_{(2, 27)}=1.449$ ,  $df=2$ ,  $p=0.252$ ). Dalsza analiza poziomów reakcji zneruchomienia w kolejnych CS wykazała tylko niewielką różnicę między grupą kontrolną a grupą RX 13.5  $\mu\text{g}$  w jednym punkcie czasowym eksperymentu: czwartym CS (Ryc. 8D; ANOVA: prezentacja CS  $\times$  grupa:  $F_{(6, 81)}=2.277$ ,  $p<0.05$ ; prezentacja CS:  $F_{(2, 597, 70.13)}=8.356$ ,  $p<0.001$ ; grupa:  $F_{(2, 27)}=0.843$ ,  $p=0.441$ ; brak różnicy w *post-teście* Dunnetta) i brak różnic w kolejnych ITI (Ryc. 8E; ANOVA: ITI  $\times$  grupa:  $F_{(6, 81)}=1.503$ ,  $p=0.188$ ; ITI:  $F_{(2, 769, 74.76)}=9.047$ ,  $p<0.0001$ ; grupa:  $F_{(2, 27)}=1.449$ ,  $p=0.253$ ; brak różnicy w *post-teście* Dunnetta).



Ryc. 8 Wpływ blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA na przywołanie pamięci strachu. Schemat eksperymentu przedstawiono w górnej części ryciny. (A) Wykresy przedstawiają procentowe poziomy reakcji zneruchomienia dla grup 24 godziny po podaniu soli fizjologicznej lub RX-821002 (2.7 i 13.5  $\mu\text{g}/\text{strone}$ ) podczas habituacji (A), średnie poziomy zneruchomienia podczas wszystkich CS (B) i podczas wszystkich ITI (C). Porównanie poziomu zneruchomienia w poszczególnych punktach czasowych dla każdego CS (D) i ITI (E) w trakcie procedury. Dane przedstawiono jako pojedyncze punkty danych oraz średnią  $\pm$  SEM.

## 5. Blokada receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA nie wpływa na zachowania lękowe i aktywność lokomotoryczną

Aktywność lokomotoryczna mierzona jako całkowity dystans pokonany w aparacie (Ryc. 9A; Kruskal-Wallis:  $H=3.343$ ,  $df=2$ ,  $p=0.188$ ), dystans pokonany w czasie (Ryc. 9B; ANOVA, leczenie:  $p=0.273$ ) oraz średnia prędkość (Ryc. 9D; Kruskal-Wallis:  $H=2.937$ ,  $df=2$ ,  $p=0.23$ ) nie były zmienione przez podanie RX-821002 w żadnej z testowanych dawek. Co więcej, zachowania lękowe mierzone jako czas spędzony w centralnej, oświetlonej strefie również nie zostały zmienione przez podanie antagonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych do VTA (Ryc. 9C; Kruskal-Wallis:  $H=0.0289$ ,  $df=2$ ,  $p=0.986$ ).



Ryc. 9 Blokada receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA nie ma wpływu na aktywność lokomotoryczną i zachowania lękowe. Podanie RX-821002 (2.7 i 13.5  $\mu\text{g}/\text{stronę}$ ) do VTA nie ma wpływu na aktywność lokomotoryczną mierzoną jako całkowity przebyty dystans (A), dystans przebyty w czasie (B) i średnia prędkość (D). Blokada receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA nie ma wpływu na zachowania lękowe mierzone jako czas spędzony w strefie centralnej (oświetlonej) aparatu (C). Dane przedstawiono jako pojedyncze punkty danych, a także średnia  $\pm$  SEM.

## Podsumowanie

Opisane badania uzupełniające wskazują, że szok elektryczny powoduje wzrost poziomu zarówno dopaminy i jej metabolitów jak i noradrenaliny w polu brzusznej nakrywki. Co więcej, badania behawioralne dowodzą, że blokada receptorów  $\alpha_2$ -

adrenergicznych w polu brzuszny nakrywki zaburza nabywanie pamięci strachu mierzone jako poziom reakcji zneruchomienia w fazie przywołania pamięci strachu. Natomiast, podanie antagonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych do pola brzuszny nakrywki przed etapem przywołania pamięci strachu nie wpływało na poziom reakcji zneruchomienia, dodatkowo nie wykazywało wpływu na aktywność lokomotoryczną i poziom reakcji lękowych w teście otwartego pola.

## **2. Blokada receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych w polu brzuszny nakrywki obniża poziom dopaminy uwalnianej do jądra półleżącego przegrody**

### **Materiały i Metody**

#### **1. Zwierzęta**

Eksperymenty przeprowadzono na samcach szczurów szczepu Sprague Dawley ważących około 300g w czasie rozpoczęcia procedur. Zwierzęta były hodowane w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego (Kraków, Polska) w dwunastogodzinnym trybie dnia i nocy (światło o 7. rano) w pomieszczeniu z kontrolowaną temperaturą (~22°C) i wilgotnością (~40%), z nieograniczonym dostępem do jedzenia i wody. Protokoły eksperymetalne zostały zatwierdzone przez Komitet ds. Dobrostanu Zwierząt Laboratoryjnych oraz Lokalną Komisję Etyczną Instytutu Farmakologii, Polskiej Akademii Nauk, Kraków, Polska nr. 125/2023.

#### **2. Operacje transdukcji wektorem wirusowym do NAc**

Szczury znieczulane były poprzez podanie roztworu ketaminy HCl (100 mg/kg, i.m., Biowet-Pulawy, Polska) i ksylazyny (10 mg/kg, i.m., Biowet-Pulawy, Polska), a następnie umieszczane na stoliku stereotaktycznym (Stoelting Europe, Irlandia) w celu iniekcji konstruktu sprzężonego z adenowirusem (AAV) indukującym ekspresję sensora AAV-hSyn-dLight1.2 (miano:  $\geq 4 \times 10^{12}$  vg/ml; Addgen Cat#111068). Współrzędne operacji zostały ustalone na podstawie atlasu mózgu szczura (Paxinos & Watson, 2013), z pozycjami *anteroposterior* (AP), *mediolateral* (ML) i *dorsoventral* (DV) odniesionymi do bregmy, dla NAc: AP +1.2, ML  $\pm$  1.4, DV -6.0. Operację iniekcji wektora wirusowego rozpoczęto od rozcięcia skóry głowy, odsłonięcia i oczyszczenia powierzchni czaszki i wyznaczenia punktów bregmy i lambdy. W wyznaczonym nad NAc miejscu (unilateralnie) wywiercono

otwór i następnie za pomocą manipulatora osadzonego na ramieniu stereotaktycznym szklaną kaniulą (Vitrex, Polska) podano 0.5  $\mu$ l wektora wirusowego w tempie 0.1  $\mu$ l/60 s. Po podaniu wektora wirusowego skóra głowy została zszyta. Po operacji zwierzęta otrzymywały lek przeciwzapalny i przeciwbólowy (Tolfedine Biowet, Polska) oraz antybiotyki dodawane do wody pitnej (Sul-Tridin, Biowet-Pulawy, Polska). Zwierzęta przechodziły co najmniej 21 dni rekonwalescencji w celu zapewnienia efektywnej transdukcji wirusowej.

### 3. Użyte substancje

RX-821002 (antagonista receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, 2.7  $\mu$ g i 13.5  $\mu$ g, końcowe stężenie 23,06 mM i 115.26 mM; cat. n. 1324, Tocris Bioscience, Wielka Brytania) rozpuszczono w 0.9% roztworze soli fizjologicznej i podano w objętości 0.5  $\mu$ l z użyciem mikropompy (53127V, Stoelting Europe, Irlandia) przez 10  $\mu$ l strzykawkę Hamiltona (26s ga, Hamilton 701N). Podanie substancji trwało 1 min, po czym kaniula użyta do infuzji pozostawiona była w tkance na kolejną 1 min w celu całkowitej dyfuzji substancji w tkance.

### 4. Fotometria światłowodowa (ang. *Fiber Photometry*)

System fotometrii światłowodowej (RWD R820 Tricolor Multichannel, RWD Life Science, Chiny) pozwala na rejestrowanie zmian intensywności fluorescencji pochodzącej z aktywacji określonych sensorów, w tym wypadku zmian fluorescencji zależnej od przyłączenia dopaminy do sensora dla dopaminy (dLight). Aby wywołać sygnał fluorescencji używane są dwa źródła światła o długości fal – 470 nm dla sygnału dLight i 410 nm jako kontrola autofluorescencji i zmian w sygnale zależnych od innych czynników, takich jak ruch zwierzęcia. Rejestrowany sygnał jest spektralnie oddzielany przez lustro dichroiczne, filtrowany i skupiany na fotodetektorze, a następnie prezentowany jako zmiana poziomu fluorescencji ( $\Delta F/F$ ) w stosunku do sygnału bazowego lub kontrolnego.

Eksperymenty fotometrii światłowodowej zostały wykonane na zwierzętach poddanych anestezji nieprzeżyciowej z użyciem uretanu (1.5 g/kg dootrzewnowo; kat. N. U2500, Sigma Aldrich, Niemcy). Każde zwierzę umieszczano na stoliku stereotaktycznym (Stoelting Europe, Irlandia), odsłaniano czaszkę i, z użyciem bregmy jako odniesienia, wyznaczano i wywiercano otwory w miejscu implantacji światłowodu (NAc: AP +1.2; ML -1.4; DV -5.8 od powierzchni mózgu) oraz dwubiegunowej elektrody stymulującej połączonej z kaniulą prowadzącą służącą do domózgowego podawania substancji (VTA: AP -5.3/-5.4 ; ML -1.0; DV od -8.1 do -8.3 od powierzchni mózgu). Podczas operacji i w czasie trwania

rejestracji stosowano matę termiczną w celu utrzymania odpowiedniej temperatury ciała. Po zakończonym eksperymencie zwierzęta uśmiercano poprzez dekapitację.

W celu wzbudzenia i rejestrowania sygnału w postaci zmian natężenia fluorescencji użyto światłowodu o średnicy 200  $\mu\text{m}$  i aperturze numerycznej 0.39 umieszczanego w trakcie eksperymentu 0.2 mm nad miejscem iniekcji wektora wirusowego. Moc światła mierzona była na końcu światłowodu przed każdym eksperymentem i dopasowywana do wartości 40  $\mu\text{W}$ , rejestracje wykonywane były z częstotliwością próbkowania 60 kl./s. Do stymulacji struktury w celu wywołania uwalniania neuroprzekaźnika użyto izolatora bodźców elektrycznych (DS 4, Digitimer Ltd, Wielka Brytania) kontrolowanego oprogramowaniem HDCV (UNC Dept. of Chemistry Electronics Facility, Chapel Hill, Stany Zjednoczone) połączonego z systemem RWD R820 przewodem BNC umożliwiającym przesył sygnału TTL w celu oznaczenia momentu stymulacji w trakcie rejestracji zmian poziomu fluorescencji. Zastosowano parametry stymulacji tożsame z wcześniej wykorzystywanymi w eksperymentach elektrochemicznych (Bernacka *et al.*, 2022; Kielbinski *et al.*, 2019, 2022) – prąd dwufazowy o przebiegu kwadratowym pojedynczego pulsu (300  $\mu\text{A}$ ; 2 ms na fazę; 24 impulsy) z częstotliwością 60 Hz.

Schemat eksperymentu przedstawiono na Ryc. 10, składał się z sześciu etapów z których każdy składał się z sześciu pojedynczych rejestracji (następujących co 180 sekund) zmian poziomu fluorescencji w odpowiedzi na elektryczną stymulację VTA. Pierwszy etap to pomiar Poziomu Bazowego I po którym nastąpiło podanie do VTA soli fizjologicznej i kolejne 6 rejestracji, trzeci etap to pomiar Poziomu Bazowego II po którym nastąpiło podanie niskiej (2.7  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ ) dawki RX-821002, kolejny etap to pomiar Poziomu Bazowego III, po którym nastąpiło podanie wysokiej (13.5  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ ) dawki RX-821002. Średnie wartości szczytowe sygnału fluorescencji uzyskane po elektrycznej stymulacji VTA z etapów po podaniu soli fizjologicznej i dwóch dawek RX-821002 zostały znormalizowane do średnich wartości uzyskanych z odpowiadających im pomiarów poziomu bazowego. Uzyskane wartości wykorzystano do porównań wewnątrzsobniczych efektów wywołanych podaniem RX-821002 w stosunku do wartości wywołanych po podaniu soli fizjologicznej.





Ryc. 10 Schemat eksperymentu rejestracji zmian w poziomie fluorescencji odpowiadającej poziomowi uwalniania dopaminy do NAc po elektrycznej stymulacji VTA. Każdy etap składał się z 6 pojedynczych, rejestracji oddzielonych 180 s przerwy.

## 5. Analiza danych

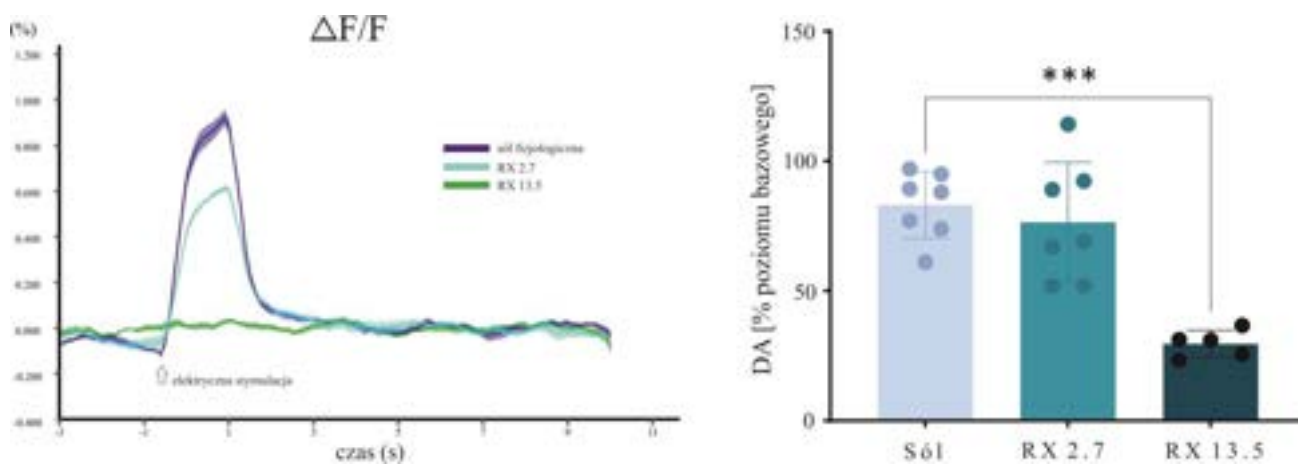
Uzyskane dane o zmianach w sygnale fluorescencji analizowano z użyciem oprogramowania opracowanego przez RWD – *Multichannel Fiber Photometry Software - Analysis*.

Efekty podawania substancji do VTA na zmiany w poziomie fluorescencji odpowiadającej poziomowi uwalnianej dopaminy analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji dla powtarzanych pomiarów (ANOVA) z testem *post-hoc* Dunnetta. Analizę statystyczną wykonano w programie GraphPad Prism 9 i zaprezentowano jako średnia  $\pm$  SD.

