

**РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОКРИННЫХ КЛЕТОК ЯИЧНИКА
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ****Р.Н.Маградзе*, Д.А.Лисовский*, А.Д.Лисовский*, Н.А.Попковский****, П.С.Бобков****,
А.А.Байрамов*****, А.В.Дробленков********REACTIVE CHANGES IN OVARIAN ENDOCRINE CELLS IN EXPERIMENTAL ISCHEMIC DAMAGE****R.N.Magradze*, D.A.Lisovsky*, A.D.Lisovsky*, N.A.Popkovsky****, P.S.Bobkov****, A.A.Bayramov*****,
A.V.Droblenkov********Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, droblenkov_a@mail.ru****Санкт-Петербургский медико-социальный институт*****Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого*

Настоящее исследование посвящено морфофункциональному обоснованию модели женского гипогонадизма, важному для последующей оценки эффективности его целенаправленной фармакологической коррекции, а также выяснению устойчивости эндокринных клеток яичника к повреждению в результате переживания однократного острого ишемического воздействия. У трех групп взрослых самок крыс под наркозом лигировали артерию правого и левого яичника на 30, 45 и 60 мин (по 4 крысы в каждой группе). После операции рану зашивали. Контролем служили ложно-оперированные крысы (4 особи). Через 7 суток проводили анализ результатов. Содержание в крови половых стероидных гормонов (17 β -эстрадиола, прогестерона) и гонадотропинов (ФСГ и ЛГ) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. В меридиональных гистологических срезах зрелого третичного фолликула и желтого тела правого и левого яичников после обзорного окрашивания подсчитывали число и процент жизнеспособных и погибших эндокриноцитов, определяли площадь жизнеспособных эндокринных клеток. Достоверность различий медианы, верхнего и нижнего квартилей сравниваемых параметров определяли, используя непараметрический критерий Манна—Уитни. Установлено, что однократная острая ишемия яичников индуцирует массовую гибель и дегенеративные изменения значительной части жизнеспособных эндокринных клеток зрелого третичного фолликула и желтого тела, наиболее выраженные при одночасовой билатеральной окклюзии сосудов яичников. Данные количественные и структурные изменения интерстициальных эндокринных клеток и лютеоцитов яичника обуславливают значительное снижение выработки половых стероидов, которые, в свою очередь, вызывают гиперпродукцию соответствующих гипофизарных тропинов. Морфологические изменения обоих типов эндокринных клеток яичников в данной модели острой однократной ишемии яичников являются высокочувствительными; использование же ряда морфометрических параметров эндокриноцитов в комплексе с установлением концентрации периферических и регуляторных гормонов позволит применять эту модель для оценки эффективности коррекции женского гипогонадизма различными фармакологическими препаратами.

Ключевые слова: женский гипогонадизм, ишемия яичников, интерстициальные эндокриноциты, лютеоциты, реактивные изменения

Для цитирования: Маградзе Р.Н., Лисовский Д.А., Лисовский А.Д., Попковский Н.А., Бобков П.С., Байрамов А.А., Дробленков А.В. Реактивные изменения эндокринных клеток яичника при экспериментальном ишемическом повреждении // Вестник НовГУ. Сер.: Медицинские науки. 2022. №2(127). С.38-42. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.2\(127\).38-42](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.2(127).38-42)

