








Original Paper

Effects of Lithium on Morphine Tolerance Using Analgesia, Nitrite Determination, Histology and Immunohistochemistry of Forehead Cortex in Adult Male Swiss Mice

Saman Barzegar¹ , Tayebeh Noori (M.Sc)² , Mohammad Hosein Farzaei (Ph.D)³ 
Mozafar Khazaei (Ph.D)⁴ , Samira Shirooie (Ph.D)*⁵ 

¹ Pharm.D Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ² M.Sc in Applied Chemistry, Pharmaceutical Sciences Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ³ Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ⁴ Professor, Fertility and Infertility Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ⁵ Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

Abstract

Background and Objective: Chronic use of opioids leads to analgesic tolerance. Protein kinase C (PKC), adenylyl cyclase (AC), nitric oxide (NO) and glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) are involved in morphine tolerance. Lithium activates the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathway that inhibits GSK-3 β and reduces morphine-induced tolerance. This study was performed to evaluate the effects of lithium on morphine dependence symptoms and tolerance of its analgesic effects in Swiss mice by GSK-3 β signaling.

Methods: This experimental study was performed on 56 Swiss male albino mice that were randomly allocated into 8 groups (each containing 7 mice). The intraperitoneal injection of morphine at different concentrations (50, 50 and 75 mg/kg) and different hours (08:00, 11:00 and 16:00, respectively) was performed for 4 days, and a single dose 50 mg/kg was administered on the 5th day. The effects of three doses of lithium (1, 5 and 10 mg/kg) given orally, 45 min before morphine injections on morphine-induced analgesic tolerance were evaluated. To evaluate analgesia latency on day 1, 3 and 5, tail flick and hot plate tests were done. The brain of each animal was removed to measure nitrite levels, and histological evaluation and immunohistochemistry for p-glycogen synthase (p-GSSer640) were performed on the last day of the study.

Results: Co-administration of lithium significantly increased the latency of analgesia in comparison with the morphine group on the 3rd and 5th day ($P < 0.05$). Lithium reduced the morphine-induced increase of nitrite levels and also reduced brain damage. In addition, immunohistochemistry assay of p-GSSer640 indicated a significant reduction of the morphine-induced phosphorylation of GS at S640 by GSK in the lithium-treated mice.

Conclusion: Lithium administration can reduce morphine tolerance in adult male Swiss mice.

Keywords: Opioid, Pain, Morphine, Glycogen Synthase Kinase 3 beta, Lithium

*Corresponding Author: Samira Shirooie (Ph.D), E-mail: shirooie@gmail.com

Received 25 Dec 2021

Final Revised 25 Jul 2022

Accepted 27 Jul 2022

Published Online 26 Dec 2022

Cite this article as: Barzegar S, Noori T, Farzaei MH, Khazaei M, Shirooie S. [Effects of Lithium on Morphine Tolerance Using Analgesia, Nitrite Determination, Histology and Immunohistochemistry of Forehead Cortex in Adult Male Swiss Mice]. J Gorgan Univ Med Sci. 2022; 24(3): 41-50. [Article in Persian]





تحقیقی

اثر لیتیوم بر تحمل مورفین با استفاده از آزمایش‌های ضددرد، تعیین نیتريت، بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی قشر پیش‌پیشانی در موش‌های سوئیدی نر بالغ

سامان بزرگرا^۱، طیبه نوری^۲، دکتر محمدحسین فرزایی^۳، دکتر مظفر خزاعی^۴، دکتر سمیرا شیروئی*^۵