## Rezultaty

### 1. Blokada receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA dawkozależnie obniża poziom dopaminy uwalnianej do NAc

Analiza zmian w poziomie fluorescencji odpowiadającej poziomowi uwalnianej dopaminy do NAc wywołanej elektryczną stymulacją VTA wykazała różnice w średnich wartościach uzyskanych po podaniu soli fizjologicznej w stosunku do wartości uzyskanych po podaniu antagonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych (RX-821002) do VTA (Ryc. 11; ANOVA:  $F_{(1,737, 10,42)}=38.55, p<0.0001$ ). Dalsza analiza z wykorzystaniem testu *post-hoc* Dunnetta wykazała, że podanie wysokiej dawki RX-821002 (13.5  $\mu$ g/0.5  $\mu$ l) powoduje znaczne obniżenie poziomu uwalnianej dopaminy do NAc ( $p<0.0001$ ) w stosunku do wartości uzyskanych po podaniu soli fizjologicznej, natomiast podanie niskiej dawki antagonisty nie wywołało istotnego efektu ( $p=0.26$ ).



Ryc. 11 Wpływ blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA na poziom uwalnianej dopaminy do NAc. Lewy panel: reprezentatywne przebiegi uzyskane w eksperymencie fotometrii światłowodowej obrazujące wpływ podania soli fizjologicznej i RX-821002 w dawce 2.7 i 13.5  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$  na zmiany w poziomie fluorescencji ( $\Delta F/F$ ; każdy przebieg to średnia z 6 pojedynczych zapisów). Prawy panel: wykres uśrednionych wartości dla dopaminy, słupki reprezentują średnie, punkty reprezentują indywidualne pomiary po podaniu soli fizjologicznej ( $n=7$ ) oraz RX-821002 w dawce 2.7  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$  ( $n=7$ ) i w dawce 13.5  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$  ( $n=5$ ). \*\*\* $p < 0.0001$  w teście post-hoc Dunnetta.

## Podsumowanie

Fizjologiczne badania uzupełniające z użyciem fotometrii światłowodowej potwierdziły uzyskane wcześniej, elektrochemiczną metodą szybkoskanowej woltamperometrii cyklicznej, wyniki wskazujące, że blokada receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w polu brzusznej nakrywki zmniejsza fazowe uwalnianie dopaminy do jądra półleżącego przegrody.

# Dyskusja

Dowody elektrofizjologiczne, elektrochemiczne i behawioralne wskazują na zależną od noradrenaliny regulację aktywności neuronów dopaminergicznych, a w konsekwencji zmiany w poziomie uwalniania dopaminy w przodomózgowiu (Grenhoff & Svensson, 1993; Paladini & Williams, 2004; Mejias-Aponte, 2016; Park *et al.*, 2017; Solecki *et al.*, 2018; Kielbinski *et al.*, 2019;). Mediatorami regulacji komórek dopaminergicznych są receptory noradrenergiczne zlokalizowane na samych neuronach dopaminergicznych, interneuronach hamujących w VTA, wejściach aferentnych (tak pobudzających, jak i, prawdopodobnie, hamujących), czy komórkach glejowych. W bieżącej pracy skupiono się na fizjologicznych mechanizmach autoregulacji uwalniania noradrenaliny do VTA (przez receptory typu  $\alpha_2$ ) i ich zmianach adaptacyjnych związanych ze stresem, a także efektach zablokowania receptorów  $\alpha_2$  na asocjacyjne uczenie się. Regulacja poziomu noradrenaliny jest bowiem kluczowa dla kontroli procesów związanych z zależnymi od tego przekaźnika efektorami w VTA, takimi jak receptory noradrenergiczne  $\alpha_1$  czy receptory dopaminowe typu D<sub>2</sub>.

## **1. Regulacja uwalniania noradrenaliny do pola brzuszego nakrywki modulowana jest przez receptory $\alpha_{2A}$ -, ale nie $\alpha_{2B}$ - i $\alpha_{2C}$ -adrenergiczne w tej strukturze**

We wcześniejszych badaniach wykazano, że zmiany w aktywności receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w znaczący sposób wpływają na poziom uwalnianej dopaminy do NAc (Ryc. 11). Blokada receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych poprzez podanie antagonisty tych receptorów do VTA powoduje zahamowanie uwalniania dopaminy do NAc, ale nie do mPFC. Co więcej, wskazano, że mechanizm ten zależny jest od aktywności receptorów dopaminowych typu D<sub>2</sub>, a infuzja ich antagonisty (raklopryd) poprzedzająca podanie antagonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych niweluje wcześniej opisany efekt (Kielbinski *et al.*, 2019). Wyniki te potwierdziły przypuszczenia, że receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne w VTA pełnią głównie funkcję autoreceptorów (Hein, Limbird, *et al.*, 1999; Trendelenburg *et al.*, 2003; Gilsbach & Hein, 2012; Mejias-Aponte, 2016), a co za tym idzie regulują uwalnianie w tej strukturze noradrenaliny, która może modulować aktywność neuronów dopaminergicznych i w konsekwencji poziom dopaminy uwalnianej do przodomózgowia.

W publikacji Bernacka i in., 2022 zbadano wpływ blokady poszczególnych podtypów

receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego na poziom uwalnianej dopaminy w NAc. W pierwszej części badań, z użyciem niespecyficznego antagonisty tych receptorów jakim jest idazoksan potwierdzono wcześniej opisane wyniki ukazujące, że antagonistą receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych powoduje obniżenie fazowego uwalniania dopaminy do NAc. Co więcej, w zawartych w rozprawie badaniach uzupełniających przedstawiono wyniki uzyskane metodą fotometrii światłowodowej stanowiące dodatkowy dowód wspomnianych obserwacji. Następnie, wykorzystano antagonistę specyficznego dla podtypu  $\alpha_{2A}$  receptora noradrenergicznego: BRL-44408. Zaobserwowano, że zależnie od dawki (1  $\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$  – brak efektu; 5 i 10  $\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$  – wyraźny efekt) BRL-44408 zmniejszał poziom fazowo uwalnianej dopaminy do NAc wywołanej elektryczną stymulacją VTA. Efekt ten był niwelowany wcześniejszą blokadą receptorów dopaminowych typu  $D_2$ . Zastosowanie antagonistów specyficznych dla podtypu receptora noradrenergicznego  $\alpha_{2B}$  (imiloksan) i  $\alpha_{2C}$  (JP-1302) w żadnej z zastosowanych dawek (1 i 10  $\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$ ) nie wpływało na poziom uwalnianej dopaminy w NAc.

W pracy wykazano obecność białka dla podtypu  $\alpha_{2A}$  w VTA metodą Western blot, wynik ten jest zgodny z danymi literaturowymi gdzie obecność receptorów  $\alpha_{2A}$ - oraz  $\alpha_{2C}$ -adrenergicznych w tej strukturze potwierdzono zarówno metodami immunohistochemicznymi, jak i pomiarami poziomu mRNA (Rosin *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1998). Do tej pory nie ma jednoznacznych dowodów na ekspresję białka ani mRNA podtypu receptora  $\alpha_{2B}$ -adrenergicznego w VTA w przeciwieństwie do jego wysokiej ekspresji we wzgórzu (Scheinin *et al.*, 1994; MacDonald & Scheinin, 1995), pomimo tego zbadano wpływ podania specyficznego antagonisty również dla tego receptora.

Ze względu na fakt, że dokładna lokalizacja receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA nie została w pełni poznana, rozważanych jest kilka alternatywnych hipotez odnośnie mechanizmu ich działania. Część badań wskazuje na możliwość presynaptycznego hamowania za pośrednictwem receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych zlokalizowanych na zakończeniach neuronów glutaminianergicznych (Jiménez-Rivera *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2014). Przypuszcza się, że zlokalizowane na nich są receptory głównie  $\alpha_{2A}$ -adrenergiczne (Lee *et al.*, 1998; Mejias-Aponte, 2016). Natomiast, gdyby mechanizm ten był dominujący, obserwowany byłby wzrost poziomu uwalnianej dopaminy w przodomózgowiu spowodowany zwiększoną aktywnością neuronów dopaminergicznych wywołaną wzrostem poziomu uwalniania glutamianu. Jest to niezgodne z zaprezentowanymi wynikami. Oddziaływanie antagonisty na receptory  $\alpha_{2A}$ -adrenergiczne zlokalizowane na neuronach GABAergicznym skutkowałoby co prawda obniżeniem poziomu uwalnianej dopaminy w

przodomózgowiu wywołanym wzrostem poziomu GABA w VTA, ale efekt ten nie byłby zależny od aktywności receptorów dopaminowych typu D<sub>2</sub>. Regulacja aktywności neuronów dopaminergicznych mogłaby też, hipotetycznie, zachodzić bezpośrednio poprzez blokadę receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych zlokalizowanych na ciałach tych komórek (Inyushin *et al.*, 2010). Jednakże po podaniu antagonistów tych receptorów można by wówczas oczekiwać wzrostu uwalniania dopaminy w strukturach docelowych, co jest sprzeczne z przedstawionymi wynikami.

Co więcej, właściwości badanych receptorów  $\alpha_{2A}$ -adrenergicznych dostarczają dodatkowych danych wspierających teorię o ich funkcji autoreceptorowej. Presynaptyczne receptory  $\alpha_{2A}$ -adrenergiczne charakteryzują się najszybszą spośród zbadanych podtypów kinetyką (Gilsbach & Hein, 2012), stosunkowo szybką dezaktywacją wewnątrzprostowniczych kanałów potasowych aktywowanych białkiem G oraz niższym powinowactwem do noradrenaliny w porównaniu do podtypu  $\alpha_{2C}$  receptorów noradrenergicznych (Bünemann *et al.*, 2001). Właściwości te stanowią o ich predyspozycji do regulacji uwalniania noradrenaliny wydzielanej na drodze fazowej aktywności neuronów noradrenergicznych w LC. Receptory  $\alpha_{2C}$ -adrenergiczne mają wyższe powinowactwo do noradrenaliny oraz wolniejszą kinetykę – uważa się, na podstawie badań zarówno na myszach *knockout* (Hein, Altman, *et al.*, 1999), jak i hodowlach komórkowych (Bünemann *et al.*, 2001), że podtypy te mają rozdzielne funkcje w regulacji uwalniania neuroprzekaźnika: receptory  $\alpha_{2A}$  regulują fazowo, a receptory  $\alpha_{2C}$  tonicznie uwalnianą noradrenalinę. Jest to zgodne z prezentowanymi wynikami, ponieważ zastosowana elektryczna (60 Hz) stymulacja VTA, połączona z blokadą receptorów  $\alpha_{2A}$ -adrenergicznych, prawdopodobnie prowadzi do szybkiego i znaczącego wzrostu uwalnianej noradrenaliny na drodze fazowej aktywności neuronów noradrenergicznych.

Noradrenalina, w szczególności w wysokich (mikromolarnych) stężeniach, wykazuje podobne do dopaminy powinowactwo do receptorów dopaminowych typu D<sub>2</sub> (Sánchez-Soto *et al.*, 2016). Przyłączenie neuroprzekaźnika skutkuje ich aktywacją i w konsekwencji zahamowaniem aktywności neuronów dopaminergicznych. Możliwość krzyżowej aktywacji receptorów dopaminowych typu D<sub>2</sub> przez noradrenalinę wykazano nie tylko w badaniach *in vitro* (Grenhoff *et al.*, 1995; Arencibia-Albite *et al.*, 2007; Sánchez-Soto *et al.*, 2016), ale również w elektrofizjologicznych (Guiard *et al.*, 2008) i elektrochemicznych (Park *et al.*, 2017; Kielbinski *et al.*, 2019).

Podsumowując, przedstawione wyniki wskazują, że autoreceptory  $\alpha_{2A}$ -adrenergiczne zlokalizowane na zakończeniach neuronów noradrenergicznych w VTA regulują poziom

noradrenaliny uwalnianej do tej struktury. Obecność wysokich stężeń noradrenaliny może następnie, poprzez krzyżową aktywację receptorów dopaminowych typu D<sub>2</sub>, stanowić znaczący element modulacji aktywności neuronów dopaminergicznych i poziomu uwalnianej dopaminy do NAc.

## **2. Uwalnianie dopaminy do podstawno-bocznego jądra migdałowatego jest regulowane przez aktywność receptorów $\alpha_1$ - oraz $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA**

Podstawno-boczne jądro migdałowate jest strukturą związaną z przetwarzaniem bodźców emocjonalnych (zarówno pozytywnych, jak i negatywnych), szczególnie tych związanych ze stresem, co więcej jest również jedną z kluczowych struktur w układzie mezolimbicznym (Cardinal *et al.*, 2002; Wassum & Izquierdo, 2015; Sharp, 2017). Ze względu na fakt, że struktura ta posiada zarówno unerwienie noradrenergiczne, jak i dopaminergiczne, funkcje pełnione przez BLA mogą być regulowane tak przez noradrenalinę, jak i dopaminę (de la Mora *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017; Sharp, 2017; Giustino & Maren, 2018; Stubbendorff & Stevenson, 2021). Wyniki uzyskane dzięki eksperymentom behawioralnym wskazują, że zmiany aktywności receptorów noradrenergicznych w VTA modulują zachowania wywołane bodźcami warunkowymi, w które zaangażowane jest BLA (Solecki *et al.*, 2017, 2018, 2022), jednakże do tej pory nie było jasne czy za efekty te odpowiada noradrenergiczna modulacja połączeń dopaminergicznych w obwodzie VTA-BLA.

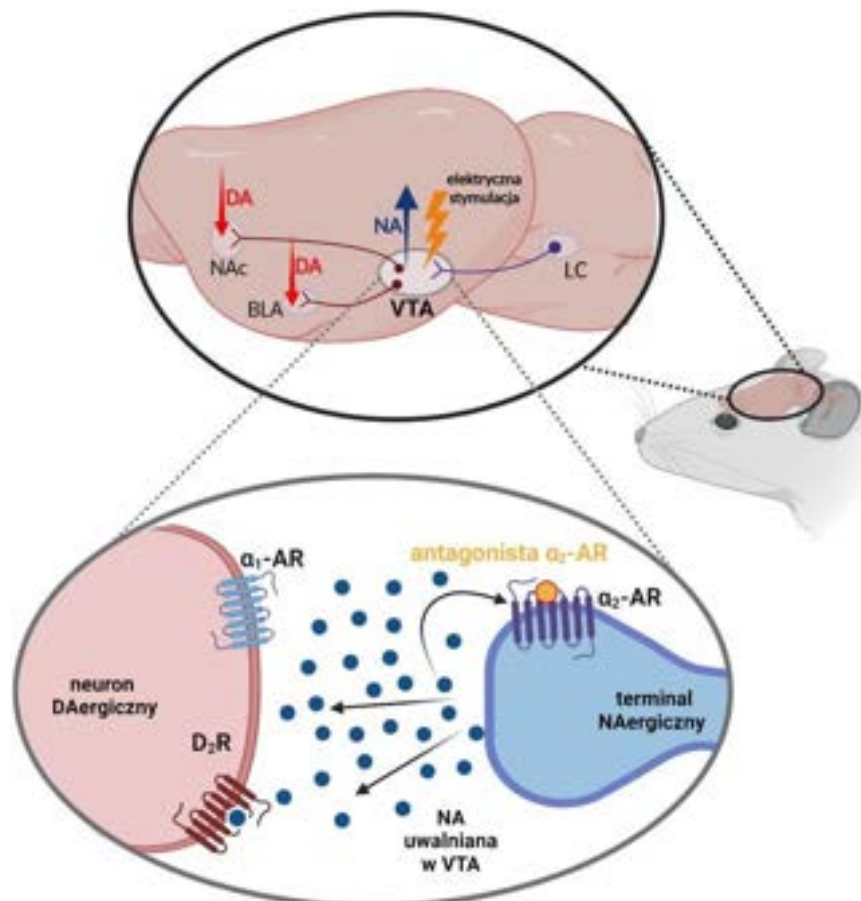
W pracy Kielbinski i in., 2022 zbadano wpływ blokady receptorów  $\alpha_1$ - oraz  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA na poziom elektrycznie wywołanej, fazowo uwalnianej dopaminy w BLA. Podanie antagonisty receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych – terazosyny – do VTA powoduje obniżenie poziomu uwalnianej dopaminy w BLA. Efekt ten może być spowodowany postsynaptyczną zmianą w pobudliwości komórek (Goertz *et al.*, 2015) lub zmianami w poziomie uwalniania glutaminianu i GABA z zakończeń zlokalizowanych w VTA (Velásquez-Martinez *et al.*, 2012, 2015, 2020). Natomiast odmiennosc w regulacji uwalniania dopaminy poprzez receptory  $\alpha_1$ -adrenergiczne w obwodach VTA-NAc/BLA i VTA-mPFC może wynikać z różnic w ekspresji kanałów jonowych oraz obecności potasowych hiperpolaryzacyjnych prądów hamujących aktywowanych wapniem – SK (ang. *small conductance* tzn. o małej przewodności) odpowiedzialnych za regulację aktywności neuronalnej, a także udziału prądu aktywowanego hiperpolaryzacją ( $I_h$ ) wpływającego na

podbudliwość komórki w tych obwodach. W układzie VTA-mPFC brak jest jednoznacznych dowodów na przewodnictwo zależne od  $I_h$  i SK (Liss i Roeper 2008; Chaudhury 2012; Juarez i Han 2016). Neurony te wykazują wprawdzie wyższą pobudliwość, ale w przypadku fazowej stymulacji VTA ich aktywność nie jest regulowana za pośrednictwem działania noradrenaliny przez receptory  $\alpha_1$ -adrenergiczne w przeciwieństwie do neuronów projektujących do NAc i BLA regulowanych zarówno przez aktywność kanałów SK jak i prądy  $I_h$ .

