

اثر ارکسین بر بیان ژن آروماتاز و غلظت β -۱۷ استرادیول در هسته‌ی و ترومدیال و ناحیه‌ی لترال هیپوتالاموس

الهام شکبیا^۱، دکتر همایون خزعلی^۲

۱) گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، ۲) گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه بیوشیمی، الهام شکبیا؛ e-mail: shakibaelham@ymail.com

چکیده

مقدمه: در پژوهش‌های پیشین اثر و اهمیت ارکسین و استرادیول بر افزایش اشتها بررسی گردیده است. در بررسی حاضر اثر ارکسین بر ترشح استرادیول توسط نورون‌های هسته و ترومدیال (مرکز سیری) و ناحیه لترال (مرکز گرسنگی) هیپوتالاموس بررسی شد. **مواد و روش‌ها:** ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه کنترل شامل ۱۰ عدد موش و یک گروه آزمایش شامل ۳۰ عدد موش، که در تمام آن‌ها کانولا گذاری در هسته‌ی و ترومدیال و ناحیه‌ی لترال هیپوتالاموس با تکنیک استریوتکسیک صورت گرفت. بعد از دو روز دوره‌ی ریکاوری تزریق ۱، ۲ و ۴ میکروگرم ارکسین در ناحیه هسته‌ی لترال هیپوتالاموس و و ترومدیال هیپوتالاموس صورت گرفت. دو ساعت بعد از تزریق، جداسازی بافت مغزی هسته‌ی لترال و و ترومدیال صورت گرفت. بعد از جداسازی بافت هسته‌ی لترال و و ترومدیال هیپوتالاموس غلظت آروماتاز با استفاده از RT-PCR و استرادیول با روش رادیوایمنواسی مورد سنجش قرار گرفت. **یافته‌ها:** آزمایش تعیین وجود ژن آنزیم آروماتاز نشان داد تزریق دوزهای ۱، ۲ و ۴ میکروگرم ارکسین در بافت‌های هسته‌ی لترال تالاموس و و ترومدیال هیپوتالاموس موجب سنتز آنزیم آروماتاز شده است. اندازه‌گیری هورمون ۱۷ بتا استرادیول در بافت‌های هسته‌ی و ترومدیال و هسته‌ی لترال هیپوتالاموس نشان داد تزریق ۱، ۲ و ۴ میکروگرم ارکسین سبب افزایش معنی‌دار ($P \leq 0/05$) هورمون ۱۷ بتا استرادیول شد. این افزایش، در دوزهای ۲ و ۴ میکروگرم ارکسین بیش از ۴ میکروگرم مشاهده گردید. **نتیجه‌گیری:** یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد نورون‌های ترشح کننده‌ی استرادیول در ناحیه‌ی و ترومدیال هیپوتالامیک و ناحیه لترال هیپوتالامیک وجود دارد.

واژگان کلیدی: ارکسین، استرادیول و ترومدیال هیپوتالاموس، لترال هیپوتالاموس، استرادیول، رادیوایمنواسی

دریافت مقاله: ۹۱/۶/۶ - دریافت اصلاحیه: ۹۱/۹/۱۹ - پذیرش مقاله: ۹۱/۹/۲۲

مقدمه

ارکسین نوروپپتیدی است که برای اولین بار از هیپوتالاموس موش صحرایی به وسیله‌ی دو گروه تحقیقاتی جداگانه شامل ساکورایی و de lecea در سال ۱۹۹۸ جداسازی شد. پری پرو ارکسین پپتید پیش‌سازی است که در نهایت یک پپتید ۳۳ اسید آمینه‌ای (ارکسین A) به همراه یک پپتید ۲۸ اسید آمینه‌ای (ارکسین B) از آن مشتق می‌شود. این

دو پپتید دارای دو نوع گیرنده‌ی OX1R و OX2R به نام‌های G متصل به پروتئین می‌باشند.^{۱،۲} توزیع بسیار زیاد نورون‌های ارکسین‌ژیک و گیرنده‌های ارکسین در بافت‌ها و نواحی مختلف، نقش آن‌ها را در تنظیم نورواندوکرینی مانند تغذیه، وضعیت سوخت و ساز و کنترل سیستم اتونومیک نشان می‌دهد.^۲ ارکسین در کنترل محورهای نورواندوکرینی مختلف شامل سیستم گنادوتروپ، محور تولید مثلی، سوماتوتروپ و ... دخالت دارد.^{۳،۴}

تجربه‌ها خارج گردیدند. از طرفی، ۱۲ ساعت قبل از عمل جراحی، غذا از دسترس نمونه‌ها خارج شد. تمام بررسی‌ها بر مبنای رعایت اصول اخلاقی مرتبط با آزمایش‌های تجربی در مورد حیوانات انجام گرفت.