The present study is devoted to the morphofunctional substantiation of the model of female hypogonadism, which is important for the subsequent evaluation of the effectiveness of its targeted pharmacological correction, as well as to elucidate the resistance of ovarian endocrine cells to damage as a result of experiencing a single acute ischemic effect. In three groups of adult female rats under anesthesia, the arteries of the right and left ovaries were ligated for 30, 45, and 60 min (4 rats in each group). After the operation, the wound was sutured. Sham-operated rats (4 rats) served as controls. After 7 days, the results were analyzed. The blood levels of sex steroid hormones (17 β -estradiol, progesterone) and gonadotropins (FSH and LH) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. In the meridional histological sections of the mature tertiary follicle and the corpus luteum of the right and left ovaries, after survey staining, the number and percentage of viable and dead endocrinocytes were counted, and the area of viable endocrine cells was determined. The significance of differences in the median, upper and lower quartiles of the compared parameters was determined using the nonparametric Mann–Whitney test. It has been established that a single acute ovarian ischemia induces massive death and degenerative changes in a significant part of the viable endocrine cells of the mature tertiary follicle and corpus luteum, most pronounced with a one-hour bilateral occlusion of the ovarian vessels. These quantitative and structural changes in interstitial endocrine cells and ovarian luteocytes cause a significant decrease in the production of sex steroids, which, in turn, causes hyperproduction of the corresponding pituitary tropins. Morphological changes in both types of ovarian endocrine cells in this model of acute single ovarian

ischemia are highly sensitive; the use of a number of morphometric parameters of endocrinocytes in combination with the determination of the concentration of peripheral and regulatory hormones will allow using this model to assess the effectiveness of the correction of female hypogonadism with various pharmacological preparations..

Keywords: *female hypogonadism, ovarian ischemia, interstitial endocrinocytes, luteocytes, reactive changes*

For citation: *Magradze R.N., Lisovsky D.A., Lisovsky A.D., Popkovsky N.A., Bobkov P.S., Bayramov A.A., Droblenkov A.V. Reactive changes in ovarian endocrine cells in experimental ischemic damage // Vestnik NovSU. Issue: Medical Sciences. 2022. №2(127). P.38-42. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.2\(127\).38-42](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.2(127).38-42)*

Актуальность разработки моделей женского гипогонадизма с целью поиска новых эффективных способов его лечения и профилактики обусловлена широкой распространенностью женского бесплодия в России, приближающейся к 24% [1,2]. Одним из новых перспективных направлений в исследовании способов восстановления нарушений эндокринных функций яичников связано с изучением терапевтического потенциала пептидных препаратов, содержащих оригинальную молекулу регуляторного белка семейства кисспептинов (Kiss1). Основные эффекты белков данного семейства, направленные на усиление выработки гипоталамического гонадолиберина, вызывают выраженный ответ эндокриноцитов всех звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, поскольку функционируют через их мембранный рецептор кисспептина (GPR54/KISS1R), связанный с G-белком [3-5]. Между тем в литературе отсутствуют сведения о реактивных изменениях клеток эндокринного аппарата яичника при моделировании ишемического повреждения яичников разной длительности, что мешает создать морфологическую основу для разработки моделей женского гипогонадизма.

Материалы и методы

Ишемию тканей яичника воспроизводили путем временного наложения лигатуры на дистальную часть маточной трубы и сосудистый пучок при помощи открытой хирургической операции с брюшинного доступа [6], что приводило к окклюзии яичниковой артерии.

Для эксперимента использованы интактные самки крыс линии Вистар 8-10 месячного возраста массой 240-260 г. Перед экспериментом животных тестировали с целью установления длительности эстрального цикла. При этом в утренние часы ежедневно в течение 4-х суток определяли концентрацию половых стероидных гормонов (17 β -эстрадиола и прогестерона) по методике, приведенной ниже. Отбирали самок крыс, которые имели устойчивый 4-дневный цикл [7].

Перед операцией, проводимой согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ от 2003 г. №267), животных наркотизировали по следующей схеме: золетил 0,3 мг («Virbac», Франция) и ксиланит 0,8 мг (ЗАО «НИТА-ФАРМ», Саратов, Россия), которые вводили внутривентриально из расчета 1,1 мг на 100 г тела животного. Действие наркоза верифицировали по исчезновению реакции на болевые раздражители (укол лапы) и угнетению зрачкового рефлекса. После наркоза крыс фиксировали на операционном столе в положении на спине. Кожу обрабатывали спиртом и разбавленным