Co więcej, podanie antagonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych (RX-821002) powoduje znaczne zahamowanie uwalniania dopaminy w BLA. Obserwacje te są analogiczne do uzyskanych w obwodzie VTA-NAc (Ryc. 12), w przeciwieństwie do braku efektów w obwodzie VTA-mPFC (Kielbinski *et al.*, 2019) i potwierdzają hipotezę, że noradrenalina uwalniana w VTA preferencyjnie moduluje przekazywanie dopaminergiczne w układzie mezolimbicznym, a nie mezkortykalnym. Tak zróżnicowana noradrenergiczna modulacja uwalniania dopaminy wynika prawdopodobnie z odmiennej charakterystyki neuronów projektujących z VTA do tych struktur (do NAc i BLA vs mPFC). Neurony dopaminergiczne VTA różnią się między sobą pod względem morfologii, cech molekularnych czy właściwości elektrofizjologicznych (Margolis *et al.*, 2006, 2008; Ikemoto, 2007; Lammel *et al.*, 2008, 2011, 2012, 2014). W związku z powyższym, różne populacje neuronów dopaminergicznych mogą inaczej odpowiadać na określone bodźce i pełnić odmienne funkcje. Znalazło to odzwierciedlenie w klasyfikacji tych neuronów w zależności od struktury do której projektują (Ford *et al.*, 2006; Margolis *et al.*, 2006, 2008; Ikemoto, 2007; Lammel *et al.*, 2008, 2014; Beckley *et al.*, 2013; Poulin *et al.*, 2014, 2018).

Jednym z aspektów różnicujących populacje neuronów we wspomnianych obwodach jest poziom ekspresji receptorów dopaminowych typu  $D_2$  na ciałach neuronów dopaminergicznych. W przeciwieństwie do neuronów projektujących do NAc i BLA, w ciałach neuronów dopaminergicznych projektujących do mPFC wykryto niskie poziomy mRNA dla receptorów  $D_2$ , co ogranicza, a wręcz uniemożliwia regulację aktywności tych neuronów poprzez uwalnianie dopaminy lub innego neuroprzekaźnika mogącego aktywować ten typ receptorów (Lammel *et al.*, 2008). Co więcej, dzięki rozwojowi narzędzi genetycznych, badania anatomiczne przyczyniły się do identyfikacji i wyodrębnienia konkretnych populacji neuronów dopaminergicznych unerwiających różne struktury przodomózgowia (Poulin *et al.*, 2014, 2018; Morales & Margolis, 2017). Wykazano, że NAc unerwiony jest głównie przez dwie populacje neuronów dopaminergicznych. Pierwsza z nich to populacja Calb1/Cck wyrażająca ekspresję genu Calb1 (kodującego białko wiążące wapń, kalbidynę) oraz genu Cck (kodującego neuropeptyd – cholecystokininę). Druga populacja to

neurony Sox6/Ndnf charakteryzujące się ekspresją czynnika transkrypcyjnego Sox6 oraz genu Ndnf (kodującego neurogeninę 1). Podobnie, główny typ neuronów projektujących z VTA do BLA to również populacja Calb1/Cck. Natomiast mPFC, które posiada niewielkie (w porównaniu do NAc) projekcje dopaminergiczne, wykazuje unerwienie głównie przez populację Vglut2 (wykazującą obecność transportera typu 2 dla glutaminianu) z niewielkim tylko udziałem neuronów Cck<sup>+</sup> (Poulin *et al.*, 2018). Przytoczone dane pozwalają na wnioskowanie, że to właśnie unerwienie poprzez neurony Cck<sup>+</sup> oraz obecność na ciałach komórkowych receptorów dopaminowych typu D<sub>2</sub> stanowią wspólny mianownik projekcji z VTA do BLA i NAc i umożliwiają regulację tych obwodów przez noradrenalinę. Niestety, otwartym pozostaje pytanie czy projekcje te pochodzą z tych samych neuronów, czy też są to oddzielne komórki dzielące ze sobą cechy molekularne.



Ryc. 12 Poziom fazowo uwalnianej dopaminy (DA) w jądrze pólleżącym (NAc) i podstawno-bocznym jądrze migdałowatym (BLA) jest obniżony przez noradrenalinę (NA) uwalnianą w polu brzusznej nakrywki (VTA) pod wpływem elektrycznej stymulacji tej struktury i blokady autoreceptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych ( $\alpha_2$ -AR) z użyciem ich antagonisty. Podniesiony poziom NA powoduje aktywację receptorów dopaminowych typu D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>R) zlokalizowanych na ciałach neuronów dopaminergicznych (neuron DAergiczny) i zahamowanie uwalniania DA.

Przedstawione wyniki potwierdzają postulowane wcześniej różnice w noradrenergicznej



modulacji poziomu uwalnianej dopaminy w układzie mezo limbicznym i mezo korykalnym. Co więcej, wskazują, że regulacja ta zachodzi nie tylko w obwodzie VTA-NAc, ale również VTA-BLA. Biorą w niej udział zarówno receptory  $\alpha_1$ -, jak i  $\alpha_2$ -adrenergiczne.

### **3. Stres wpływa na modulację uwalniania dopaminy do podstawno-bocznego jądra migdałowatego mediowaną przez receptory $\alpha_2$ -, ale nie $\alpha_1$ -adrenergiczne w VTA**

Stres i zaburzenia z nim skorelowane mogą powodować modyfikacje w przekaźnictwie zarówno noradrenergicznym, jak i dopaminergicznym (Aston-Jones & Cohen, 2005; Morilak *et al.*, 2005; Koob, 2014, 2021). Zmiany te są obserwowane w wielu strukturach mózgu takich jak mPFC, AMY, NAc i BNST (Etkin & Wager, 2007; Sailer *et al.*, 2008; Shin & Liberzon, 2009; Calhoun & Tye, 2015; Daviu *et al.*, 2019). Szczególnie interesujące wydają się zmiany w BLA ponieważ aktywność tej struktury jest ściśle związana z odpowiedzią na bodźce stresowe; co więcej, obszar ten otrzymuje unerwienie zarówno noradrenergiczne, jak i dopaminergiczne. W związku z powyższym, w kolejnym etapie badań przeprowadzono weryfikację wpływu ostrego stresu (szoku elektrycznego) na uwalnianie dopaminy w BLA modulowane przez aktywność receptorów adrenergicznych w VTA.

W pracy Kielbinki i in., 2022, wykazano, że ekspozycja na ostry stres zmniejsza wcześniej opisane efekty wywołane farmakologiczną blokadą receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA na poziom uwalnianej dopaminy w BLA. Natomiast nie zaobserwowano wpływu stresu na efekty wywołane farmakologiczną blokadą receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych w VTA na poziom uwalnianej dopaminy w BLA. Co więcej, przeprowadzone eksperymenty dowiodły również, że efekt ten jest przejściowy – zanikał bowiem już po 7 dniach od ekspozycji na ostry stres.

Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, pokazującymi podobne efekty w BNST (McElligott *et al.*, 2013; Fox *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2019). We wspomnianych badaniach przeprowadzono eksperymenty łączące optogenetyczną stymulację zakończeń noradrenergicznych w BNST z rejestracją poziomu uwalnianej noradrenaliny metodą FSCV w tej strukturze (Schmidt *et al.*, 2019). U myszy poddanych procedurze chronicznego stresu unieruchomienia wykazano podniesiony poziom uwalnianej noradrenaliny w BNST, a także zmniejszoną wrażliwość na podanie antagonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych – idazoksanu (Schmidt *et al.*, 2019). Świadczy to o prawdopodobnej utracie funkcjonalności autoreceptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w tej strukturze pod wpływem

stresu. Ponadto, wykazano różnice w poziomie uwalnianej noradrenaliny, jej wychwycie zwrotnym, a także regulacji poprzez receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne w BNST pomiędzy szczepami szczurów o odmiennym profilu genetycznym i fenotypie lękowym, a także różnym działaniu osi HPA (McElligott *et al.*, 2013; Fox *et al.*, 2015). Wskazano również na odmienną modulację układu noradrenergicznego u szczepów szczurów o fenotypie lękowym (Lewis i Wistar Kyoto) w porównaniu do szczurów kontrolnych ze szczepu Sprague Dawley pod wpływem czynników takich jak stres czy też indukcja fizycznej zależności od morfiny i jej odstawienie (McElligott *et al.*, 2013; Fox *et al.*, 2015). Zmiany w postaci zwiększonej transmisji noradrenergicznej w BNST zaobserwowano jedynie u szczurów szczepu Sprague Dawley, lecz nie u zwierząt cechujących się wrodzonym fenotypem lękowym (McElligott *et al.*, 2013; Fox *et al.*, 2015). W innych badaniach przeprowadzono również weryfikację poziomu uwalniania katecholamin do BLA w odpowiedzi na elektryczną stymulację LC u zwierząt poddanych stresowi wymuszonego pływania i porażki społecznej (ang. *social defeat stress*) (Deal *et al.*, 2021). Co prawda w pracy tej nie wykazano zmian w poziomie uwalnianej noradrenaliny u zwierząt stresowanych, natomiast rejestracje wykonane były po 5 dniach od stresu wymuszonego pływania i po 7 dniach od stresu porażki społecznej (Deal *et al.*, 2021), co zgodne jest z uzyskanymi przez nas wynikami świadczącymi o braku obserwowanego efektu już po 7 dniach od procedury ostrego stresu. Jednakże we wspomnianej pracy wykazano również, że poziom katecholamin uwalnianych do BLA u zwierząt stresowanych, ale nie naiwnych, zmieniał się pod wpływem systemowego podania antagonisty receptorów dopaminergicznych typu D<sub>2</sub>. Obserwacja ta została przez autorów zinterpretowana jako dodatkowa komponenta dopaminergiczna w tej strukturze, pojawiająca się pod wpływem stresu (Deal *et al.*, 2021).

Podsumowując, uzyskane przez nas wyniki, a także przytoczone dane literaturowe, wskazują nie tylko na wzajemne oddziaływanie układów dopaminergicznego z noradrenergicznym, ale również zmiany adaptacyjne wywołane czynnikami stresowymi. W oparciu o te dane można wysnuć wniosek, że pod wpływem stresu następuje utrata funkcjonalności autoreceptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, co w konsekwencji może prowadzić do zwiększonego poziomu uwalnianej w VTA noradrenaliny i zwiększonej jej zdolności do modulowania poziomu uwalniania dopaminy w przodomózgowiu. Co więcej, możliwy jest również podobny mechanizm w kontekście receptorów dopaminergicznych typu D<sub>2</sub>, co z kolei wpływać może bezpośrednio na poziom uwalnianej dopaminy.

Warto zauważyć, że pomimo iż w naszych badaniach wskazujemy na przejściowość obserwowanego efektu wywołanego ostrym stresem (brak efektu po 7 dniach od stresu), dane

literaturowe sugerują, że podniesiona reaktywność układu noradrenergicznego i zwiększony poziom uwalniania noradrenaliny pod wpływem stresu utrzymuje się co najmniej 7 dni (Ronzoni *et al.*, 2016; Borodovitsyna, Flamini, *et al.*, 2018; Borodovitsyna, Joshi, *et al.*, 2018). Wskazuje to na możliwe współwystępowanie również dalszych, innych niż sugerowane, adaptacji w układzie katecholaminergicznym (np. modulacja aktywności neuronalnej czy zmiany w morfologii neuronów) lub różnych okien czasowych dla zmian w funkcjonalności autoreceptorów w różnych strukturach (Borodovitsyna, Joshi, *et al.*, 2018).

#### **4. Potencjalne mechanizmy zmian w funkcjonalności receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych w polu brzusznej nakrywki pod wpływem stresu**

Zarówno przedstawione badania, jak i dane literaturowe potwierdzają zmiany wywołane stresem w regulacji uwalniania noradrenaliny zależnej od receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, jednakże mechanizm molekularny na drodze którego zmiany te następują pozostaje nieznany.

W badaniach Kielbinski i in., 2022 podjęto próbę weryfikacji czy ostry stres może wpływać na poziom ekspresji receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA. W kolejnym etapie zbadano również poziom białka dla receptorów dopaminowych typu D<sub>2</sub> w tej strukturze. Potencjalne zmniejszenie ekspresji receptorów D<sub>2</sub> mogłoby skutkować tym samym efektem co zmiany w funkcjonalności receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych. Przeprowadzone eksperymenty Western blot nie wykazały jednak różnic zarówno w całkowitym poziomie białka, jak i w poziomie białka we frakcji błonowej i cytoplazmatycznej dla obu tych receptorów pomiędzy grupą zwierząt kontrolnych i poddanych procedurze ostrego stresu. Dane te ukazują brak wpływu stresu na ekspresję receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych oraz dopaminowych typu D<sub>2</sub> i pozwalają sugerować, że desensytyzacja tych receptorów poprzez internalizację nie jest odpowiedzialna za obserwowane zmiany. Można przypuszczać, że występuje inny mechanizm odpowiedzialny za utratę funkcjonalności receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, np. związany z przekaźnictwem wewnątrzkomórkowym i polegający na odłączeniu efektorowych białek G (Doucet *et al.*, 2013) czy też zmian w sygnalizacji przez ścieżkę związaną z  $\beta$ -arrestyną (Gilsbach & Hein, 2012). Kolejną możliwością są modyfikacje oddziaływań pomiędzy receptorami  $\alpha_{2A}$ -adrenergicznymi (które wskazano jako kluczowe w regulacji uwalniania noradrenaliny w VTA) i receptorami NMDA – wykazano, że interakcja ta osłabia zależną od NMDA transmisję pobudzającą, poprzez zmniejszenie wewnątrzkomórkowej produkcji cAMP w komórkach zwojowych siatkówki (Dong *et al.*, 2008).