پژوهش حاضر در دانشکده‌ی علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن تقریبی ۲۰۰ گرم به طور تصادفی به دو گروه اصلی تقسیم شدند که ۱۰ سر موش گروه کنترل و ۳۰ سر موش گروه آزمایش بودند. مورد کانولا گذاری در هسته‌های لترال هیپوتالاموس و ونترومدیال هیپوتالاموس با تکنیک استریوتکسیک قرار گرفتند. بعد از دو دوره‌ی ریکاوری تزریق ۱، ۲ و ۴ میکروگرم ارکسین در ناحیه هسته‌ی لترال هیپوتالاموس و ونترومدیال هیپوتالاموس از راه کانولا انجام شد. دو ساعت بعد از تزریق، حیوانات کشته شده و جداسازی بافت مغزی و هسته‌ی جانبی و ونترومدیال هیپوتالاموس صورت گرفت. بافت‌های جدا شده تا مراحل بعدی آزمایش در دمای منفی ۸۰- درجه‌ی سلیسوس قرار گرفت. بعد از جدا سازی بافت هسته‌ی لترال و ونترومدیال هیپوتالاموس هموژنیزه شد و بعد از جداسازی غلظت آروماتاز با استفاده از RT-PCR و استرادیول با روش رادیوایمیوناسی و با استفاده از انجام کیت آزمایشگاهی (DSL lab Incwebster) مورد بررسی گرفت.

بیهوشی به وسیله‌ی مخلوط ماده‌ی بیهوشی کتامین و زایلین از راه داخل صفاقی انجام شد. ویژگی‌های هسته‌ی جانبی و ونترومدیال از اطلس پاکسینوس و واتسن با ویژگی‌های VMH خلفی: ۲/۵-۲/۸ میلی‌متر، جانبی: ۰/۶ میلی‌متر از برگما و ۹/۵ میلی‌متر عمودی از سطح استخوان پرییتال؛ LHA (خلفی: ۰/۳ میلی‌متر، جانبی ۰/۲ میلی‌متر و عمودی ۸/۵-۸/۰ میلی‌متر از سطح استخوان پرییتال) پیدا شد و کانول گذاری به منظور تزریق دارو انجام گردید.

جداسازی mRNA از بافت هموژنیزه شده به منظور استفاده در RT-PCR انجام شد. به منظور تایید جداسازی قطعه‌ی مورد نظر الکتروفورز انجام، و پس از آن سنتز CDNA صورت گرفت و سپس الکتروفورز انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده تمام داده‌ها برای مقایسه‌ی میانگین غلظت آروماتاز و استرادیول تزریق دوزهای ۱، ۲ و ۴ میکروگرم ارکسین با کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۲۰ و با استفاده از آزمون آماری تی زوجی، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌ها به صورت

نورون‌های ارکسین به چندین پیام متابولیکی که نشان‌دهنده‌ی وضعیت انرژی بدن هستند پاسخ می‌دهند، فعالیت این نورون‌ها در شرایط گرسنگی افزایش می‌یابد. غلظت ارکسین A با نمایه‌ی توده‌ی بدن^۱ در افراد طبیعی رابطه‌ی مستقیم دارد. همچنین، میزان ارکسین A پلاسما در بیماران چاق بسیار پایین است.^{۵،۶}

آروماتاز آنزیمی است که مسئول یک مرحله‌ی کلیدی در بیوسنتز استروژن می‌باشد.^{۱،۲} حذف استروژن سبب تغییر در اندازه‌ی وعده‌ی غذایی و مدت آن، و پرخوری و چاقی می‌شود.^{۷،۸} پیامدهی استروژن به هسته‌های مهم هیپوتالاموس مسئول تنظیم وزن بدن با واسطه‌ی تنظیم مصرف انرژی می‌باشد.^{۹-۱۱} هیپوتالاموس جانبی (LH)ⁱⁱⁱ در افزایش تغذیه نقش دارد. ونترومدیال هیپوتالاموس (VMH)ⁱⁱⁱ به عنوان مرکز سیری (satiety)^{۱،۲} و هیپوتالاموس جانبی به عنوان مرکز گرسنگی شناخته می‌شود^{۱۲} و این ناحیه در تنظیم تغذیه و سوخت و ساز نقش دارد.^۵