^۱ دانشجوی دکتری حرفه‌ای رشته داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ^۲ کارشناس ارشد شیمی کاربردی، پژوهشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ^۳ دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ^۴ استاد، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، پژوهشکده فناوری سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. ^۵ استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: مصرف مزمن اپیوئیدها منجر به بروز تحمل به اثرات ضددردی آنها می‌شود. پروتئین کیناز C، آدنیلیل سیکلاز، نیتريك اکساید و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ (GSK-3β) مکانیسم‌های مولکولی درگیر در تحمل مورفین هستند. لیتیوم باعث فعال شدن مسیر فسفاتیدیلینوزیتول ۳ کیناز (PI3K) / پروتئین کیناز بتا (AKT) می‌شود که GSK-3β را مهار کرده و تحمل ناشی از مورفین را کاهش می‌دهد. این مطالعه به منظور تعیین اثر لیتیوم بر علائم وابستگی به مورفین و تحمل به اثرات ضددردی آن در موش‌های سوئیدی از طریق سیگنالینگ GSK-3β انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۵۶ سر موش سوری سوئیدی آلبینو نر بالغ (۸ گروه ۷ تایی) انجام شد. تزریق داخل صفاقی مورفین با غلظت‌های ۵۰، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در ساعات ۸ صبح، ۱۱ صبح و ۱۶ عصر به مدت ۴ روز انجام شد و تک دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز پنجم انجام گردید. اثرات سه دوز خوراکی لیتیوم در غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ۴۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین، بر تحمل ناشی از مورفین بررسی شد. برای بررسی تحمل ضددرد در روزهای ۱، ۳ و ۵ مطالعه، تست‌های Hot plate و Tail flick انجام شد. در روز آخر مغز موش‌ها به منظور اندازه‌گیری سطح نیتريت، ارزیابی بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی برای p-گلیکوژن سنتاز (p-GSSer640) جمع‌آوری شدند.

یافته‌ها: مصرف همزمان لیتیوم به طور معنی‌داری تحمل ضددرد را در مقایسه با گروه مورفین در روز ۳ و ۵ افزایش داد ($P < 0.05$). لیتیوم افزایش سطح نیتريت ناشی از مورفین و همچنین آسیب مغزی را کاهش داد. لیتیوم، اثرات محافظتی بر تحمل به مورفین را در آزمایش ایمونوهیستوشیمی p-GSSer 640 نشان داد و فسفوریلاسیون GS در ریشه سرین 640 توسط GSK-3β را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: تجویز لیتیوم سبب کاهش تحمل مورفین در موش‌های سوئیدی نر بالغ گردید.

واژه‌های کلیدی: اپیوئید، درد، مورفین، گلیکوژن سنتاز کیناز ۳، لیتیوم

* نویسنده مسؤل: دکتر سمیرا شیروئی، پست الکترونیکی shirooie@gmail.com

نشانی: کرمانشاه، دانشکده داروسازی کرمانشاه، گروه فارماکولوژی، تلفن ۰۰۸۳-۳۴۲۶۶۷۸۰، نمابر ۳۴۲۷۶۴۸۹

وصول ۱۴۰۰/۱۰/۴ اصلاح نهایی ۱۴۰۱/۵/۳ پذیرش ۱۴۰۱/۵/۵ انتشار ۱۴۰۱/۱۱/۵

مقدمه

از بین داروهای اپیوئیدی، مورفین قوی‌ترین مسکن در استفاده بالینی بوده و عاملی بسیار موثر در برابر درد مزمن است؛ اما مصرف طولانی مدت آن منجر به وابستگی به این ترکیب می‌شود.^{۱،۲} با قطع مصرف مورفین و سایر اپیوئیدها علائم سندرم محرومیت شامل اضطراب، لرز، دردهای عضلانی، تحریک پذیری عصبی و حتی تشنج ایجاد می‌شود.^۳ متأسفانه بروز سریع دو پدیده تحمل و وابستگی نسبت به اثرات مورفین و سایر اپیوئیدها، مهم‌ترین عامل محدود کننده مصرف این داروهاست. مطالعات زیادی تاکنون به بررسی

مکانیسم‌های دخیل در وابستگی به اپیوئیدها پرداخته‌اند. گیرنده N-methyl-D-aspartate (NMDAR)، آدنیل سیکلاز (AC)، پروتئین کیناز C (PKC)، پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوزن (MAPK)، کیناز تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی (ERK) و سطوح اکسید نیتريك (NO) پس از تجویز مکرر مواد مخدر تغییر نموده و ممکن است در تحمل مورفین نقش داشته باشند.^۴

تحمل داروهای اپیوئیدی با تنظیم بالای مسیر چرخه‌ای آدنوزین مونو فسفات (cAMP) در سلول‌های هدف، کاهش تنظیم گیرنده‌های افیونی، فسفوریلاسیون، داخلی سازی و حساسیت‌زدایی

همراه است.^۵ همچنین فسفوریلاسیون پروتئین‌های G در سلول‌های در معرض مواد افیونی نیز رخ می‌دهد. سایر مطالعات نقش دوپامین،^۱ گلوتامات،^۶ نیتریک اکسید^۷ و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا (GSK-3β)^۸ را در تحمل مورفین پیشنهاد کرده‌اند. GSK-3β یک پروتئین مخصوص سرین / ترئونین است و نقش مهمی در تنظیم پلاستیسیته عصبی، بیان زن و زنده ماندن سلول‌ها دارد و در اکثر مهره‌داران به صورت دو ایزوفرم بسیار مشابه GSK3A و GSK3B (کدکننده پروتئین‌های GSK) بیان می‌شود.^{۸-۱۰}