спиртовым раствором йода, скальпелем делали продольный разрез длиной 1,5-2 см по средней линии живота. Передвигая разрез, поочередно, налево и направо в брюшной полости, находили правый или левый рог матки, выводили его наружу. Затем находили сосудистый пучок яичника в области соединения маточной трубы с углом тела матки. Временной лигатурой перевязывали сосудистый пучок на период 30, 45 и 60 минут. Аналогично ишемизировали второй яичник. Таким образом были сформированы 3 группы экспериментальных животных (по 4 крысы), в каждой из которых исследовали по 8 яичников. Контрольную группу (4 особи, 8 яичников) составили ложнопериоперированные животные, которым ишемию яичников не вызывали. У всех крыс операционное поле и внутреннюю поверхность брюшной полости обрабатывали стрептоцидом, разрез брюшины послойно ушивали кетгутом, кожу живота и шов обрабатывали 5% йодной настойкой. Для профилактики инфекций брюшной полости самкам крыс после операции однократно вводили Бициллин 3 или 5 в расчетной дозе. После операции животных помещали в чистую клетку, в течение первых 4-5 дней проводили ежедневную обработку раны дезинфицирующими средствами.

По истечении 7 суток (на 8 день) у животных всех групп из хвостовой вены извлекали кровь для количественного анализа гормонов, после чего крыс дакапитировали при помощи гильотины, извлекали оба яичника и фиксировали в 9% растворе нейтрального формалина для последующего морфологического анализа.

Содержание в крови половых стероидных гормонов и гонадотропинов (ФСГ и ЛГ) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа прибором Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa kit наборов фирм DRG (США), Cloud-Clone Corp (Китай), Алкор-Био (Россия).

После заливки в парафин по стандартной схеме готовили срезы обоих яичников в плоскости, близкой к сагиттальной (рассекающей середину краев и полюсов) толщиной 4 мкм, которые окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Под иммерсией исследовали реактивные изменения эндокриноцитов в покрышке зрелых третичных фолликулов и лютеоцитов в желтых телах, достигших периода расцвета. Окрашенные срезы изучали при помощи микроскопа Leica DME (Германия), фотографировали и осуществляли морфометрическое исследование, используя сканер Pannoramic Viewer (Венгрия) и программу 3DHISTECH (Венгрия). Подсчитывали удельное количество эндокриноцитов: жизнеспособных (содержащих ядрышко) и погибших (в расчете на один зрелый третичный фолликул, в плоскости среза которого обнаруживался овоцит и,

следовательно, срезанный меридионально; в желтом теле — из расчета от общего числа лютеоцитов, содержащихся в трех последовательных квадратах площади 0,01 мм²). Площадь сечения жизнеспособных эндокриноцитов определяли у 10 клеток этих двух видов в одном из фолликулов у каждой крысы.

При использовании пакета статистической программы GraphPad PRISM 6.0 (GraphPad Software, USA) было установлено, что распределение параметров каждого вариационного ряда (количественного, $n = 8$ и 2D, $n = 80$) было отличным от нормального. Поэтому для установления достоверности различий величин вычисляли их медиану, верхний и нижний квартили, которые сравнивали, используя непараметрический критерий Манна—Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,01$.

Полученные морфометрические параметры эндокриноцитов яичников и изменения концентрации половых эффекторных и регуляторных гормонов в динамике эксперимента оценивали, используя коэффициент корреляции в программе Microsoft EXCEL.

Результаты исследования и их обсуждение

Концентрация половых стероидных и гипофизарных гормонов в плазме крови у крыс контрольной и экспериментальных групп колебалась незначительно, что способствовало созданию репрезентативных

выборок и, вероятно, являлось следствием предварительного отбора животных (табл. 1).