در گذشته اثر استرادیول و ارکسین در مغز بر واسطه‌های عصبی کاهنده و افزایشدهی اشتها بررسی شده است.^{۳،۴} با توجه به اثر ارکسین و استرادیول بر اشتها در این بررسی اثر ارکسین بر میزان ترشح استرادیول و بیان ژن آروماتاز در دو ناحیه VMH و هیپوتالاموس جانبی که بیانگر ارتباط بین ارکسین و میزان ترشح استرادیول در دو ناحیه یاد شده است، با تزریق ارکسین به این دو ناحیه و سنجش بیان ژن آروماتاز و استرادیول بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

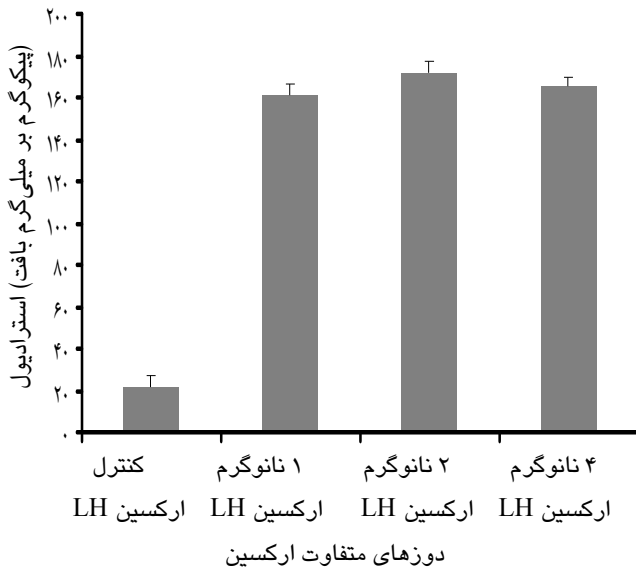
در پژوهش حاضر که از نوع تجربی - آزمایشگاهی می‌باشد موش‌های صحرایی ماده از انستیتو پاستور خریداری و در شرایط استاندارد نگهداری شدند. دمای نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بود و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (شروع روشنایی در ساعت ۸ صبح) در مورد نمونه‌ها اعمال گردید. حیوانات در طول تجربه دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد داشتند. همچنین، نمونه‌ها از نظر هرگونه علائم بیماری مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت مشاهده‌ی علائم بیماری از پهنه‌ی

i - Body mass index

ii- Lateral hypothalamus

iii - Ventromedial hypothalamus

شده است. تزریق ۱، ۲ و ۴ میکروگرم ارکسین سبب افزایش میزان استرادیول شده که موجب تفاوت معنی‌دار ($P \leq 0.05$) بین دوزهای مختلف نشد، ولی در مقایسه با گروه کنترل سبب افزایش معنی‌دار ($P \leq 0.05$) (نمودار ۱) گردید.



نمودار ۱- میانگین غلظت هورمون استرادیول در بافت جانبی هیپوتالاموس با دوزهای مختلف ارکسین در مقایسه با دوزهای تزریقی ارکسین و گروه کنترل نشان داده شده و به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند، مقادیر در مقایسه با گروه کنترل ($P \leq 0.05$) معنی‌دار تلقی گردید.

میانگین غلظت هورمون استرادیول در بافت و نترومدیاال هیپوتاموس با دوزهای مختلف ارکسین به دست آمد. یافته‌ها بیانگر افزایش معنی‌دار ($P \leq 0.05$) هورمون استرادیول در هسته‌ی VMH می‌باشد. اندازه‌گیری هورمون استرادیول ۱۷ پتا در بافت‌های هسته و نترومدیاال هیپوتالاموس نشان داد تزریق ۱، ۲ و ۴ میکروگرم ارکسین سبب افزایش معنی‌دار ($P \leq 0.05$) هورمون ۱۷ پتا استرادیول گردید. این افزایش در دوزهای ۱ و ۲ میکروگرم ارکسین بیش از ۴ میکروگرم مشاهده شد (نمودار ۲).