لیتیوم یک مهار کننده آنزیم GSK-3B است و از مسیر سیگنال β-catenin تقلید می‌کند.^{۱۱} از طریق مهار کننده‌های GSK-3β تحمل مورفین با افزایش سطح p-GSK-3β (شکل بازدارنده) کاهش می‌یابد.^{۱۲-۱۴} GSK3 تنها پروتئین کیناز در بین بیش از ۷۰ مورد آزمایش شده است که توسط لیتیوم در غلظت‌های قابل تحمل درمانی مهار می‌شود.^{۱۵} لیتیوم در درمان اختلالات خلقی و همچنین در بیماری‌های تخریب کننده عصبی مفید است. لیتیوم می‌تواند بازسازی آکسون را تحریک کند و ممکن است پس از آسیب عصب محیطی، اثرات بازسازی میلین را داشته باشد.^{۱۶} نتایج یک مطالعه نشان داد مصرف داخل نخاعی لیتیوم باعث کاهش پاسخ درد نوروپاتیکی می‌شود.^{۱۷} این مطالعه به منظور برآورد اثرات لیتیوم بر تحمل مورفین با استفاده از آزمایش‌های ضد درد، تعیین نیتريت، ارزیابی بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی p-GSSer640 به عنوان هدف پایین دست GSK-3β در قشر پیش‌پیشانی موش‌های سوری سوئیسی انجام شد.

گروه لیتیوم ۱ + مورفین : درمان ترکیبی مورفین و لیتیوم یک میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (۴۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین).
گروه لیتیوم ۵ + مورفین : درمان ترکیبی مورفین و لیتیوم ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (۴۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین).
گروه لیتیوم ۱۰ + مورفین : درمان ترکیبی مورفین و لیتیوم ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (۴۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین).
القای تحمل مورفین با تزریق پایایی داخل صفاقی مورفین روزانه در دوزهای مختلف (به ترتیب ۷۵، ۵۰، ۵۰) به مدت پنج روز متوالی در موش‌ها انجام شد. در ۴ روز اول مورفین هیدروکلراید در ساعت ۰۸:۰۰، ۱۱:۰۰ و ۱۶:۰۰ تجویز شد. سپس در روز پنجم یک دوز مورفین هیدروکلراید (۵۰ mg/kg/bw) در ساعت ۰۸:۰۰ تجویز شد.^{۱۸}

تست‌های رفتاری شامل تست Tail flick در ساعت ۰۸:۴۵ صبح و تست Hot plate در ساعت ۰۹:۰۰ صبح برای برآورد تحمل مورفین در روزهای ۱، ۳ و ۵ انجام شد. در تست Tail flick ستونی از اشعه نوری در ناحیه وسط سطح پشتی دم حیوان تابانده شد و تاخیر زمانی برای احساس درد و کنار کشیدن دم به عنوان شاخص اندازه‌گیری درد در نظر گرفته شد. حداکثر زمان تحمل برای موش‌ها، ۱۰ ثانیه در نظر گرفته شد. برای تست Hot plate، موش‌ها روی صفحه‌ای که تا دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به صورت الکتریکی داغ می‌شود؛ قرار داده شدند. زمانی که طول کشید تا موش پنجه پشتی خود را لیس بزند یا پرده؛ زمان تاخیر محسوب شد. حداکثر زمان تحمل برای موش‌ها، ۹۰ ثانیه در نظر گرفته شد.^{۱۸}

پس از انجام آزمایش‌های ضد درد در روز آخر، موش‌ها توسط کتامین (50 mg/kg, i.p.) و زایلازین (10 mg/kg, i.p.) بیهوش شدند. سپس با برش در ناحیه گردن از بین رفتند. پس از

روشی بررسی

این مطالعه تجربی روی ۵۶ سر موش سوری سوئیسی آلبینو نر بالغ (۲۷±۳ گرم) خریداری شده از شرکت علم باوران آفتاب کرمانشاه طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۹ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (IR.KUMS.REC.1399.1011) قرار گرفت. پروتکل اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

حیوانات در قفس‌های استاندارد با دمای ۲۵±۱ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵±۱۰ درصد و چرخه تاریکی - روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. در طول یک هفته دوره سازگاری، موش‌ها به غذا و آب استاندارد دسترسی داشتند. آزمایشات رفتاری در یک اتاق آرام بین ساعت ۹:۰۰ تا ۱۴:۰۰ انجام شد. در مطالعه از هر موش فقط یکبار استفاده شد.