Podsumowując, przedstawione przez nas wyniki wskazują, że noradrenergiczna modulacja poziomu uwalnianej dopaminy w BLA zależna od aktywności receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA może być zmieniona w odpowiedzi na ostry stres poprzez utratę funkcjonalności tych receptorów na drodze innej niż internalizacja.

## **5. Ostry stres zwiększa poziom dopaminy i noradrenaliny w polu brzusznej nakrywki**

Przeprowadzając eksperymenty metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wykazano, że procedura warunkowania strachu z użyciem szoków elektrycznych zwiększa zarówno poziom dopaminy, jak i noradrenaliny w VTA. Co więcej, wzrost poziomu metabolitów dopaminy (DOPAC, 3MT i HVA) zaobserwowano nie tylko po procedurze z użyciem z szoków elektrycznych, które są bodźcami bezwarunkowymi (US), ale również po procedurze składającej się jedynie z bodźców neutralnych (światło i dźwięk), identycznych z używanymi w tym badaniu bodźcami warunkowymi (CS). Zmiany w stosunku metabolitów dopaminy do dopaminy mogą wskazywać na zwiększoną szybkość całkowitego katabolizmu (HVA/DA), a także wzrost szybkości utleniania dopaminy (DOPAC/DA) i O-metylacji (3MT/DA). Ponadto wyniki w grupie CS+US sugerują, że szok elektryczny zwiększa utlenianie dopaminy, co może potencjalnie skutkować zwiększoną ilością wolnych rodników i powodować śmierć neuronów dopaminergicznych w VTA (Meiser *et al.*, 2013). Zaobserwowane wyniki mogą świadczyć również o przejściowo podniesionym, w odpowiedzi na procedurę, poziomie dopaminy, która jednak do momentu zatrzymania reakcji poprzez zamrożenie tkanki została już częściowo zmetabolizowana. Jednakże podniesiony poziom dopaminy w VTA może być również wynikiem somatodendrytycznego uwalniania neuroprzekaźnika (Adell & Artigas, 2004; Rice & Patel, 2015) lub uwalniania dopaminy i noradrenaliny z zakończeń neuronów noradrenergicznych, które udowodniono wcześniej w innych strukturach (Devoto & Flore, 2006; Kempadoo *et al.*, 2016; Takeuchi *et al.*, 2016; Ranjbar-Slamloo & Fazlali, 2020). Przedstawione dane sugerują podwyższoną aktywność neuronów dopaminergicznych w odpowiedzi na CS-US, zgodnie z danymi literaturowymi wskazującymi, że stres prowadzi do pobudzenia niektórych populacji neuronów dopaminergicznych w VTA (Anstrom & Woodward, 2005; Anstrom *et al.*, 2009; Brischoux *et al.*, 2009), a tym samym zwiększa poziom uwalniania dopaminy w strukturach przodomózgowia, takich jak NAc, AMY i mPFC (Finlay *et al.*, 1995; Di Chiara *et al.*, 1999;

Yadid *et al.*, 2001; Nestler & Carlezon, 2006; Lowes & Harris, 2022). W strukturach tych podniesiony poziom dopaminy pełni kluczową rolę w procesach uczenia się i pamięci związanej ze stresem (Oei & King, 1980; Guarraci & Kapp, 1999; Lisman *et al.*, 2011; Pignatelli & Bonci, 2015; Lee *et al.*, 2017).

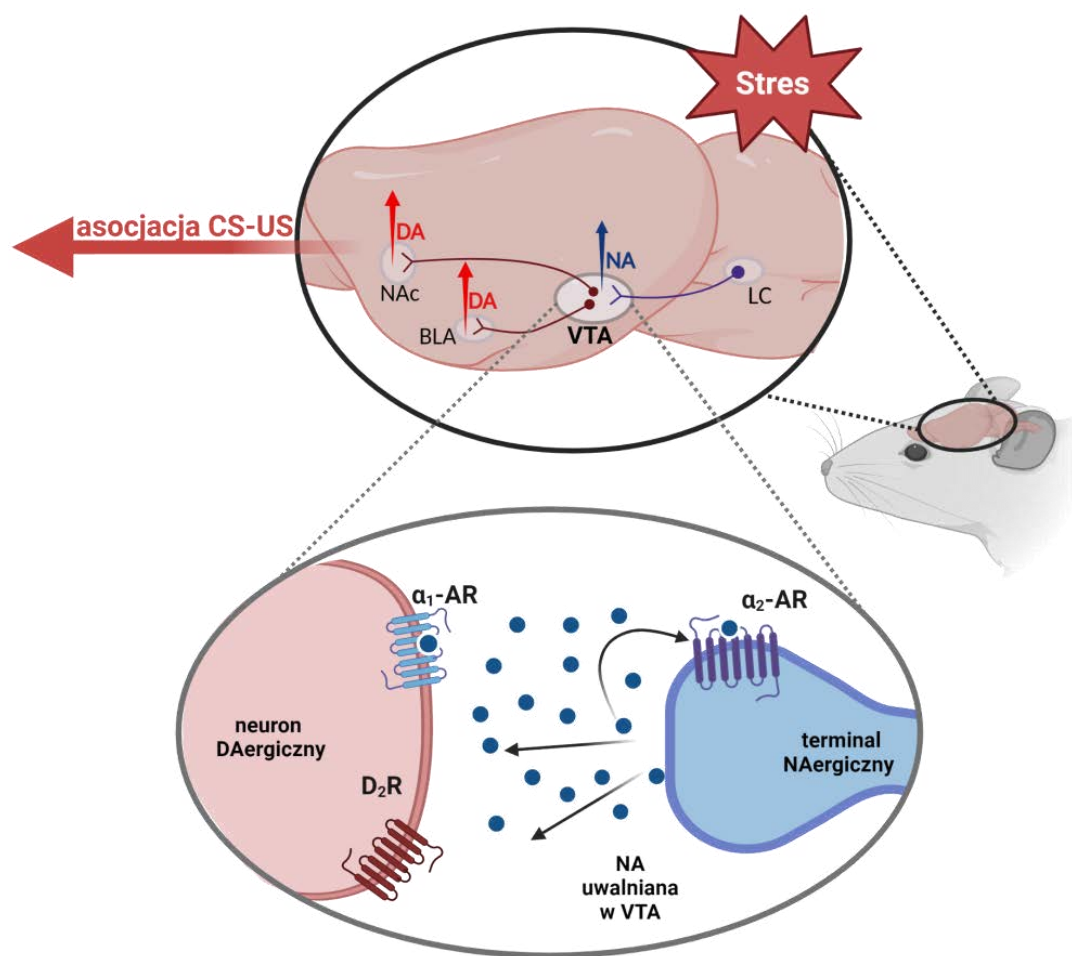
Co więcej, wykazano, że jedynie prezentacja bodźca bezwarunkowego, ale nie samego światła i dźwięku, prowadziła do wzrostu poziomu noradrenaliny w VTA oraz zmniejszenia tempa katabolizmu noradrenaliny mierzonego jako stosunek NMN/NA. Obserwacje te sugerują, że bodziec o dużym znaczeniu, taki jak ostry stresor w postaci szoku elektrycznego w łapę (a nie bodźce neutralne, takie jak światło i dźwięk), jest niezbędny do wzrostu aktywności noradrenergicznej w VTA. Dane literaturowe wskazują, że ostry stres zwiększa aktywność neuronów noradrenergicznych zlokalizowanych w LC (Cedarbaum & Aghajanian, 1978; Grant & Redmond, 1984; Abercrombie & Jacobs, 1987; Sara, 2009; McCall *et al.*, 2017), a w konsekwencji zwiększa uwalnianie noradrenaliny z zakończeń noradrenergicznych (Korf *et al.*, 1973; Finlay *et al.*, 1995; Berridge & Waterhouse, 2003; Park *et al.*, 2012; McCall *et al.*, 2017). Prawdopodobnym jest, że podobny mechanizm uwalniania noradrenaliny wywołany stresem ma miejsce na zakończeniach obecnych w VTA i zgodnie z naszą najlepszą wiedzą dane te stanowią pierwszą demonstrację aktywności noradrenergicznej w tej strukturze w odpowiedzi na szok elektryczny.

## **6. Podniesiony ton noradrenergiczny w polu brzusznej nakrywki, modulowany przez aktywność receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych, jest niezbędny do tworzenia pamięci strachu**

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów behawioralnych dowiedziono, że regulacja aktywności katecholaminergicznej przez receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne w VTA wpływa na tworzenie pamięci związanej ze strachem. Wykazano, że blokada receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA (przez domózgowe podanie RX-821002) bezpośrednio przed etapem nabywania pamięci strachu (przed sesją warunkowania pawłowskiego, w czasie której zwierzęta eksponowane są na bodźce bezwarunkowe – szoki elektryczne, w towarzystwie neutralnych bodźców środowiskowych – przyszłych bodźców warunkowych) znacznie zmniejsza uwarunkowane reakcje zneruchomienia (ang. *freezing*) wywołane przez ekspozycje na bodźce warunkowe (mierzone 24 godziny po warunkowaniu). Pozostaje przy tym bez wpływu na natychmiastowe uczenie się i reakcje w odpowiedzi na szok elektryczny w

etapie nabywania pamięci strachu, obserwowane jako brak różnic pomiędzy grupami we wzrastającym poziomie reakcji znieruchomienia w odpowiedzi na kolejne prezentacje światła i dźwięku. Sugeruje to niezaburzone uczenie się i prawidłową asocjację bodziec warunkowy – bodziec bezwarunkowy (CS-US) na poziomie pamięci krótkotrwałej. Zgodnie z tą obserwacją, blokada receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych przed etapem przywołania pamięci strachu również nie wpływała na reakcje znieruchomienia w odpowiedzi na CS, co wskazuje, że aktywność receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA nie jest niezbędna do prawidłowej ekspresji uwarunkowanego strachu, świadczącej o niezmienionych procesach związanych z przywołaniem nabytego śladu pamięciowego – pamięci doświadczenia szoków elektrycznych. Co więcej, nie zaobserwowano wpływu podania RX-821002 do VTA na aktywność lokomotoryczną i zachowania lękowe w teście otwartego pola. Wyniki te wskazują, że blokada receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA nie ma bezpośredniego wpływu na reakcje lękowe, aktywność lokomotoryczną i reakcje behawioralne na szok elektryczny oraz tworzenie pamięci krótkotrwałej, jednakże zaburza tworzenie pamięci długotrwałej poprzez, prawdopodobnie, zaburzenie prawidłowej asocjacji CS-US i jej konsolidacji.

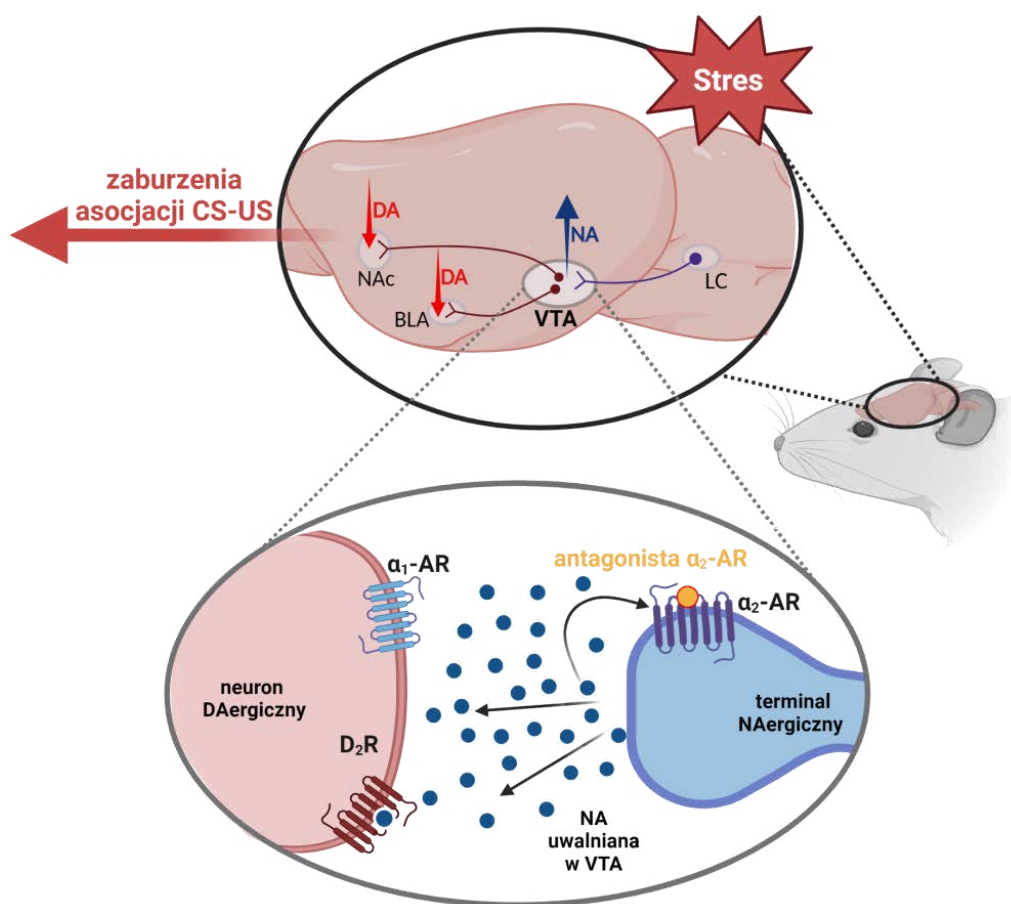
Jak wspomniano we wcześniejszych rozdziałach, receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne pełnią głównie funkcję autoreceptorów regulujących poziom uwalnianej noradrenaliny do VTA, a co za tym idzie ich aktywacja prowadzi do zmniejszenia poziomu uwalnianej noradrenaliny (Hein, Limbird, *et al.*, 1999; Trendelenburg *et al.*, 2003; Gilsbach & Hein, 2012). Na pierwszy rzut oka, zwiększone uwalnianie noradrenaliny w VTA powinno ułatwiać tworzenie śladu pamięciowego związanego ze stresem poprzez facylitację mechanizmów zależnych od aktywacji receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych w VTA (Solecki *et al.*, 2017) – mechanizm przedstawiono schematycznie na ryc. 13. We wcześniejszych badaniach wykazano, że blokada tych receptorów w VTA prowadzi do zahamowania fazowo uwalnianej dopaminy zarówno w NAc i BLA (Kielbinski *et al.*, 2019, 2022) a także, że osłabia nabywanie pamięci strachu (Solecki *et al.*, 2017).



Ryc. 13 Poziom fazowo uwalnianej dopaminy (DA) w jądrze pólęczącym (NAc) i podstawno boczny jądrze migdałowatym (BLA) jest modulowany przez noradrenalinę (NA) uwalnianą w polu brzuszny nakrywki (VTA) działającą poprzez receptory  $\alpha_1$ -adrenergiczne ( $\alpha_1$ -AR) zlokalizowane, między innymi, na ciałach neuronów dopaminergicznych (neuron DAergiczny) co w sytuacji stresowej ułatwia asocjacje bodźców warunkowych (conditioned stimulus; CS) z bodźcami bezwarunkowymi (unconditioned stimulus, US).