یافته‌ها به صورت کلی حاکی از این امر است که تزریق ارکسین در ناحیه VMH و هیپوتالاموس جانبی موجب افزایش بیان ژن آروماتاز و استرادیول می‌گردد ($P \leq 0.05$).

میانگین \pm انحراف معیار بیان و مقادیر در مقایسه با گروه کنترل ($P \leq 0.05$) معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

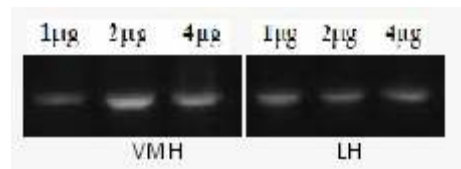
در پژوهش حاضر با توجه به اثر استرادیول و ارکسین بر اشتها، تاثیر ارکسین بر میزان استرادیول و بیان ژن آروماتاز که مسئول سنتز استرادیول از تستوسترون می‌باشد، مورد بررسی قرار گرفت. حیوانات جراحی شدند و کانول‌گذاری صورت گرفت و پس از تزریق ارکسین میزان بیان ژن آروماتاز به روش RT-PCR انجام شد.

در ابتدا RNA از بافت مغزی استخراج شد و سپس استخراج RNA به وسیله الکتروفورز ژل آگارز تایید شد. یافته‌ها بیانگر این امر است که جداسازی RNA بافت‌های مغزی مختلف با موفقیت صورت گرفته است. بندهای ایجاد شده در شکل زیر موید این امر می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز استخراج RNA و بندهای ایجاد شده می‌باشد.

سپس RNA مورد نظر به CDNA رونویسی، و با استفاده از PCR قطعات DNA تکثیر شد و پس از آن با استفاده از ژل آگارز بررسی گردید. یافته‌های آزمایش بیانگر افزایش بیان ژن آنزیم آروماتاز است و تزریق دوزهای ۱، ۲ و ۴ میکروگرم ارکسین در بافت‌های ناحیه‌ی جانبی و هسته‌ی و نترومدیاال هیپوتالاموس سبب سنتز آنزیم آروماتاز می‌شود. شکل ۲ بندهای به دست آمده از آزمایش PCR را نشان می‌دهد که بیانگر افزایش در میزان بیان ژن آروماتاز می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- بندهای به دست آمده از آزمایش PCR که بیانگر افزایش در میزان بیان ژن آروماتاز می‌باشد.

استرادیول به روش رادیوایمونواسی مورد سنجش قرار گرفت. یافته‌ها میانگین غلظت هورمون استرادیول در بافت جانبی هیپوتاموس با دوزهای مختلف ارکسین نشان داده

سروتونین و کوله‌سیستوکینین برهمکنش می‌دهند.^{۱۴،۱۵} VMH یک هسته‌ی هیپوتالاموسی مهم است که از تغذیه جلوگیری می‌کند و سوخت و ساز را افزایش می‌دهد.^{۱۶،۱۷} بر خلاف آن تخریب هیپوتالاموس جانبی سبب حالت گرسنگی (anorectic) شدید می‌شود.^{۱۸} با وجود این که اثر استرادیول بر اشتها در بیشتر منابع، کاهشده گزارش شده، در پژوهشی به این نتیجه رسیده اند که تزریق استرادیول به LH و VMH تغذیه را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد.^{۱۴}

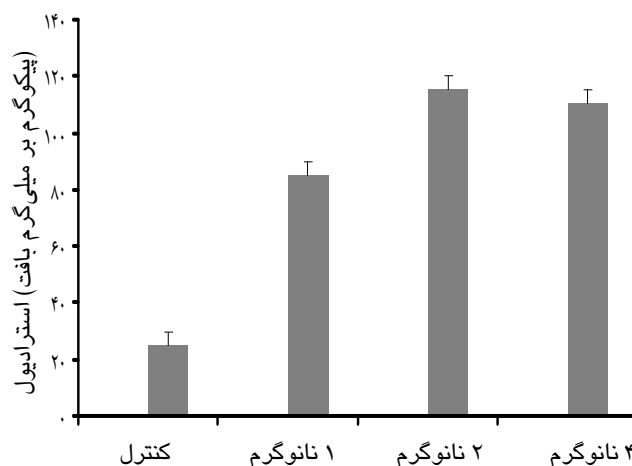
استروژن با پپتیدهای مرتبط با تغذیه واقع در هیپوتالاموس جانبی و ارکسین بر همکنش می‌دهد.^۷ علاوه بر آن بیان پروتئین ارکسین در سیکل استروس با یک پیک در پرواستروس تغییر می‌کند.^{۱۹} پژوهشی حاکی از این امر است که تزریق استرادیول در هیپوتالاموس جانبی برای کاهش تغذیه کافی نمی‌باشد، و بیان‌گر این امر است که هیپوتالاموس جانبی نمی‌تواند در تاثیر آنورکسیژنیک استروژن نقش داشته باشد.^{۲۰}