لیتیوم، مورفین هیدروکلراید، سولفانیل آمید و N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride از مرک (Buchs, Switzerland) خریداری شدند. آنتی‌بادی ضد فسفوگلیکوژن سنتاز (phospho S640)1/GYS1

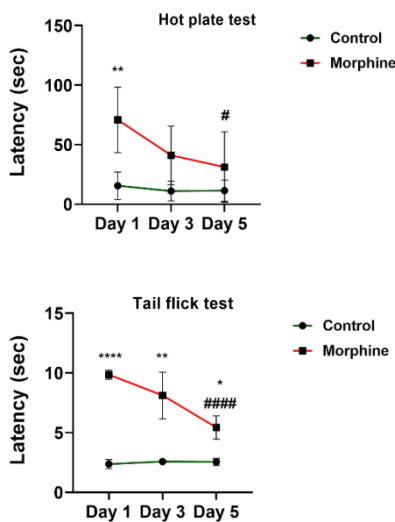
مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان / پاییز ۱۴۰۱ / دوره ۲۴ / شماره ۳ (بی در بی ۸۳)

با هماتوكسيلين به مدت ۲ دقيقه در RT انجام شد. بررسي اسلايدها با آنتي ژن، با ميكروسكوپ نوري (Olympus، MDOB3-U، ژاپن) انجام شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-22 تجزيه و تحليل شدند. از آزمون آناليز واريانس يك طرفه واريانس (one-way ANOVA) براي سنجش‌هاي نيتريت و p-GS و از اندازه‌گيري مكرر ANOVA يك طرفه (One-way ANOVA) براي سنجش آزمون درد استفاده شد. هنگامي كه تفاوت‌هاي قابل توجهي بين گروه‌ها پيدا شد؛ تست Tukey (براي ANOVA يك طرفه) انجام شد. داده‌ها به صورت ميانه‌گين و انحراف معيار گزارش شدند. سطح معني‌داري آزمون‌ها كمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

يافته‌ها

آزمایش Hot plate و Tail flick نشان داد تزریق مکرر مورفین در طول پنج روز به طور قابل توجهی اثر ضددرد دارو را در مقایسه با روز اول تجویز کاهش می‌دهد که بیانگر القای تحمل به اثرات ضددردی مورفین است ($P < 0.001$) (شکل یک).



شکل ۱: اثر تجویز ۵ روزه مورفین برای القای تحمل به اثرات ضددرد مورفین ($P < 0.001$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل $P < 0.001$ در مقایسه با روز اول گروه مورفین)