Многочисленные интерстициальные эндокриноциты в широкой внутренней теке зрелого фолликула образовывали полосовидные прерывистые скопления. Клетки были крупными, вытянутой полигональной формы, обладали хорошо развитой цитоплазмой и были окружены элементами интерстициальной соединительной ткани и капиллярами. В желтом теле более крупные полигональные лютеоциты формировали многослойные анастомозирующие эпителиальные пласты, разделенные тонкими соединительнотканскими перегородками. Между группами лютеоцитов внутри пласта были расположены отдельные капилляры и элементы соединительной ткани. Среди эндокриноцитов обоих видов определялись единичные погибшие теневидные клетки (табл. 2), обычно малой величины, неправильной формы, содержащие сморщенное ядро или его фрагменты с усиленным контуром оболочки ядра.

Через 30 мин ишемии яичников уровень плазменного эстрадиола незначительно снизился (P value $> 0,05$), тогда как концентрация прогестерона понизилась вдвое (P value $< 0,0001$), что обусловило компенсаторное увеличение продукции гипофизарных регуляторных ФСГ и ЛГ (см. табл. 1).

Число и доля жизнеспособных эндокриноцитов в обоих типах фолликулов яичника незначительно

Таблица 1

Уровень половых стероидных гормонов и гонадотропинов в плазме крови самок крыс при ишемии яичника

Способ воздействия	Концентрация гормонов в крови, нмоль/л			
	17β-эстрадиол	Прогестерон	ФСГ	ЛГ
Нет (ложная операция)	4,87±0,83	22,1±3,28	8,13±2,12	5,07±0,83
Ишемия: 30 мин	3,78±0,57	12,7±0,61*	12,4±3,49*	7,62±2,60
Ишемия: 60 мин	2,17±0,41*	4,72±0,69**	17,7±,88**	11,7±3,42*

Примечание: * — различия с параметром у контрольных крыс значимы (P value $< 0,0001$); ** — различия с параметром у крыс после 30 мин ишемии и контрольных крыс значимы (P value $< 0,0001$).

Таблица 2

Количественная характеристика эндокринных клеток в зрелых пузырьчатых фолликулах и желтых телах (25%/Med/75%) на разных сроках острой тотальной ишемии яичников у крыс

Способ воздействия	Процент (и число) жизнеспособных эндокриноцитов		Процент (и число) погибших эндокриноцитов	
	Интерстициальных	Желтого тела	Интерстициальных	Желтого тела
Нет (ложная операция)	94,3/95,2/95,4 (176/193/221,5)	91,7/94,9/96,4 (15,0/16,5/19,3)	4,7/4,9/5,0 (9,3/10,5/13,7)	3,6/5,3/7,4 (0,75/1,0/1,25)
Ишемия: 30 мин	83,1/85,9/89,2 (122,3/150/161,0)	84,1/86,8/89,8 (18,0/21,0/26,8)	13,1/14,6/16,0 (18,0/23,5/32,8)	8,0/13,3/15,9 2,8/(3,0)/4,0
Ишемия: 45 мин	73,0/78,3/80,8 (116,3/124/134,5)	77,0/80,4/82,0 (16,8/19,6/23,0)	19,3/21,8/27,1 (30,0/36/39,0)	18,0/19,6/23,1 (4,8/6,0/6,3)
Ишемия: 60 мин	41,1/49,8/55,3* (75,3/84,5/102,3)*	58,1/64,0/72,2* (19,8/25,5/35,8)*	44,7/50,2/59,7* (70,8/95,5/107,0)*	27,9/36,0/43,8* (11,8/13,5/14,5)*

Примечание: число и процент эндокриноцитов пузырьчатых фолликулов определены из расчета на один фолликул. Число и доля лютеоцитов определены из расчета на единицу площади 0,01 мм². * — различия с параметрами у контрольных крыс значимы (P value $< 0,0001$).