این پدیده حاکی از این امر می‌باشد که نوروهای نواحی هیپوتالاموس جانبی تحت تاثیر اثر آنورکسیژنیک استرادیول قرار نمی‌گیرند. بر خلاف آن اگر نوروپپتیدهایی مانند ارکسین درگیر در رفتار تغذیه‌ای استروژن باشند، محتمل است که گیرنده‌های استرادیول مسئول این امر در خارج هیپوتالاموس جانبی قرار گرفته باشند. استروژن در VMH برای کاهش تغذیه کافی نیست و قادر به تاثیر بر تغذیه نمی‌باشد.^{۲۲،۲۱}

علاوه بر آن موش‌های صحرایی با تخریب VMH کاهش در میزان تغذیه پس از تیمار با استرادیول را نشان می‌دهند.^{۲۳} در پژوهشی دیگر، موش‌های OVX که گیرنده‌ی α استروژن آن‌ها knockdown شده است پاسخ آنورکسیژنیک آن‌ها مانند موش‌های کنترل بود.^{۲۴} تزریق استروژن نتوانست تغذیه را کاهش دهد.

VMH برای اثر آنورکسیژنیک استروژن کافی نیست و این امر به احتمال زیاد از راه مسیر غیر مستقیمی خارج از VMH است.^{۱۴}

در بررسی‌های گذشته اثر ارکسین و استرادیول بر نوروپپتیدهای ارکسیژنیک و آنورکسیژنیک مختلف در نواحی مختلف مغزی مرتبط با اشتها بررسی شده است. NPY (نوروپپتید Y) در رفتار تغذیه‌ای القا شده به وسیله‌ی ارکسین تاثیر دارد. سیستم NPY می‌تواند یکی از مسیرهای فرعی باشد که ارکسین A با آن رفتار تغذیه‌ای را القا می‌کند.



ارکسین VMH ۴ نانوگرم، ارکسین VMH ۲ نانوگرم، ارکسین VMH ۱ نانوگرم، کنترل
دوزهای متفاوت ارکسین

نمودار ۲- میانگین غلظت هورمون استرادیول در بافت ونترودیال هیپوتالاموس با دوزهای مختلف ارکسین در مقایسه با دوزهای تزریقی ارکسین و گروه کنترل نشان داده شده، و به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. مقادیر در مقایسه با گروه کنترل ($P \leq 0.05$) معنی‌دار تلقی گردید.

بحث

در پژوهش حاضر اثر ارکسین که یک واسطه‌ی عصبی با اثر افزایشده بر اشتها است، بر میانگین غلظت آروماتاز (آنزیم مسئول سنتز استرادیول از تستوسترون)، و همچنین استرادیول که به عنوان کاهشده‌ی اشتها در برخی از نواحی مغزی شناخته شده، بررسی گردید.^۲ یافته‌های به دست آمده حاکی از این امر می‌باشد که تزریق دوزهای مختلف ارکسین موجب افزایش میزان بیان آروماتاز و همچنین استرادیول می‌شود.^۴

شناسایی نواحی که اثر آنورکسیژنیک استرادیول را میانجی می‌کنند به دلایل متعددی مهم می‌باشد. ابتدا شناخت این‌که استروژن در چه ناحیه‌ای از مغز برای کاهش تغذیه عمل می‌کند، شناخت سازوکارهای سلولی و فرایندهای عصبی که ضامن عملکرد آنورکسیژنیک این هورمون هستند، مهم است. دوم این که شناخت نواحی مهم مغزی کمک می‌کند پپتیدهای مرتبط با تغذیه و سیستم‌های نوروترانسمیتری که ممکن است به وسیله‌ی استرادیول تنظیم شود شناسایی گردد، در نتیجه تفاوت‌های جنسی در تغذیه مشخص می‌گردد.^{۱۳}