W zastosowanych warunkach eksperymentalnych, połączenie szoku elektrycznego z blokadą receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA prawdopodobnie prowadzi do znacznego wzrostu w poziomie uwalnianej noradrenaliny w VTA w porównaniu ze stanem fizjologicznym wywołanym jedynie bodźcem stresowym (bez blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych). Obserwowane wyniki prawdopodobnie wywołane są wcześniej proponowanym mechanizmem krzyżowej aktywacji receptorów dopaminowych typu D<sub>2</sub> przez wysoki poziom noradrenaliny w strukturze (Guiard *et al.*, 2008; Sánchez-Soto *et al.*, 2016; Kielbinski *et al.*, 2019, 2022; Bernacka *et al.*, 2022; Solecki *et al.*, 2022). Postulowana krzyżowa aktywacja receptorów dopaminowych typu D<sub>2</sub> w wyniku zwiększonego uwalniania noradrenaliny przypuszczalnie prowadzi do obniżenia aktywności neuronów dopaminergicznych w VTA i zmniejszenia poziomu uwalnianej dopaminy do struktur takich

jak NAc i BLA (co wykazano w opisanych wcześniej eksperymentach elektrochemicznych-Kielbinski *et al.*, 2019, 2022; Bernacka *et al.*, 2022) – mechanizm przedstawiono schematycznie na ryc. 14. Zaproponowany mechanizm wyjaśniałby wpływ RX-821002 na konsolidację nowo nabytych wspomnień strachu (tj. wpływ blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych przed etapem nabywania pamięci strachu) i brak wpływu na już skonsolidowaną pamięć (tj. brak wpływu blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych przed etapem przywołania pamięci strachu).



Ryc. 14 Poziomo fazowo uwalnianej dopaminy (DA) w jądrze pólęczącym (NAc) i podstawno bocznych jądrze migdałowatym (BLA) jest obniżony przez noradrenalinę (NA) uwalnianą w polu brzusznej nakrywki (VTA) pod wpływem stresu i blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych ( $\alpha_2$ -AR). W wyniku aktywacji receptorów dopaminowych typu  $D_2$  ( $D_2R$ ) zlokalizowanych, między innymi, na ciałach neuronów dopaminergicznych (neuron DAergiczny) i prowadzi do zaburzeń w asocjacji bodźców warunkowych (conditioned stimulus; CS) z bodźcami bezwarunkowymi (unconditioned stimulus, US).

Opisane powyżej wyniki wskazują na nowe mechanizmy regulacyjne, poprzez które noradrenalina może wpływać na układ mezolimbiczny i modulować przekaźnictwo dopaminergiczne związane z procesami uczenia się i pamięci. Wykazano, że podwyższone



poziomy dopaminy zarówno w NAc, jak i BLA są niezbędne do asocjacyjnego uczenia się, czyli do prawidłowej asocjacji bodźców warunkowych z bezwarunkowymi (Nader & LeDoux, 1999; Dalley *et al.*, 2005; Day *et al.*, 2007). Dane literaturowe wskazują, że podanie antagonisty receptora dopaminowego D<sub>1</sub> do BLA powoduje zaburzenia w nabywaniu pamięci strachu (Lamont & Kokkinidis, 1998; Guarraci *et al.*, 1999, 2000; Nader & LeDoux, 1999; Heath *et al.*, 2015), podczas gdy agonista tych receptorów, podawany przed sesją nabywania, zwiększa ekspresję strachu (Guarraci *et al.*, 2000). Co więcej, wykazano również, że hamowanie neuronów dopaminergicznych w VTA projektujących do AMY, jak również bezpośrednie hamowanie aksonów tych komórek w samym AMY podczas sesji asocjacji CS-US, znacznie osłabia tworzenie pamięci strachu (de Oliveira *et al.*, 2011). Badania te dostarczają mocnych dowodów na to, że odpowiedni poziom dopaminy w BLA jest niezbędny do tworzenia pamięci strachu.

Co więcej, inne badania wskazują, że podwyższone poziomy dopaminy w NAc również są kluczowe do prawidłowej asocjacji CS-US (Salamone & Correa, 2002; Martinez *et al.*, 2008). W badaniu przeprowadzonym przez Fadok i in., przy użyciu modelu myszy z niedoborem dopaminy, autorzy wykazali, że przywrócenie syntezy dopaminy w neuronach projektujących z VTA do NAc i BLA jest niezbędne do tworzenia pamięci długotrwałej związanej ze strachem (Fadok *et al.*, 2010). Sygnalizacja dopaminergiczna w przodomózgowiu aktywuje syntezę białek związanych z plastycznością neuronalną, niezbędnych do długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) i jest niezbędna do nabywania pamięci strachu (Oei & King, 1980; Guarraci *et al.*, 1999, 2000; Lisman *et al.*, 2011; Pignatelli & Bonci, 2015; Lee *et al.*, 2017).

Podsumowując, przedstawione dane sugerują że skutki blokady receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA są specyficzne dla tej struktury i różnią się od efektów podawania ogólnoustrojowego lub bezpośrednio do AMY (Gallagher & Kapp, 1981; Gazarini *et al.*, 2013). Wyniki te uzupełniają dowody na to, że oprócz dobrze znanych efektów związanych z pamięcią w strukturach przodomózgowia, noradrenalina może działać w VTA jako modulator mezolimbicznej sygnalizacji dopaminergicznej zaangażowanej w asocjacje bodźców i tworzenie pamięci długotrwałej.

## 7. Podsumowanie i wnioski

W niniejszej rozprawie opartej na cyklu prac oraz przedstawionych badaniach dodatkowych wykazano istotne znaczenie układu noradrenergicznego w VTA dla regulacji uwalniania dopaminy do struktur przodomózgowia, wrażliwość tej noradrenergicznej modulacji na czynniki stresowe, a także jej udział w procesie nabywania pamięci strachu.

Uzyskane wyniki wskazują, że poziom aktywności receptorów zarówno  $\alpha_1$ - jak i  $\alpha_2$ -adrenergicznych w VTA wpływa na uwalnianie dopaminy w strukturach przodomózgowia (NAc i BLA). Jednakże główną rolę w regulacji uwalniania noradrenaliny do VTA, a tym samym regulacji uwalniania dopaminy do przodomózgowia, pełni podtyp  $\alpha_{2A}$ -receptorów adrenergicznych.

Co więcej, prezentowane badania wskazują na VTA jako miejsce istotnych, związanych ze stresem, zmian w układzie katecholaminergicznym. Procesy te mogą mieć znaczenie dla rozwoju patofizjologii takich jak zaburzenia afektywne, PTSD czy zaburzenia związane z przyjmowaniem substancji uzależniających (Sofuoglu & Sewell, 2009; Belujon & Grace, 2017; Caccamise *et al.*, 2021; Koob, 2021). Uzyskane w niniejszej rozprawie dane, a także nasze wcześniejsze badania, sugerują, że sygnalizacja noradrenergiczna w VTA może mieć znaczącą rolę w kodowaniu istotności bodźców środowiskowych i wpływać na uczenie się i modulację odpowiedzi na bodźce warunkowe (Bernacka i Solecki, 2023).

Agoniści receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych są często wskazywani do leczenia uzależnień opioidowych, zaburzeń afektywnych i PTSD (Sofuoglu *et al.*, 2014; Gowing *et al.*, 2016; Upadhyay *et al.*, 2022). Jednocześnie jednak, próby leczenia z użyciem zarówno agonistów jak i antagonistów receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych dały jak dotąd niejednoznaczne wyniki (Porter & Bell, 1999; Holmes & Quirk, 2010; Soeter & Kindt, 2011a, 2011b; Wangelin *et al.*, 2013; Belkin & Schwartz, 2015; Tuerk *et al.*, 2018; Sperl *et al.*, 2022). Lepsze poznanie procesów neuroadaptacji w układzie noradrenergicznym w ośrodkowym układzie nerwowym może więc przelożyć się na przyszłe postępy w leczeniu. Warto również nadmienić, że leki specyficzne dla podtypu  $\alpha_{2A}$  receptorów adrenergicznych są zwykle lepiej tolerowane niż substancje mniej specyficzne, o działaniu na wszystkie podtypy receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych lub na receptory imidazolinowe (Gowing *et al.*, 2016). Zatem wyniki przedstawionych badań wskazujące, że to właśnie receptory  $\alpha_{2A}$ -adrenergiczne wydają się być dominującym podtypem autoreceptora w VTA, mogą okazać się przydatne w opracowywaniu lepszych leków.

Zprezentowane w niniejszej rozprawie badania posiadają jednak kilka ograniczeń. Po pierwsze, wszystkie opisane wyniki zostały uzyskane na podstawie eksperymentów przeprowadzonych jedynie na samcach szczurów. Istniejące dane donoszą o różnicach płciowych w układzie noradrenergicznym u zwierząt eksperymentalnych (Bangasser & Valentino, 2012, 2014; Cason *et al.*, 2016; den Hartog *et al.*, 2020; Bangasser & Cuarenta, 2021), a także wskazują płć jako istotny czynnik, który wpływa na występowanie zaburzeń związanych ze stresem, takich jak PTSD, u ludzi (Bangasser *et al.*, 2016; Koob, 2021; Upadhyay *et al.*, 2022). Dlatego też uwzględnienie w przyszłości prawdopodobnych różnic płciowych w noradrenergicznej modulacji uwalniania dopaminy do przodomózgowia wydaje się szczególnie ważnym zagadnieniem. Po drugie, chociaż przeprowadzone badania elektrochemiczne połączone z badaniami farmakologicznymi u uśpionych zwierząt pozwalają na wgląd w specyficzne mechanizmy katecholaminergicznej modulacji w VTA i przodomózgowiu, stanowią one jedynie interesujący wstęp do dalszej weryfikacji i rozszerzenia opisanych obserwacji u wolnochojących zwierząt. Dodatkowo, nowoczesne techniki molekularne, takie jak genetycznie zaprogramowane sensory katecholamin oraz opsyny, otwierają szereg dalszych możliwości. Przykładowo – selektywne pomiary i manipulację poszczególnymi populacjami neuronów, na przykład dopaminergicznych. W połączeniu z wykorzystaniem wektorów wirusowych retro- lub anterogradnych, możliwe będzie również zbadanie anatomii funkcjonalnej tych połączeń – jak chociażby manipulacja optogenetyczna aktywnością neuronów dopaminergicznych projektujących do określonej struktury. Ostatnim, trzecim aspektem, jest przeprowadzenie dalszych i bardziej szczegółowych badań molekularnych dotyczących zmian, którym ulega przekaźnictwo wewnątrzkomórkowe zależne od receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych pod wpływem stresu.

# Bibliografia

- Abercrombie, E.D. & Jacobs, B.L. (1987) Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. II. Adaptation to chronically presented stressful stimuli. *J. Neurosci.*, **7**, 2844–2848.
- Adell, A. & Artigas, F. (2004) The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **28**, 415–431.
- Admon, R., Milad, M.R., & Hendler, T. (2013) A causal model of post-traumatic stress disorder: Disentangling predisposed from acquired neural abnormalities. *Trends Cogn. Sci.*, **17**, 337–347.
- Aghajanian, G.K. & Bunney, B.S. (1977) Dopamine“autoreceptors“: pharmacological characterization by microiontophoretic single cell recording studies. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, **297**, 1–7.
- Andén, N. -E, Fuxe, K., Hamberger, B., & Hökfelt, T. (1966) A Quantitative Study on the Nigro-Neostriatal Dopamine Neuron System in the Rat. *Acta Physiol. Scand.*, **67**, 306–312.
- Anstrom, K.K., Miczek, K.A., & Budygin, E.A. (2009) Increased phasic dopamine signaling in the mesolimbic pathway during social defeat in rats. *Neuroscience*, **161**, 3–12.
- Anstrom, K.K. & Woodward, D.J. (2005) Restraint increases dopaminergic burst firing in awake rats. *Neuropsychopharmacology*, **30**, 1832–1840.
- Arencibia-Albite, F., Paladini, C., Williams, J.T., & Jiménez-Rivera, C.A. (2007) Noradrenergic modulation of the hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroscience*, **149**, 303–314.
- Arnsten, A.F.T. (2000) Through the Looking Glass: Differential Noradrenergic Modulation of Prefrontal Cortical Function. *Neural Plast.*, **7**, 133–146.
- Aston-Jones, G., Chiang, C., & Alexinsky, T. (1991) Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Prog. Brain Res.*, **88**, 501–520.
- Aston-Jones, G. & Cohen, J.D. (2005) An Integrative Theory of Locus Coeruleus-Norepinephrine Function: Adaptive Gain and Optimal Performance. *Annu. Rev. Neurosci.*, **28**, 403–450.
- Aston-Jones, G. & Waterhouse, B. (2016) Locus coeruleus: From global projection system to adaptive regulation of behavior. *Brain Res.*, **1645**, 75–78.
- Bangasser, D.A. & Cuarenta, A. (2021) Sex differences in anxiety and depression: circuits and mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 2021 2211, **22**, 674–684.
- Bangasser, D.A. & Valentino, R.J. (2012) Sex Differences in Molecular and Cellular Substrates of Stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2012 325, **32**, 709–723.
- Bangasser, D.A. & Valentino, R.J. (2014) Sex differences in stress-related psychiatric disorders: Neurobiological perspectives. *Front. Neuroendocrinol.*, **35**, 303–319.

- Bangasser, D.A., Wiersielis, K.R., & Khantsis, S. (2016) Sex differences in the locus coeruleus-norepinephrine system and its regulation by stress. *Brain Res.*, **1641**, 177–188.
- Beckley, J.T., Evins, C.E., Fedarovich, H., Gilstrap, M.J., & Woodward, J.J. (2013) Medial Prefrontal Cortex Inversely Regulates Toluene-Induced Changes in Markers of Synaptic Plasticity of Mesolimbic Dopamine Neurons. *J. Neurosci.*, **33**, 804–813.
- Belkin, M.R. & Schwartz, T.L. (2015) Alpha-2 receptor agonists for the treatment of posttraumatic stress disorder. *Drugs Context*, **4**.
- Belujon, P. & Grace, A.A. (2017) Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **20**, 1036–1046.
- Bernacka, J., Kielbinski, M., Wawrzczak-Bargiela, A., Zajda, K., Mackowiak, M., Przewlocki, R., & Solecki, W. (2022) Alpha-2A but not 2B/C noradrenergic receptors in ventral tegmental area regulate phasic dopamine release in nucleus accumbens core. *Neuropharmacology*, **220**, 109258.
- Berridge, C.W., Schmeichel, B.E., & España, R.A. (2012) Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal. *Sleep Med. Rev.*, **16**, 187–197.
- Berridge, C.W., Stratford, T.L., Foote, S.L., & Kelley, A.E. (1997) Distribution of Dopamine-Hydroxylase-Like Immunoreactive Fibers Within the Shell Subregion of the Nucleus Accumbens. *Synapse*, **27**, 230–241.
- Berridge, C.W. & Waterhouse, B.D. (2003) The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Rev.*, **42**, 33–84.
- Berridge, K.C. (2007) The debate over dopamine’s role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl.)*, **191**, 391–431.
- Berridge, K.C. & Robinson, T.E. (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **28**, 309–369.
- Betke, K.M., Wells, C.A., & Hamm, H.E. (2012) GPCR mediated regulation of synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.*, **96**, 304–321.
- Borodovitsyna, O., Flamini, M.D., & Chandler, D.J. (2018) Acute Stress Persistently Alters Locus Coeruleus Function and Anxiety-like Behavior in Adolescent Rats. *Neuroscience*, **373**, 7–19.
- Borodovitsyna, O., Joshi, N., & Chandler, D. (2018) Persistent stress-induced neuroplastic changes in the locus coeruleus/norepinephrine system. *Neural Plast.*, **2018**.
- Bouret, S., Ravel, S., & Richmond, B.J. (2012) Complementary neural correlates of motivation in dopaminergic and noradrenergic neurons of monkeys. *Front. Behav. Neurosci.*, **6**:40.
- Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I., & Ungless, M.A. (2009) Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 4894–4899.