Таблица 3

Изменения площади сечения жизнеспособных эндокриноцитов в зрелых пузырьчатых фолликулах и желтых телах (25%/Med/75%) на разных сроках острой тотальной ишемии яичников у крыс

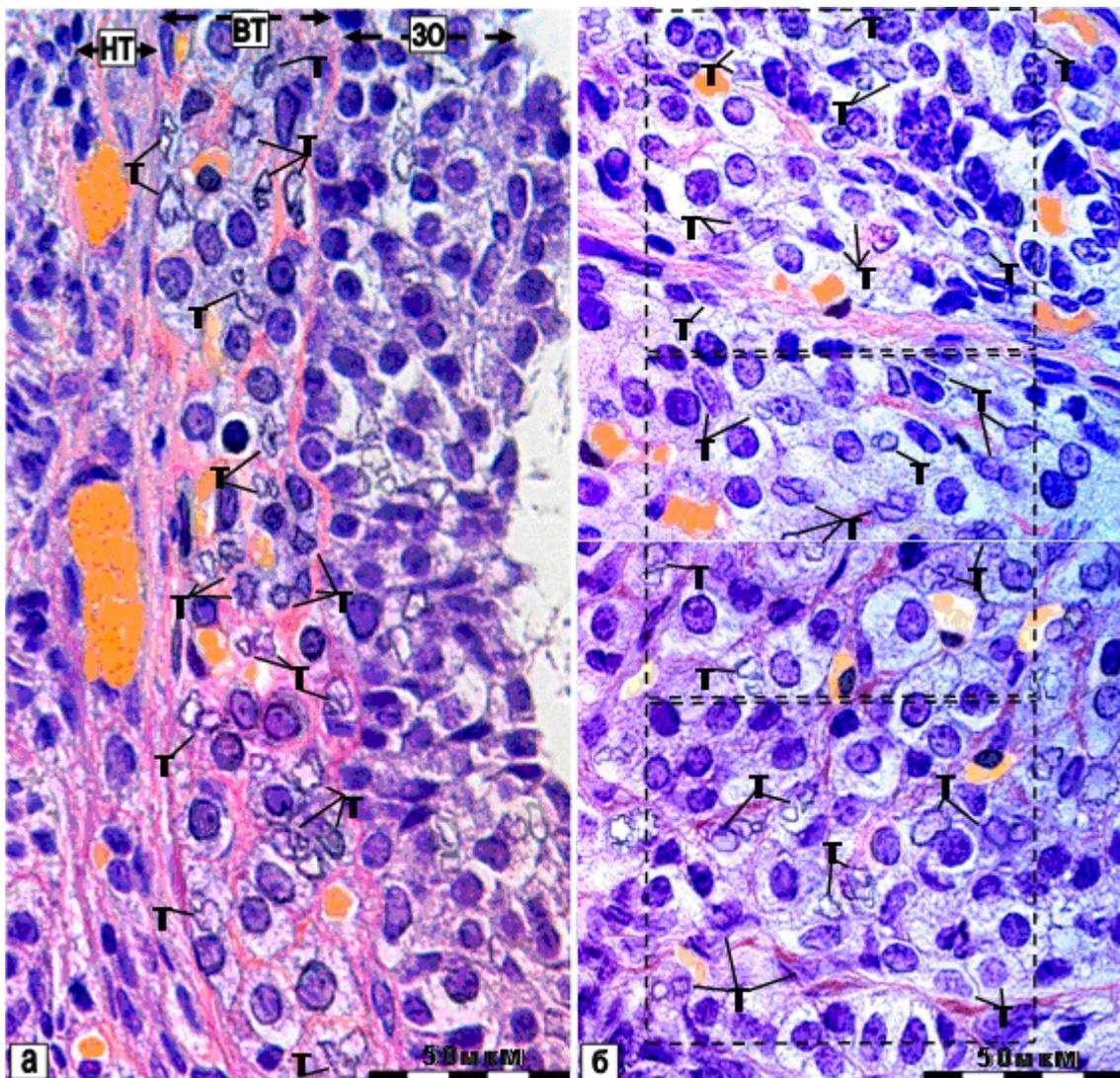
Параметр	Площадь жизнеспособных эндокриноцитов (мкм ²)	
	Интерстициальных	Желтого тела
Способ воздействия		
Нет (ложная операция)	190,5/235,1/276,3	197,0/254,3/302,9
Ишемия: 30 мин	152,5/178,5/214,9*	151,7/201,0/246,2*
Ишемия: 45 мин	128,6/161,5/202,0*	124,8/172,1/210,4*
Ишемия: 60 мин	108,0/133,0/157,2*	106,8/146,1/190,0*

Примечание: * — различия с параметрами у контрольных крыс значимы (P value < 0,0001).