ارکسین و استرادیول با نوروپپتیدهای ارکسیژنیک مانند نوروپتید Y، گرلین، هورمون متمرکز کننده ملانین (MCH) و همچنین نوروپتیدهای آنورکسیژنیک مانند انسولین، لپتین،

مشابهی در انسان دارد که سبب کاهش تغذیه روزانه قبل از تخمک‌گذاری می‌شود.^{۲۰-۲۷} علاوه بر این، کاهش در استروژن مرتبط با تغییرات در وزن بدن توزیع چربی در بدن انسان است که مشابه حیوانات می‌باشد. استروژن توانایی کنترل توازن انرژی، میزان تغذیه و توزیع چربی را دارد و این امر ممکن است از راه واکنش آن با هورمون‌های ارکسیژنیک و آنورکسیژنیک به صورت غیر مستقیم انجام شود.^{۱۴} در کل با توجه به اثر ارکسین و استرادیول بر تغذیه و اثرات متقابل آن‌ها با پپتیدهای ارکسیژنیک و آنورکسیژنیک و با توجه به یافته‌های به دست آمده در بررسی حاضر به احتمال زیاد اثر این دو می‌تواند با واسطه‌ی پپتیدهای ارکسیژنیک و آنورکسیژنیک میانجی شود. ارکسین می‌تواند بر نورون‌های دخیل در اشتها در هیپوتالاموس (VMH و LH) اثر گذاشته و اثرات خود را از راه افزایش میزان سنتز و آزادسازی استروژن از تستوسترون با فعال کردن آروماتاز به انجام می‌رساند.

i- Agouti-related

ii -Melanin concentrating

تزریق داخل بطن ارکسین و بعضی آنالیزهای ایمنو‌هیستوشیمی واکنش بین ارکسین‌ها و واسطه‌های تغذیه‌ای مانند نوروپپتید Y، پرواوپیوملانوکورتین (POMC)، پروتئین AGRPⁱ و MCHⁱⁱ را نشان داده است.^{۲۵} گیرنده‌های ارکسین و لپتین در هیپوتالاموس جانبی و VMH قرار دارند. لپتین تغذیه را کاهش می‌دهد، در حالی‌که ارکسین A تغذیه را افزایش می‌دهد. این تفاوت‌ها همراه با تاثیرات تنظیمی لپتین و ارکسین A روی نورون‌های حساس به گلوکز LHA و VMH است.^{۲۶} تغذیه‌ی القا شده با ارکسین شامل هم مسیرهای حساس به لپتین و هم غیر حساس به لپتین هستند. هنگامی‌که ارکسین به صورت ICV تزریق می‌شود در ابتدای فاز روشنایی ارکسین A مصرف غذا را تحریک می‌کند.^۱ در موش‌ها استروژن اثر تقویت کننده روی اندازه و تغذیه‌ی روزانه در طول دوره‌ی تخمک‌گذاری و تاثیر بازدارندگی دوره‌ای در طول مرحله‌ی قبل از تخمک‌گذاری دارد. حذف استروژن سبب تغییر در اندازه‌ی وعده‌ی غذایی، و مدت آن، و پرخوری و چاقی می‌شود، استروژن اثرات

References

- Plassart-Schiess E, Baulieu EE. Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 37:133-40.
- Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 2009; 457: 219-23.
- Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, Tsujino N, Sakai A, Matsuzaki I, et al. Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res* 2000; 859: 404-9.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-85.
- Kirchgeßner AL. Orexins in the brain-gut axis. *Endocr Rev* 2002; 23: 1-15.
- Martynska L, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Bik W, Baranowska B. The physiological role of orexins. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; 26: 289-92.
- Santollo J, Eckel LA. Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein, in ovariectomized rats. *Behav Brain Res* 2008; 191: 173-7.
- Messina MM, Boersma G, Overton JM, Eckel LA. Estradiol decreases the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 2006; 88: 523-8.
- Merchenthaler I, Lane MV, Numan S, Dellovade TL. Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *J Comp Neurol* 2004; 473: 270-91.
- Wilkinson HA, Dahllund J, Liu H, Yudkovitz J, Cai SJ, Nilsson S, et al. Identification and characterization of a functionally distinct form of human estrogen receptor beta. *Endocrinology* 2002; 143: 1558-61.
- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, et al. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neuro* 1992; 319: 218-45.
- STELLAR E. The physiology of motivation. *Psychol Rev* 1954; 61: 5-22.
- Santollo J, Torregrossa AM, Eckel LA. Estradiol acts in the medial preoptic area, arcuate nucleus, and dorsal raphe nucleus to reduce food intake in ovariectomized rats. *Horm Behav* 2011; 60: 86-93.
- Brown LM, Clegg DJ. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 122: 65-73.
- Zhu Y, Yamanaka A, Kunii K, Tsujino N, Goto K, Sakurai T. Orexin-mediated feeding behavior involves both leptin-sensitive and -insensitive pathways. *Physiol Behav* 2002; 77: 251-7.
- Bagnasco M, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP. Evidence for the existence of distinct central appetite, energy expenditure, and ghrelin stimulation pathways as revealed by hypothalamic site-specific leptin gene therapy. *Endocrinology* 2002; 143: 4409-21.
- Tejwani GA, Richard CW 3rd. Effect of electrolytic and chemical ventromedial hypothalamic lesions on food intake, body weight, analgesia and the CNS opioid peptides in rats and mice. *NIDA Res Monogr* 1986; 75: 497-500.