- Bünemann, M., Bücheler, M.M., Philipp, M., Lohse, M.J., & Hein, L. (2001) Activation and Deactivation Kinetics of  $\alpha$ 2A- and  $\alpha$ 2C-Adrenergic Receptor-activated G Protein-activated Inwardly Rectifying K<sup>+</sup> Channel Currents. *J. Biol. Chem.*, **276**, 47512–47517.
- Caccamisse, A., Van Newenhizen, E., & Mantsch, J.R. (2021) Neurochemical mechanisms and neurocircuitry underlying the contribution of stress to cocaine seeking. *J. Neurochem.*, **157**, 1697–1713.
- Calhoun, G.G. & Tye, K.M. (2015) Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat. Neurosci.* *2015 1810*, **18**, 1394–1404.
- Cardinal, R.N., Parkinson, J.A., Hall, J., & Everitt, B.J. (2002) Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **26**, 321–352.
- Cason, A.M., Kohtz, A., & Aston-Jones, G. (2016) Role of Corticotropin Releasing Factor 1 Signaling in Cocaine Seeking during Early Extinction in Female and Male Rats. *PLoS One*, **11**, e0158577.
- Cathala, L., Guyon, A., Eugene, D., & Paupardin-Tritsch, D. (2002)  $\alpha$ 2-Adrenoceptor activation increases a cationic conductance and spontaneous GABAergic synaptic activity in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra. *Neuroscience*, **115**, 1059–1065.
- Cedarbaum, J.M. & Aghajanian, G.K. (1978) Activation of locus coeruleus neurons by peripheral stimuli: Modulation by a collateral inhibitory mechanism. *Life Sci.*, **23**, 1383–1392.
- Charney, D.S. (2004) Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. *Am. J. Psychiatry*, **161**, 195–216.
- Dahlstroem, A. & Fuxe, K. (1964) Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. II. Experimentally induced changes in the intraneuronal amine levels of bulbospinal neuron system. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, SUPPL 247:1-36.
- Dahlström, A. & Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, **20**, 398–399.
- Dalley, J.W., Lääne, K., Theobald, D.E.H., Armstrong, H.C., Corlett, P.R., Chudasama, Y., & Robbins, T.W. (2005) Time-limited modulation of appetitive Pavlovian memory by D1 and NMDA receptors in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 6189–6194.
- Daviu, N., Bruchas, M.R., Moghaddam, B., Sandi, C., & Beyeler, A. (2019) Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiol. Stress*, **11**, 100191.
- Day, J.J., Roitman, M.F., Wightman, R.M., & Carelli, R.M. (2007) Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* *2007 108*, **10**, 1020–1028.
- de la Mora, M.P., Gallegos-Cari, A., Arizmendi-García, Y., Marcellino, D., & Fuxe, K. (2010) Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Prog. Neurobiol.*, **90**, 198–216.

- de Oliveira, A.R., Reimer, A.E., Macedo, C.E.A. de, Carvalho, M.C. de, Silva, M.A. de S., & Brandão, M.L. (2011) Conditioned fear is modulated by D2 receptor pathway connecting the ventral tegmental area and basolateral amygdala. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **95**, 37–45.
- Deal, A.L., Park, J., Weiner, J.L., & Budygin, E.A. (2021) Stress Alters the Effect of Alcohol on Catecholamine Dynamics in the Basolateral Amygdala. *Front. Behav. Neurosci.*, **15**, 69.
- Del Campo, N., Chamberlain, S.R., Sahakian, B.J., & Robbins, T.W. (2011) The Roles of Dopamine and Noradrenaline in the Pathophysiology and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol. Psychiatry*, **69**, e145–e157.
- Delfs, J.M., Zhu, Y., Druhan, J.P., & Aston-Jones, G.S. (1998) Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res.*, **806**, 127–140.
- den Hartog, C.R., Blandino, K.L., Nash, M.K.L., Sjogren, E.R., Grampetro, M.A., Moorman, D.E., & Vazey, E.M. (2020) Noradrenergic tone mediates marble burying behavior after chronic stress and ethanol. *Psychopharmacology (Berl.)*, **237**, 3021–3031.
- Der-Avakian, A. & Markou, A. (2012) The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci.*, **35**, 68–77.
- Devoto, P. & Flore, G. (2006) On the Origin of Cortical Dopamine: Is it a Co-Transmitter in Noradrenergic Neurons? *Curr. Neuropharmacol.*, **4**, 115–125.
- Devoto, P., Flore, G., Longu, G., Pira, L., & Gessa, G.L. (2003) Origin of extracellular dopamine from dopamine and noradrenaline neurons in the medial prefrontal and occipital cortex. *Synapse*, **50**, 200–205.
- Devoto, P., Flore, G., Pani, L., & Gessa, G.L. (2001) Evidence for co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *Mol. Psychiatry* **2001** *66*, **6**, 657–664.
- Devoto, P., Flore, G., Saba, P., Fà, M., & Gessa, G.L. (2005) Co-release of noradrenaline and dopamine in the cerebral cortex elicited by single train and repeated train stimulation of the locus coeruleus. *BMC Neurosci.*, **6**, 1–11.
- Di Chiara, G., Loddo, P., & Tanda, G. (1999) Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: Implications for the psychobiology of depression. *Biol. Psychiatry*, **46**, 1624–1633.
- Dong, C.J., Guo, Y., Agey, P., Wheeler, L., & Hare, W.A. (2008) Alpha2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 4515–4522.
- Doucet, E.L., Bobadilla, A.C., Houades, V., Lanteri, C., Godeheu, G., Lanfumey, L., Sara, S.J., & Tassin, J.P. (2013) Sustained impairment of  $\alpha$ 2A-adrenergic autoreceptor signaling mediates neurochemical and behavioral sensitization to amphetamine. *Biol. Psychiatry*, **74**, 90–98.
- Douma, E.H. & de Kloet, E.R. (2020) Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **108**, 48–77.

- Eisenhofer, G., Kopin, I.J., & Goldstein, D.S. (2004) Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacol. Rev.*, **56**, 331–349.
- Etkin, A. & Wager, T.D. (2007) Functional neuroimaging of anxiety: A meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *Am. J. Psychiatry*, **164**, 1476–1488.
- Fadok, J.P., Darvas, M., Dickerson, T.M.K., & Palmiter, R.D. (2010) Long-Term Memory for Pavlovian Fear Conditioning Requires Dopamine in the Nucleus Accumbens and Basolateral Amygdala. *PLoS One*, **5**, e12751.
- Fallon, J.H., Koziell, D.A., & Moore, R.Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *J. Comp. Neurol.*, **180**, 509–531.
- Feltenstein, M.W. & See, R.E. (2008) The neurocircuitry of addiction: an overview. *Br. J. Pharmacol.*, **154**, 261–274.
- Ferry, B., Roozendaal, B., & McGaugh, J.L. (1999) Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biol. Psychiatry*, **46**, 1140–1152.
- Finlay, J.M., Zigmond, M.J., & Abercrombie, E.D. (1995) Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: Effects of diazepam. *Neuroscience*, **64**, 619–628.
- Ford, C.P., Mark, G.P., & Williams, J.T. (2006) Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. *J. Neurosci.*, **26**, 2788–2797.
- Fox, M.E., Isaac Studebaker, R., Swofford, N.J., & Wightman, R.M. (2015) Stress and drug dependence differentially modulate norepinephrine signaling in animals with varied HPA axis function. *Neuropsychopharmacology*, **40**, 1752–1761.
- Frick, A., Björkstrand, J., Lubberink, M., Eriksson, A., Fredrikson, M., & Åhs, F. (2021) Dopamine and fear memory formation in the human amygdala. *Mol. Psychiatry* **2021** 273, **27**, 1704–1711.
- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., & Caron, M.G. (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu. Rev. Neurosci.*, **27**, 107–144.
- Gallagher, M. & Kapp, B.S. (1981) Effect of phentolamine administration into the amygdala complex of rats on time-dependent memory processes. *Behav. Neural Biol.*, **31**, 90–95.
- Gazarini, L., Jark Stern, C.A., Carobrez, A.P., & Bertoglio, L.J. (2013) Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -adrenergic receptors. *Learn. Mem.*, **20**, 210–219.
- Gilsbach, R. & Hein, L. (2012) Are the pharmacology and physiology of  $\alpha$ 2-adrenoceptors determined by  $\alpha$ 2-heteroreceptors and autoreceptors respectively? *Br. J. Pharmacol.*, **165**, 90–102.



- Giustino, T.F. & Maren, S. (2018) Noradrenergic modulation of fear conditioning and extinction. *Front. Behav. Neurosci.*, **12**, 1–20.
- Goertz, R.B., Wanat, M.J., Gomez, J.A., Brown, Z.J., Phillips, P.E.M., & Paladini, C.A. (2015) Cocaine Increases Dopaminergic Neuron and Motor Activity via Midbrain  $\alpha 1$  Adrenergic Signaling. *Neuropsychopharmacology*, **40**, 1151–1162.
- Gowing, L., Farrell, M., Ali, R., & White, J.M. (2016) Alpha2-adrenergic agonists for the management of opioid withdrawal. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2016**.
- Grace, A.A. (1995) The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function. *Drug Alcohol Depend.*, **37**, 111–129.
- Grace, A.A. (2016) Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nat. Rev. Neurosci.*, **17**, 524–532.
- Grace, A.A. & Bunney, B.S. (1984a) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J. Neurosci.*, **4**, 2866–2876.
- Grace, A.A. & Bunney, B.S. (1984b) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J. Neurosci.*, **4**, 2877–2890.
- Grant, S.J. & Redmond, D.E. (1984) Neuronal activity of the locus ceruleus in awake Macaca arctoides. *Exp. Neurol.*, **84**, 701–708.
- Grenhoff, J., Nisell, M., Ferré, S., Aston-Jones, G., & Svensson, T.H. (1993) Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, **93**, 11–25.
- Grenhoff, J., North, R.A., & Johnson, S.W. (1995) Alpha 1-adrenergic effects on dopamine neurons recorded intracellularly in the rat midbrain slice. *Eur. J. Neurosci.*, **7**, 1707–1713.
- Grenhoff, J. & Svensson, T.H. (1988) Clonidine regularizes substantia nigra dopamine cell firing. *Life Sci.*, **42**, 2003–2009.
- Grenhoff, J. & Svensson, T.H. (1989) Clonidine modulates dopamine cell firing in rat ventral tegmental area. *Eur. J. Pharmacol.*, **165**, 11–18.
- Grenhoff, J. & Svensson, T.H. (1993) Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area. *Eur. J. Pharmacol.*, **233**, 79–84.
- Guarraci, F.A., Frohardt, R.J., Falls, W.A., & Kapp, B.S. (2000) The effects of intra-amygdaloid infusions of a D2 dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning. *Behav. Neurosci.*, **114**, 647–651.
- Guarraci, F.A., Frohardt, R.J., & Kapp, B.S. (1999) Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. *Brain Res.*, **827**, 28–40.
- Guarraci, F.A. & Kapp, B.S. (1999) An electrophysiological characterization of ventral tegmental area dopaminergic neurons during differential pavlovian fear conditioning in the awake rabbit. *Behav. Brain Res.*, **99**, 169–179.
- Guiard, B.P., El Mansari, M., & Blier, P. (2008) Cross-Talk between Dopaminergic and

- Noradrenergic Systems in the Rat Ventral Tegmental Area, Locus Ceruleus, and Dorsal Hippocampus. *Mol. Pharmacol.*, **74**, 1463–1475.
- Guyenet, P.G. (1991) Central noradrenergic neurons: the autonomic connection. *Prog. Brain Res.*, **88**, 365–380.
- Heath, F.C., Jurkus, R., Bast, T., Pezze, M.A., Lee, J.L.C., Voigt, J.P., & Stevenson, C.W. (2015) Dopamine D1-like receptor signalling in the hippocampus and amygdala modulates the acquisition of contextual fear conditioning. *Psychopharmacology (Berl.)*, **232**, 2619.
- Hein, L. (2006) Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res.*, **326**, 541–551.
- Hein, L., Altman, J.D., & Kobilka, B.K. (1999) Two functionally distinct  $\alpha$ 2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nat.* 1999 4026758, **402**, 181–184.
- Hein, L., Limbird, L.E., Eglen, R.M., & Kobilka, B.K. (1999) Gene Substitution/Knockout to Delineate the Role of  $\alpha$ 2-Adrenoceptor Subtypes in Mediating Central Effects of Catecholamines and Imidazolines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **881**, 265–271.
- Hirschberg, S., Li, Y., Randall, A., Kremer, E.J., & Pickering, A.E. (2017) Functional dichotomy in spinal-vs prefrontal-projecting locus coeruleus modules splits descending noradrenergic analgesia from ascending aversion and anxiety in rats. *Elife*, **6**.
- Holly, E.N. & Miczek, K.A. (2015) Ventral tegmental area dopamine revisited: effects of acute and repeated stress. *Psychopharmacol.* 2015 2332, **233**, 163–186.
- Holmes, A. & Quirk, G.J. (2010) Pharmacological facilitation of fear extinction and the search for adjunct treatments for anxiety disorders - the case of yohimbine. *Trends Pharmacol. Sci.*, **31**, 2–7.
- Ikemoto, S. (2007) Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle complex. *Brain Res. Rev.*, **56**, 27–78.
- Inyushin, M.U., Arencibia-Albite, F., Vázquez-Torres, R., Vélez-Hernández, M.E., & Jiménez-Rivera, C.A. (2010) Alpha-2 noradrenergic receptor activation inhibits the hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in neurons of the ventral tegmental area. *Neuroscience*, **167**, 287.
- Jiménez-Rivera, C.A., Figueroa, J., Vázquez-Torres, R., Vélez-Hernandez, M.E., Schwarz, D., Velásquez-Martinez, M.C., & Arencibia-Albite, F. (2012) Presynaptic inhibition of glutamate transmission by  $\alpha$ 2 receptors in the VTA. *Eur. J. Neurosci.*, **35**, 1406–1415.
- Josselyn, S.A. & Frankland, P.W. (2018) Memory Allocation: Mechanisms and Function. *Annu. Rev. Neurosci.*, **41**, 389–413.
- Kempadoo, K.A., Mosharov, E. V., Choi, S.J., Sulzer, D., & Kandel, E.R. (2016) Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **113**, 14835–14840.
- Kielbinski, M., Bernacka, J., & Solecki, W.B. (2019) Differential regulation of phasic dopamine release in the forebrain by the VTA noradrenergic receptor signaling. *J.*

*Neurochem.*, **149**, 747-759.