уменьшились, тогда как число и доля в них клеток «теней» незначительно увеличилась (см. табл.2). Размер эндокриноцитов был уменьшен в 1,3-1,4 раза (табл.3).

Через 45 мин ишемии яичников количественные изменения эндокриноцитов обоих типов нарастали (P value > 0,05), их площадь, в сравнении с контролем, была уменьшена в 1,5-1,7 раз (P value < 0,0001).

Через 60 мин ишемии изменения концентраций гормонов яичников стали значительно более выраженными: так, снижение концентрации плазменного эстрадиола (в сравнении с уровнем в контроле) было более чем двухкратным, прогестерона — более чем пятикратным (см. табл.1). Соответственно, уровень гипофизарных гонадотропинов многократно увеличился, что подтверждает взаимодействие двух функциональных типов эндокринных клеток и наличие выраженной компенсаторной составляющей аденогипофиза во влиянии на эндокриноциты яичника.



Реактивные изменения интерстициальных эндокриноцитов во внутренней части теки третичного фолликула (а) и эндокриноцитов желтого тела (б) у крысы через 7 сут после тотальной ишемии яичника в течение 60 мин. Обозначения: ZO — зернистая оболочка фолликула, BT — внутренняя тека, HT — наружная тека фолликула, T — теньвидные нейроны (неизмененные и малоизмененные нейроны не обозначены). Ограничена площадь исследования в желтом теле, равная 0,01 мм² (пунктир). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. ×10, об. ×100

Выявленная реципрокная закономерность (снижение концентрации половых стероидов и нарастание уровня ФСГ/ЛГ по мере увеличения длительности ишемии яичников) может являться следствием известных биологических механизмов взаимодействия этих стероидов и промотора гена рецептора GnRH, который в нормальных условиях ингибирует экспрессию рецептора GnRH [8,9].

Жизнеспособные эндокриноциты в обоих типах фолликулов визуально значительно варьировали в размерах, ядерно-цитоплазматическом отношении и признаках дегенерации: часть клеток отличалась гиперхромным ядром, не содержащим различного ядрышка, в ядре другой части клеток преобладал эухроматин, ядрышко было отчетливым (см. рис.). Среди эндокринных клеток располагалось большое количество погибших форм, единичные лейкоциты. Процент жизнеспособных интерстициальных клеток и лютеоцитов (в сравнении с контролем) уменьшился в 1,7-1,9 раза соответственно, тогда как процент погибших клеток возрос в 7-10 раз (см. табл. 2).

Коэффициент корреляции полученных морфометрических параметров эндокриноцитов яичников и изменений концентрации половых эффекторных и регуляторных гормонов в динамике эксперимента колебался в интервале от 0,71 до 0,96.

Выводы

Однократная острая ишемия яичников индуцирует массовую гибель и дегенеративные изменения значительной части жизнеспособных эндокринных клеток зрелого третичного фолликула и желтого тела, наиболее выраженные при односторонней била-теральной окклюзии сосудов яичников. Названные количественные и структурные изменения интерстициальных эндокринных клеток и лютеоцитов яичника обуславливают значительное снижение выработки половых стероидов, которое, в свою очередь, вызывает гиперпродукцию соответствующих гипофизарных тропинов. Морфологические изменения обоих типов эндокринных клеток яичников в данной модели острой однократной ишемии яичников являются высокочувствительными; использование же ряда морфометрических параметров эндокриноцитов в комплексе с установлением концентрации периферических и регуляторных гормонов позволит применять эту модель для оценки эффективности коррекции женского гипогонадизма различными фармакологическими препаратами.