18. ANAND BK, BROBECK JR. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951; 77: 323-4.
19. Porkka-Heiskanen T, Kalinchuk A, Alanko L, Huhtaniemi I, Stenberg D. Orexin A and B levels in the hypothalamus of female rats: the effects of the estrous cycle and age. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 737-42.
20. Muschamp JW, Dominguez JM, Sato SM, Shen RY, Hull EM. A role for hypocretin (orexin) in male sexual behavior. *J Neurosci* 2007; 27: 2837-45.
21. Palmer K, Gray JM. Central vs. peripheral effects of estrogen on food intake and lipoprotein lipase activity in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 1986; 37: 187-9.
22. Butera PC, Beikirch RJ. Central implants of diluted estradiol: independent effects on ingestive and reproductive behaviors of ovariectomized rats. *Brain Res* 1989; 491: 266-73.
23. King J, Cox V. The effects of estrogens on food intake and body weight following ventromedial hypothalamic lesions. *Physiology and Behavior* 2004; 150: 737.
24. Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Mobbs CV, Yang XJ, Clegg DJ, et al. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 2501-6.
25. Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K. Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci Lett* 1999; 264: 101-4.
26. Shiraiishi T, Oomura Y, Sasaki K, Wayner MJ. Effects of leptin and orexin-A on food intake and feeding related hypothalamic neurons. *Physiol Behav* 2000; 71: 251-61.
27. Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1251-63.
28. Geary N. Estradiol, CCK and satiation. *Peptides* 2001; 22: 1251-63.
29. Geary N. The estrogenic inhibition of eating. *Neurobiology of food and fluid intake* 2004; 14: 307-45.
30. Drewett RF. Sexual behaviour and sexual motivation in the female rat. *Nature* 1973; 242: 476-7.

Original Article

Effect of Orexin in Ventromedial and Lateral Hypothalamus on Aromatase Gene Expression and 17- β Estradiol Concentration

Shakiba E¹, Khazali H²

¹Department of Biochemistry, Department of Fundamental Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, ²Physiology Department of Biology Shahid Beheshti University of Tehran, Tehran, I.R. Iran

e-mail: shakibaelham@ymail.com

Received: 27/08/2012 Accepted: 12/12/2012

Abstract

Introduction: Previous studies have investigated the effects and importance of orexin and estradiol on food intake. In this study the effects of orexin on estradiol release by the ventromedial hypothalamus (satiety center) and lateral hypothalamus (feeding center) have been investigated. Forty adult male rats, divided to two groups, the control group (consisting of 10 rats) and an experimental group (consisting of 30 rats), were cannulated in the lateral area and ventromedial nucleus stereotaxically. After two days recovery, 1, 2 and 4 micrograms of orexin were injected into the lateral area and ventromedial nucleus. After two hours, tissue of the lateral area and ventromedial nucleus were removed and concentrations of estradiol and aromatase were measured by radio-immuno assay and RT-PCR, respectively. Results of RT-PCR showed that orexin-A(1,2,4 μ g) augmented aromatase gene expression in the VMH and LH. 17- β estradiol measurement showed that 1, 2 and 4 μ g orexin infusion increased estradiol levels significantly in VMH and LH, especially the 2 and 4 μ g doses, observations suggesting that the neurons secreting estradiol exist in the VMH and LH.

Keywords: Orexin, Estradiol, VMH, LH, Radio-immuno assay