- Kielbinski, M., Bernacka, J., Zajda, K., Wawrzczak-Bargieła, A., Maćkowiak, | Marzena, Przewlocki, | Ryszard, & Solecki, W. (2022) Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit. *J. Neurochem.*, **00**, 1–15.
- Kobayashi, K. (2001) Role of Catecholamine Signaling in Brain and Nervous System Functions: New Insights from Mouse Molecular Genetic Study. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.*, **6**, 115–121.
- Koob, G.F. (2014) Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models. *Handb. Clin. Neurol.*, **125**, 33–54.
- Koob, G.F. (2021) Drug Addiction: Hyperkatifeia/Negative Reinforcement as a Framework for Medications Development. *Pharmacol. Rev.*, **73**, 163–201.
- Koob, G.F., Buck, C.L., Cohen, A., Edwards, S., Park, P.E., Schlosburg, J.E., Schmeichel, B., Vendruscolo, L.F., Wade, C.L., Whitfield, T.W., & George, O. (2014) Addiction as a stress surfeit disorder. *Neuropharmacology*, **76**, 370–382.
- Koob, G.F. & Volkow, N.D. (2010) Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, **35**, 217–238.
- Koob, G.F. & Volkow, N.D. (2016) Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The lancet. Psychiatry*, **3**, 760–773.
- Korf, J., Aghajanian, G.K., & Roth, R.H. (1973) Increased turnover of norepinephrine in the rat cerebral cortex during stress: Role of the locus coeruleus. *Neuropharmacology*, **12**, 933–938.
- Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B., & Roeper, J. (2008) Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron*, **57**, 760–773.
- Lammel, S., Ion, D.I., Roeper, J., & Malenka, R.C. (2011) Projection-Specific Modulation of Dopamine Neuron Synapses by Aversive and Rewarding Stimuli. *Neuron*, **70**, 855–862.
- Lammel, S., Lim, B.K., & Malenka, R.C. (2014) Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology*, **351-359**.
- Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K., & Malenka, R.C. (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, **491**, 212–217.
- Lamont, E.W. & Kokkinidis, L. (1998) Infusion of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm. *Brain Res.*, **795**, 128–136.
- Le Moal, M. & Simon, H. (1991) Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. <https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.1.155>, **71**, 155–234.
- Lee, A., Wissekerke, A.E., Rosin, D.L., & Lynch, K.R. (1998) Localization of  $\alpha_2c$ -adrenergic receptor immunoreactivity in catecholaminergic neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience*, **84**, 1085–1096.

- Lee, J.H., Lee, S., & Kim, J.H. (2017) Amygdala Circuits for Fear Memory: A Key Role for Dopamine Regulation. *Neuroscientist*, **23**, 542–553.
- Linnér, L., Endersz, H., Öhman, D., Bengtsson, F., Schalling, M., & Svensson, T.H. (2001) Reboxetine Modulates the Firing Pattern of Dopamine Cells in the Ventral Tegmental Area and Selectively Increases Dopamine Availability in the Prefrontal Cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**.
- Lisman, J., Grace, A.A., & Duzel, E. (2011) A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends Neurosci.*, **34**, 536–547.
- Lowes, D.C. & Harris, A.Z. (2022) Stressed and wired: The effects of stress on the VTA circuits underlying motivated behavior. *Curr. Opin. Endocr. Metab. Res.*, **26**.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., & Heim, C. (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009 106, **10**, 434–445.
- MacDonald, E. & Scheinin, M. (1995) Distribution and pharmacology of alpha 2-adrenoceptors in the central nervous system. *J. Physiol. Pharmacol.*, **46**, 241–58.
- Margolis, E.B., Lock, H., Hjelmstad, G.O., & Fields, H.L. (2006) The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J. Physiol.*, **577**, 907–924.
- Margolis, E.B., Mitchell, J.M., Ishikawa, J., Hjelmstad, G.O., & Fields, H.L. (2008) Midbrain Dopamine Neurons: Projection Target Determines Action Potential Duration and Dopamine D2 Receptor Inhibition. *J. Neurosci.*, **28**, 8908–8913.
- Marinelli, M. & McCutcheon, J.E. (2014) Heterogeneity of dopamine neuron activity across traits and states. *Neuroscience*, **282**, 176–197.
- Martinez, R.C.R., Oliveira, A.R., Macedo, C.E., Molina, V.A., & Brandão, M.L. (2008) Involvement of dopaminergic mechanisms in the nucleus accumbens core and shell subregions in the expression of fear conditioning. *Neurosci. Lett.*, **446**, 112–116.
- Masana, M., Bortolozzi, A., & Artigas, F. (2011) Selective enhancement of mesocortical dopaminergic transmission by noradrenergic drugs: Therapeutic opportunities in schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **14**, 53–68.
- McCall, J.G., Siuda, E.R., Bhatti, D.L., Lawson, L.A., McElligott, Z.A., Stuber, G.D., & Bruchas, M.R. (2017) Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior. *Elife*, **6**, e18247.
- McElligott, Z.A., Fox, M.E., Walsh, P.L., Urban, D.J., Ferrel, M.S., Roth, B.L., & Mark Wightman, R. (2013) Noradrenergic Synaptic Function in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Varies in Animal Models of Anxiety and Addiction. *Neuropsychopharmacology*, **38**, 1665.
- Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013) Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signal.*, **11**, 1–18.
- Mejias-Aponte, C.A. (2016) Specificity and impact of adrenergic projections to the midbrain dopamine system. *Brain Res.*, **1641**, 258–273.

- Mejías-Aponte, C.A., Drouin, C., & Aston-Jones, G. (2009) Adrenergic and noradrenergic innervation of the midbrain ventral tegmental area and retrorubral field: prominent inputs from medullary homeostatic centers. *J. Neurosci.*, **29**, 3613–3626.
- Missale, C., Russel Nash, S., Robinson, S.W., Jaber, M., & Caron, M.G. (1998) Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol. Rev.*, **78**, 189–225.
- Mitrano, D.A., Schroeder, J.P., Smith, Y., Cortright, J.J., Bubula, N., Vezina, P., & Weinschenker, D. (2012) Alpha-1 adrenergic receptors are localized on presynaptic elements in the nucleus accumbens and regulate mesolimbic dopamine transmission. *Neuropsychopharmacology*, **37**, 2161–2172.
- Morales, M. & Margolis, E.B. (2017) Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 73–85.
- Morilak, D.A., Barrera, G., Echevarria, D.J., Garcia, A.S., Hernandez, A., Ma, S., & Petre, C.O. (2005) Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, **29**, 1214–1224.
- Nader, K. & LeDoux, J.E. (1999) Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. *Behav. Neurosci.*, **113**, 891–901.
- Nair-Roberts, R.G., Chatelain-Badie, S.D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J.P., & Ungless, M.A. (2008) Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*, **152**, 1024–1031.
- Nestler, E.J. & Carlezon, W.A. (2006) The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biol. Psychiatry*, **59**, 1151–1159.
- Neve, K.A., Seamans, J.K., & Trantham-Davidson, H. (2004) Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **24**, 165–205.
- Oei, T.P.S. & King, M.G. (1980) Catecholamines and aversive learning: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **4**, 161–173.
- Paladini, C.A. & Williams, J.T. (2004) Noradrenergic inhibition of midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.*, **24**, 4568–4575.
- Park, J., Wheeler, R.A., Fontillas, K., Keithley, R.B., Carelli, R.M., & Wightman, R.M. (2012) Catecholamines in the bed nucleus of the stria terminalis reciprocally respond to reward and aversion. *Biol. Psychiatry*, **71**, 327–334.
- Park, J.W., Bhimani, R. V., & Park, J. (2017) Noradrenergic Modulation of Dopamine Transmission Evoked by Electrical Stimulation of the Locus Coeruleus in the Rat Brain. *ACS Chem. Neurosci.*, **8**, 1913–1924.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2013) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th edn, Academic Press. Amsterdam Academic Press.
- Philipp, M. & Hein, L. (2004) Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.*, **101**, 65–74.
- Pignatelli, M. & Bonci, A. (2015) Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A

- Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron*, **86**, 1145–1157.
- Poe, G.R., Foote, S., Eschenko, O., Johansen, J.P., Bouret, S., Aston-Jones, G., Harley, C.W., Manahan-Vaughan, D., Weinshenker, D., Valentino, R., Berridge, C., Chandler, D.J., Waterhouse, B., & Sara, S.J. (2020) Locus coeruleus: a new look at the blue spot. *Nat. Rev. Neurosci.* 2020 2111, **21**, 644–659.
- Polter, A.M. & Kauer, J.A. (2014) Stress and VTA synapses: Implications for addiction and depression. *Eur. J. Neurosci.*, **39**, 1179–1188.
- Porter, D.M. & Bell, C.C. (1999) The use of clonidine in post-traumatic stress disorder. *J. Natl. Med. Assoc.*, **91**, 475.
- Poulin, J.F., Caronia, G., Hofer, C., Cui, Q., Helm, B., Ramakrishnan, C., Chan, C.S., Dombeck, D.A., Deisseroth, K., & Awatramani, R. (2018) Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nat. Neurosci.* 2018 219, **21**, 1260–1271.
- Poulin, J.F., Zou, J., Drouin-Ouellet, J., Kim, K.Y.A., Cicchetti, F., & Awatramani, R.B. (2014) Defining midbrain dopaminergic neuron diversity by single-cell gene expression profiling. *Cell Rep.*, **9**, 930–943.
- Pradel, K., Blasiak, T., & Solecki, W.B. (2018) Adrenergic Receptor Agonists' Modulation of Dopaminergic and Non-dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area. *Neuroscience*, **375**, 119–134.
- Ranjbar-Slamloo, Y. & Fazlali, Z. (2020) Dopamine and Noradrenaline in the Brain; Overlapping or Dissociate Functions? *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 334.
- Rasmussen, K., Morilak, D.A., & Jacobs, B.L. (1986) Single unit activity of locus coeruleus neurons in the freely moving cat: I. During naturalistic behaviors and in response to simple and complex stimuli. *Brain Res.*, **371**, 324–334.
- Reyes, B.A.S., Zitnik, G., Foster, C., van Bockstaele, E.J., & Valentino, R.J. (2015) Social Stress Engages Neurochemically-Distinct Afferents to the Rat Locus Coeruleus Depending on Coping Strategy. *eNeuro*, **2**.
- Rice, M.E. & Patel, J.C. (2015) Somatodendritic dopamine release: recent mechanistic insights. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **370**, 1–14.
- Rommelfanger, K.S., Mitrano, D.A., Smith, Y., & Weinshenker, D. (2009) Light and electron microscopic localization of alpha-1 adrenergic receptor immunoreactivity in the rat striatum and ventral midbrain. *Neuroscience*, **158**, 1530–1540.
- Ronzoni, G., del Arco, A., Mora, F., & Segovia, G. (2016) Enhanced noradrenergic activity in the amygdala contributes to hyperarousal in an animal model of PTSD. *Psychoneuroendocrinology*, **70**, 1–9.
- Roosendaal, B. & McGaugh, J.L. (2011) Memory modulation. *Behav. Neurosci.*, **125**, 797–824.
- Rosenkranz, J.A. & Grace, A.A. (2002) Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning. *Nature*, **417**, 282–287.

- Rosin, D.L., Zeng, D., Stornetta, R.L., Norton, F.R., Riley, T., Okusa, M.D., Guyenet, P.G., & Lynch, K.R. (1993) Immunohistochemical localization of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in catecholaminergic and other brainstem neurons in the rat. *Neuroscience*, **56**, 139–155.
- Sailer, U., Robinson, S., Fischmeister, F.P.S., König, D., Oppenauer, C., Lueger-Schuster, B., Moser, E., Kryspin-Exner, I., & Bauer, H. (2008) Altered reward processing in the nucleus accumbens and mesial prefrontal cortex of patients with posttraumatic stress disorder. *Neuropsychologia*, **46**, 2836–2844.
- Salamone, J.D. & Correa, M. (2002) Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav. Brain Res.*, **137**, 3–25.
- Samuels, E.R. & Szabadi, E. (2008) Functional Neuroanatomy of the Noradrenergic Locus Coeruleus: Its Roles in the Regulation of Arousal and Autonomic Function Part I: Principles of Functional Organisation. *Curr. Neuropharmacol.*, **6**, 235.
- Sánchez-Soto, M., Bonifazi, A., Cai, N.S., Ellenberger, M.P., Newman, A.H., Ferré, S., & Yano, H. (2016) Evidence for Noncanonical Neurotransmitter Activation: Norepinephrine as a Dopamine D2-Like Receptor Agonist. *Mol. Pharmacol.*, **89**, 457–466.
- Sara, S.J. (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009 103, **10**, 211–223.
- Sara, S.J. & Bouret, S. (2012) Orienting and Reorienting: The Locus Coeruleus Mediates Cognition through Arousal. *Neuron*, **76**, 130–141.
- Scheinin, M., Lomasney, J.W., Hayden-Hixson, D.M., Schambra, U.B., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., & Freneau, R.T. (1994) Distribution of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. *Mol. Brain Res.*, **21**, 133–149.
- Schmidt, K.T., Makhijani, V.H., Boyt, K.M., Cogan, E.S., Pati, D., Pina, M.M., Bravo, I.M., Locke, J.L., Jones, S.R., Besheer, J., & McElligott, Z.A. (2019) Stress-Induced Alterations of Norepinephrine Release in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis of Mice. *ACS Chem. Neurosci.*, **10**, 1908–1914.
- Schultz, W. (2007) Multiple Dopamine Functions at Different Time Courses. *Annu. Rev. Neurosci.*, **30**, 259–288.
- Schultz, W. (2010) Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav. Brain Funct.*, **6**: 24.
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P.R. (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science*, **275**, 1593–1599.
- Schwabe, L., Hermans, E.J., Joëls, M., & Roozendaal, B. (2022) Mechanisms of memory under stress. *Neuron*, **110**, 1450–1467.
- Sharp, B.M. (2017) Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction. *Transl. Psychiatry* 2017 78, **7**, e1194–e1194.
- Shin, L.M. & Liberzon, I. (2009) The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacol.* 2010 351, **35**, 169–191.