1. Даржаев З.Ю. Частота бесплодия в браке среди городского и сельского населения Республики Бурятия: результаты популяционного исследования // *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2017. Т.2(4). С.14-21.
2. Филиппов О.С. Причины и факторы развития бесплодия среди населения Сибири // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2002. (3):47.

3. Ohtaki T., Shintani Y., Honda S. et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor // *Nature*. 2001. Vol.411. P.613-617. DOI: <https://doi.org/10.1038/35079135>
4. de Roux N., Genin E., Carel J.C. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54 // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003. Vol.100(19). P.10972-10976. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1834399100>
5. Seminara S.B., Messager S., Chatzidaki E.E. et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty // *N Engl J Med*. 2003. Vol.349. P.1614-1627. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035322>
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Изд. 2-е. М.: Медицина, 2005. 832 с.
7. Freeman M.E. The ovarian cycle of the rat // *Physiology of reproduct* / Eds. E.Knobil, J.Nail/ New York.: Raven Press Ltd., 1988. P.1893-1928.
8. Laws S.C., Beggs J.M., Webster J.C., Miller W.L. Inhibin increases and progesterone decrease receptor for gonadotropin-releasing hormone in ovine pituitary cultures // *Endocrinology*. 1990. Vol.127(1). P.373-380. DOI: <https://doi.org/10.1210/endo-127-1-373>
9. Quinones-Jenab V., Jenab S., Ogawa S. et al. Estrogen regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in female rat pituitary tissue // *Mol. Brain Res*. 1996. Vol.38(2). P.243-250. DOI: 10.1016/0169-328x(95)00322-j

References

1. Z.Yu. Chastota besplodiya v brake sredi go-rodskogo i sel'skogo naseleniya Respubliki Buryatiya: rezultaty populyatsionnogo issledovaniya [The frequency of infertility in marriage among the urban and rural population of the Republic of Buryatia: The results of a population study]. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina — Fundamental and Clinical Medicine*, 2017, vol. 2(4), pp. 14–21.
2. Filippov O.S. Prichiny i faktory razvitiya besplodiya sredi naseleniya Sibiri [Causes and factors of infertility development among the population of Siberia]. *Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni — Epidemiology and Infectious Diseases*, 2002, vol. 3, 47 p.
3. Ohtaki T., Shintani Y., Honda S., et al. Nature. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2001, vol. 411, pp. 613–617. doi: <https://doi.org/10.1038/35079135>
4. de Roux N., Genin E., Carel J.C., Matsuda F., Chaussain J.L., Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100(19), pp. 10972–10976. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1834399100>
5. Seminara S.B., Messager S., Chatzidaki E.E., et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N. Engl. J. Med.*, 2003, vol. 349, pp. 1614–1627. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035322>
6. Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv [Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. Ed. K.U. Khabriyev. Moscow, Izdatel'stvo Meditsina Publ., 2005. 832 p.
7. Freeman, M. E. The ovarian cycle of the rat. *Physiology of reproduct*. Ed. E.Knobil & J. Nail. New York, Raven Press Ltd., 1988, pp. 1893–1928.
8. Laws S.C., Beggs J.M., Webster J.C., Miller W.L. Inhibin increases, and progesterone decrease receptor for gonadotropin-releasing hormone in ovine pituitary cultures. *Endocrinology*, 1990, vol. 127(1), pp. 373–380. doi:10.1210/endo-127-1-373
9. Quinones-Jenab V., Jenab S., Ogawa S., Funabashi T., Weesner G.D., Pfaff D.W. Estrogen regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in female rat pituitary tissue. *Mol. Brain Res.*, 1996, vol. 38(2), pp. 243–250. doi: 10.1016/0169-328x(95)00322-j