- Shnitko, T.A. & Robinson, D.L. (2014) Anatomical and pharmacological characterization of catecholamine transients in the medial prefrontal cortex evoked by ventral tegmental area stimulation. *Synapse*, **68**, 131–143.
- Smith, R.J. & Aston-Jones, G. (2008) Noradrenergic transmission in the extended amygdala: Role in increased drug-seeking and relapse during protracted drug abstinence. *Brain Struct. Funct.*, **213**, 43–61.
- Soeter, M. & Kindt, M. (2011a) Noradrenergic enhancement of associative fear memory in humans. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **96**, 263–271.
- Soeter, M. & Kindt, M. (2011b) Stimulation of the Noradrenergic System during Memory Formation Impairs Extinction Learning but not the Disruption of Reconsolidation. *Neuropsychopharmacol.* 2012 375, **37**, 1204–1215.
- Sofuoglu, M., Rosenheck, R., & Petrakis, I. (2014) Pharmacological treatment of comorbid PTSD and substance use disorder: Recent progress. *Addict. Behav.*, **39**, 428–433.
- Sofuoglu, M. & Sewell, R.A. (2009) Norepinephrine and stimulant addiction. *Addict. Biol.*, **14**, 119–129.
- Solecki, W.B., Kielbinski, M., Karwowska, K., Zajda, K., Wilczkowski, M., Rajfur, Z., & Przewłocki, R. (2019) Alpha1-adrenergic receptor blockade in the ventral tegmental area modulates conditional stimulus-induced cocaine seeking. *Neuropharmacology*, **158**, 107680.
- Solecki, W.B., Kielbinski, M., Wilczkowski, M., Zajda, K., Karwowska, K., Joanna, B., Rajfur, Z., & Przewłocki, R. (2022) Regulation of cocaine seeking behavior by locus coeruleus noradrenergic activity in the ventral tegmental area is time- and contingency-dependent. *Front. Neurosci.*, **16**:967969.
- Solecki, W.B., Szklarczyk, K., Klasa, A., Pradel, K., Dobrzański, G., & Przewłocki, R. (2017) Alpha 1 -adrenergic receptor blockade in the VTA modulates fear memories and stress responses. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **8**, 782–794.
- Solecki, W.B., Szklarczyk, K., Pradel, K., Kwiatkowska, K., Dobrzański, G., & Przewłocki, R. (2018) Noradrenergic signaling in the VTA modulates cocaine craving. *Addict. Biol.*, **23**, 596–609.
- Sperl, M.F.J., Panitz, C., Skoluda, N., Nater, U.M., Pizzagalli, D.A., Hermann, C., & Mueller, E.M. (2022) Alpha-2 Adrenoreceptor Antagonist Yohimbine Potentiates Consolidation of Conditioned Fear. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **25**, 759–773.
- Strosberg, A.D. (1993) Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci.*, **2**, 1198–1209.
- Stubbendorff, C. & Stevenson, C.W. (2021) Dopamine regulation of contextual fear and associated neural circuit function. *Eur. J. Neurosci.*, **54**, 6933–6947.
- Südhof, T.C. & Rothman, J.E. (2009) Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. *Science (80-. )*, **323**, 474–477.
- Takeuchi, T., Duszkiewicz, A.J., Sonneborn, A., Spooner, P.A., Yamasaki, M., Watanabe, M., Smith, C.C., Fernández, G., Deisseroth, K., Greene, R.W., & Morris, R.G.M. (2016)



- Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nat.* 2016 5377620, **537**, 357–362.
- Tammimaki, A., Kaenmaki, M., Mannisto, P.T., & Medicine, T. (2016) Elimination of Extracellular Dopamine in the Medial Prefrontal Cortex of Conscious Mice Analyzed. *J. Physiol. Pharmacol.*, 301–309.
- Treadway, M.T. & Zald, D.H. (2011) Reconsidering anhedonia in depression: Lessons from translational neuroscience. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **35**, 537–555.
- Trendelenburg, A.U., Philipp, M., Meyer, A., Klebroff, W., Hein, L., & Starke, K. (2003) All three  $\alpha$ 2-adrenoceptor types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, **368**, 504–512.
- Tsetsenis, T., Badya, J.K., Wilson, J.A., Zhang, X., Krizman, E.N., Subramaniyan, M., Yang, K., Thomas, S.A., & Dani, J.A. (2021) Midbrain dopaminergic innervation of the hippocampus is sufficient to modulate formation of aversive memories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **118**, e2111069118.
- Tsetsenis, T., Broussard, J.I., & Dani, J.A. (2023) Dopaminergic regulation of hippocampal plasticity, learning, and memory. *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 1092420.
- Tuerk, P.W., Wangelin, B.C., Powers, M.B., Smits, J.A.J., Acierno, R., Myers, U.S., Orr, S.P., Foa, E.B., & Hamner, M.B. (2018) Augmenting treatment efficiency in exposure therapy for PTSD: a randomized double-blind placebo-controlled trial of yohimbine HCl. *Cogn. Behav. Ther.*, **47**, 351–371.
- Tye, K.M., Prakash, R., Kim, S.Y., Fenno, L.E., Grosenick, L., Zarabi, H., Thompson, K.R., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., & Deisseroth, K. (2011) Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, **471**, 358–362.
- Uematsu, A., Tan, B.Z., Ycu, E.A., Cuevas, J.S., Koivumaa, J., Junyent, F., Kremer, E.J., Witten, I.B., Deisseroth, K., & Johansen, J.P. (2017) Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. *Nat. Neurosci.* 2017 2011, **20**, 1602–1611.
- Upadhyay, J., Verrico, C.D., Cay, M., Kodele, S., Yammine, L., Koob, G.F., & Schreiber, R. (2022) Neurocircuitry basis of the opioid use disorder–post-traumatic stress disorder comorbid state: conceptual analyses using a dimensional framework. *The Lancet Psychiatry*, **9**, 84–96.
- Valentino, R.J. & Van Bockstaele, E. (2008) Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur. J. Pharmacol.*, **583**, 194–203.
- Velasquez-Martinez, M.C., Santos-Vera, B., Velez-Hernandez, M.E., Vazquez-Torres, R., & Jimenez-Rivera, C.A. (2020) Alpha-1 Adrenergic Receptors Modulate Glutamate and GABA Neurotransmission onto Ventral Tegmental Dopamine Neurons during Cocaine Sensitization. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**.
- Velásquez-Martinez, M.C., Vázquez-Torres, R., & Jiménez-Rivera, C.A. (2012) Activation of alpha1-adrenoceptors enhances glutamate release onto ventral tegmental area dopamine cells. *Neuroscience*, **216**, 18–30.
- Velásquez-Martínez, M.C., Vázquez-Torres, R., Rojas, L. V., Sanabria, P., & Jiménez-Rivera,

- C.A. (2015) Alpha-1 adrenoreceptors modulate GABA release onto ventral tegmental area dopamine neurons. *Neuropharmacology*, **88**, 110–121.
- Venzala, E., García-García, A.L., Elizalde, N., & Tordera, R.M. (2013) Social vs. environmental stress models of depression from a behavioural and neurochemical approach. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **23**, 697–708.
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.J., Baler, R., & Telang, F. (2009) Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, **56 Suppl 1**, 3–8.
- Wangelin, B.C., Powers, M.B., Smits, J.A.J., & Tuerk, P.W. (2013) Enhancing exposure therapy for PTSD with yohimbine HCL: Protocol for a double-blind, randomized controlled study implementing subjective and objective measures of treatment outcome. *Contemp. Clin. Trials*, **36**, 319–326.
- Wassum, K.M. & Izquierdo, A. (2015) The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **57**, 271–283.
- White, F.J. & Wang, R.Y. (1984) Pharmacological characterization of dopamine autoreceptors in the rat ventral tegmental area: microiontophoretic studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **231**.
- Williams, M.A., Li, C., Kash, T.L., Matthews, R.T., & Winder, D.G. (2014) Excitatory drive onto dopaminergic neurons in the rostral linear nucleus is enhanced by norepinephrine in an  $\alpha 1$  adrenergic receptor-dependent manner. *Neuropharmacology*, **86**, 116–124.
- Wise, R.A. (2002) Brain reward circuitry: Insights from unsensed incentives. *Neuron*, **36**, 229–240.
- Wise, R.A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004 56, **5**, 483–494.
- Wu, J., Sun, T., Ye, C., Yao, J., Zhu, B., & He, H. (2012) Clinical Observation of Fetal Olfactory Ensheathing Glia Transplantation (OEGT) in Patients With Complete Chronic Spinal Cord Injury. *Cell Transplant.*, **21**, 33–37.
- Yadid, G., Overstreet, D.H., & Zangen, A. (2001) Limbic dopaminergic adaptation to a stressful stimulus in a rat model of depression. *Brain Res.*, **896**, 43–47.
- Young, K.A., Gobrogge, K.L., & Wang, Z. (2011) The role of mesocorticolimbic dopamine in regulating interactions between drugs of abuse and social behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **35**, 498–515.
- Zerbi, V., Floriou-Servou, A., Markicevic, M., Vermeiren, Y., Sturman, O., Privitera, M., von Ziegler, L., Ferrari, K.D., Weber, B., De Deyn, P.P., Wenderoth, N., & Bohacek, J. (2019) Rapid Reconfiguration of the Functional Connectome after Chemogenetic Locus Coeruleus Activation. *Neuron*, **103**, 702-718.e5.

# **Oświadczenia współautorów publikacji**

Kralice, 22.08.2023..

## Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w niżej wymienionych publikacjach polegał na wiodącej roli w tworzeniu ogólnej koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, analizie uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku.

1. **Bernaacka Joanna**, Kielbinski Michał, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Zajda Katarzyna, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Alpha-2A but not 2B/C noradrenergic receptors in ventral tegmental area regulate phasic dopamine release in nucleus accumbens core. *Neuropharmacology*, **220**, 109258, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2022.109258
2. Kielbinski Michał, **Bernaacka Joanna**, Zajda Katarzyna, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit. *Journal of Neurochemistry*. **00**, 1–15, DOI: 10.1111/jnc.15698
3. **Bernaacka Joanna**, Solecki Wojciech (2023) Functional significance of dopamine release in the mesolimbic forebrain by modulation of adrenergic receptors. *European Neuropsychopharmacology*, **75**, 59–61, DOI: 10.1016/j.euroneuro.2023.06.007

Joanna Bernaacka

Krolak 23.08.23.

## Oświadczenie

Oświadczam, że udział mgr Joanny Bernackiej w niżej wymienionych publikacjach polegał na wiodącej roli w tworzeniu ogólnej koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, analizie uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Wyrażam zgodę na wykorzystanie poniższych publikacji w postępowaniu doktorskim mgr Bernackiej oraz oświadczam, że żadna z poniższych publikacji nie stanowi oraz nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział w powstaniu niżej wymienionych prac polegał na współuczestnictwie z mgr Bernacką w planowaniu badań, wykonaniu części eksperymentalnej, analizie uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptu do druku.

1. Bernacka Joanna, **Kielbinski Michał**, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Zajda Katarzyna, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Alpha-2A but not 2B/C noradrenergic receptors in ventral tegmental area regulate phasic dopamine release in nucleus accumbens core. *Neuropharmacology*, 220, 109258, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2022.109258
2. **Kielbinski Michał**, Bernacka Joanna, Zajda Katarzyna, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit. *Journal of Neurochemistry*. 00, 1–15, DOI: 10.1111/jnc.15698

M. Kielbinski

24.08.2023 Warszawa

## Oświadczenie

Oświadczam, że udział mgr Joanny Bernackiej w niżej wymienionych publikacjach polegał na wiodącej roli w tworzeniu ogólnej koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, analizie uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Wyrażam zgodę na wykorzystanie poniższych publikacji w postępowaniu doktorskim mgr Bernackiej oraz oświadczam, że żadna z poniższych publikacji nie stanowi oraz nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział w powstaniu niżej wymienionych prac polegał na współuczestnictwie z mgr Bernacką w wykonaniu części eksperymentalnej prac.

1. Bernacka Joanna, Kielbinski Michał, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, **Zajda Katarzyna**, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Alpha-2A but not 2B/C noradrenergic receptors in ventral tegmental area regulate phasic dopamine release in nucleus accumbens core. *Neuropharmacology*, 220, 109258, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2022.109258
2. Kielbinski Michał, Bernacka Joanna, **Zajda Katarzyna**, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit. *Journal of Neurochemistry*. 00, 1–15, DOI: 10.1111/jnc.15698

Zajda Katarzyna

Kraków, 27.07.23

## Oświadczenie

Oświadczam, że udział mgr Joanny Bernackiej w niżej wymienionych publikacjach polegał na wiodącej roli w tworzeniu ogólnej koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, analizie uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Wyrażam zgodę na wykorzystanie poniższych publikacji w postępowaniu doktorskim mgr Bernackiej oraz zaświadczam, że żadna z poniższych publikacji nie stanowi oraz nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział w powstaniu niżej wymienionych prac polegał na współuczestnictwie w planowaniu badań, przygotowaniu manuskryptów oraz pozyskaniu finansowania na badania w ramach grantów Narodowego Centrum Nauki.

1. Bernacka Joanna, Kielbinski Michał, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Zajda Katarzyna, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, **Solecki Wojciech** (2022) Alpha-2A but not 2B/C noradrenergic receptors in ventral tegmental area regulate phasic dopamine release in nucleus accumbens core. *Neuropharmacology*, 220, 109258, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2022.109258
2. Kielbinski Michał, Bernacka Joanna, Zajda Katarzyna, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, **Solecki Wojciech** (2022) Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit. *Journal of Neurochemistry*. 00, 1–15, DOI: 10.1111/jnc.15698
3. Bernacka Joanna, **Solecki Wojciech** (2023) Functional significance of dopamine release in the mesolimbic forebrain by modulation of adrenergic receptors. *European Neuropsychopharmacology*, 75, 59–61, DOI: 10.1016/j.euroneuro.2023.06.007

Wojciech Solecki

Kralice, 25.07.2023

## Oświadczenie

Oświadczam, że udział mgr Joanny Bernackiej w niżej wymienionych publikacjach polegał na wiodącej roli w tworzeniu ogólnej koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, analizie uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Wyrażam zgodę na wykorzystanie poniższych publikacji w postępowaniu doktorskim mgr Bernackiej oraz oświadczam, że żadna z poniższych publikacji nie stanowi oraz nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział w powstaniu niżej wymienionych prac polegał na współuczestnictwie z mgr Bernacką w wykonaniu części eksperymentalnej prac.

1. Bernacka Joanna, Kielbinski Michał, **Wawrzczak-Bargieła Agnieszka**, Zajda Katarzyna, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Alpha-2A but not 2B/C noradrenergic receptors in ventral tegmental area regulate phasic dopamine release in nucleus accumbens core. *Neuropharmacology*, 220, 109258, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2022.109258
2. Kielbinski Michał, Bernacka Joanna, Zajda Katarzyna, **Wawrzczak-Bargieła Agnieszka**, Maćkowiak Marzena, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit. *Journal of Neurochemistry*. 00, 1–15, DOI: 10.1111/jnc.15698

Agnieszka Wawrzczak-Bargieła



Kraków, 25.08.23.

## Oświadczenie

Oświadczam, że udział mgr Joanny Bernackiej w niżej wymienionych publikacjach polegał na wiodącej roli w tworzeniu ogólnej koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, analizie uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Wyrażam zgodę na wykorzystanie poniższych publikacji w postępowaniu doktorskim mgr Bernackiej oraz oświadczam, że żadna z poniższych publikacji nie stanowi oraz nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział w powstaniu niżej wymienionych prac polegał na doradztwie w planowaniu części eksperymentów, recenzji i edycji manuskryptów oraz pozyskaniu finansowania na badania z działalności statutowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk.

1. Bernacka Joanna, Kielbinski Michał, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Zajda Katarzyna, **Maćkowiak Marzena**, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Alpha-2A but not 2B/C noradrenergic receptors in ventral tegmental area regulate phasic dopamine release in nucleus accumbens core. *Neuropharmacology*, 220, 109258, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2022.109258
2. Kielbinski Michał, Bernacka Joanna, Zajda Katarzyna, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, **Maćkowiak Marzena**, Przewłocki Ryszard, Solecki Wojciech (2022) Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit. *Journal of Neurochemistry*. 00, 1–15, DOI: 10.1111/jnc.15698

M. Kielbinski

Kraków, 14/08/23

## Oświadczenie

Oświadczam, że udział mgr Joanny Bernackiej w niżej wymienionych publikacjach polegał na wiodącej roli w tworzeniu ogólnej koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, analizie uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do druku. Wyrażam zgodę na wykorzystanie poniższych publikacji w postępowaniu doktorskim mgr Bernackiej oraz oświadczam, że żadna z poniższych publikacji nie stanowi oraz nie będzie stanowiła dla mnie podstawy do uzyskania stopni naukowych. Mój udział w powstaniu niżej wymienionych prac polegał na recenzji i edycji manuskryptów.

1. Bernacka Joanna, Kielbinski Michał, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Zajda Katarzyna, Maćkowiak Marzena, **Przewlocki Ryszard**, Solecki Wojciech (2022) Alpha-2A but not 2B/C noradrenergic receptors in ventral tegmental area regulate phasic dopamine release in nucleus accumbens core. *Neuropharmacology*, 220, 109258, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2022.109258
2. Kielbinski Michał, Bernacka Joanna, Zajda Katarzyna, Wawrzczak-Bargieła Agnieszka, Maćkowiak Marzena, **Przewlocki Ryszard**, Solecki Wojciech (2022) Acute stress modulates noradrenergic signaling in the ventral tegmental area-amygdalar circuit. *Journal of Neurochemistry*. 00, 1–15, DOI: 10.1111/jnc.15698

  
.....