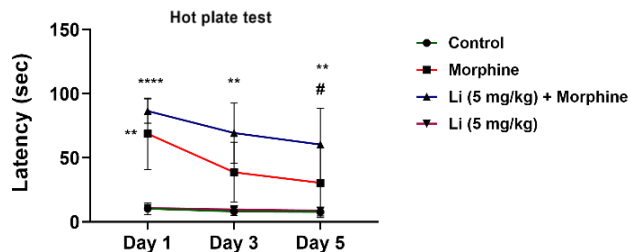
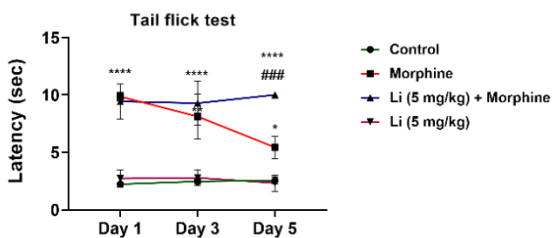
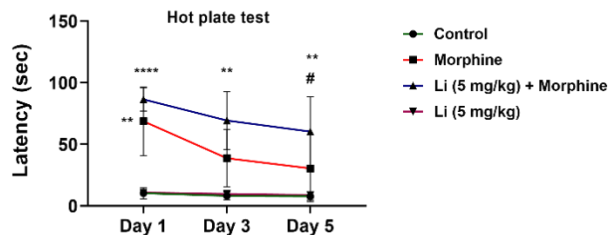
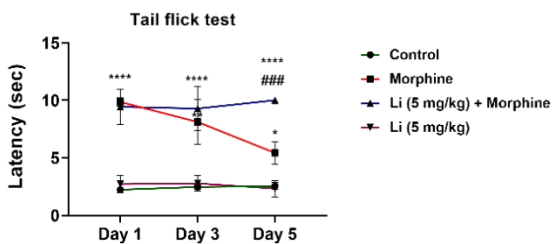
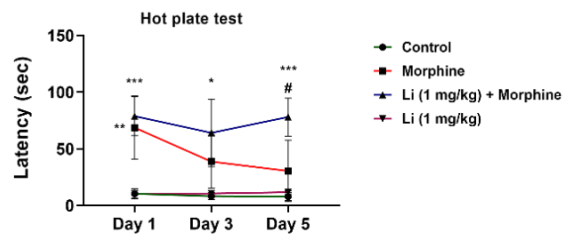
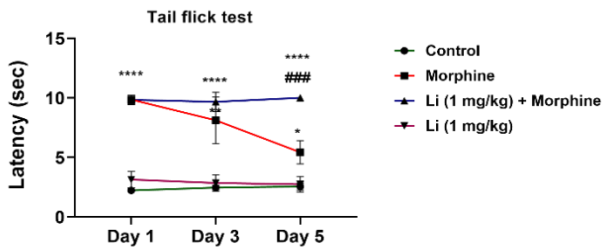
با توجه به شکل ۲ تجویز خوراکی دوزهای متعدد لیتيوم (۱۰، ۵، و ۱ mg/kg/bw) در ۱ و ۴۵ دقيقه قبل از تزریق مورفین) اثر ضددرد را نسبت به مورفین ($P < 0.001$) و گروه کنترل ($P < 0.001$) در تست‌های plate flick و tail flick به میزان قابل توجهی افزایش داد و منجر به کاهش بروز تحمل به اثرات ضددردی مورفین برای هر سه دوز لیتيوم شد.

قرار گرفتن در معرض لیتيوم به تنهایی بر روی آزمایش‌های تحمل (Hot plate و tail flick) موثر نبود و تفاوت آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد.

کالبدشکافی بافت مغز، کل بافت مغز نیمی از موش‌ها در یک میلی‌لیتر PBS (pH 7.4) قرار داده شد و با هموژنايزر (KUNHEWUHUA، China) همگن شدند. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقيقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع‌آوری و برای سنجش نيتريت مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی در پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر سولفانیل آمید (در ۴ H3PO ۵ درصد) اضافه شد و در دمای اتاق و دور از نور نگهداری گردید. ۵ دقيقه بعد ۵۰ میکرولیتر N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NEDD) (۰/۱ درصد وزنی - حجمی در آب) به چاهک اضافه گردید. پس از انکوباسیون ۱۰ دقيقه‌ای در دمای اتاق دور از نور، تشخیص نيتريت در طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام شد.^{۱۹}

به منظور رنگ‌آمیزی هماتوكسيلين و اتوزين، هیپوکامپ نیم دیگر موش‌های هر گروه در پارافورمالدهید ۴ درصد به مدت ۷۲ ساعت ثابت شد. پس از دهیدراتاسیون توسط سری الکل درجه‌بندی شده، نمونه‌ها در پارافین قرار داده شدند. سپس مقاطع با ضخامت ۵ میکرومتر از نمونه‌های قرار داده شده در پارافین توسط میکروتوم به‌دست آمد و برای تجزيه و تحليل بافت‌شناسی با هماتوكسيلين - اتوزين رنگ‌آمیزی شدند.

p- GSSer640 توسط ایمونوهیستوشیمی پره‌فرونتال کورتکس مغز موش قرار داده شده در پارافین تعیین شد. بخش‌های قشر در زایلین پارافین‌زدایی شدند. سپس در سری الکل‌های درجه‌بندی شده با آب مقطر، دوباره هیدراته و در نهایت با PBS شستشو داده شدند. آنتی‌ژن در بافر تری‌سدیم سیترات (pH 7.4، ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ دقيقه) بازیابی شد. سپس نمونه‌ها با TBS به اضافه ۰/۰۳ درصد Triton X-100 شسته و در سرم نرمال ۱۰ درصد به مدت ۲ ساعت در RT مسدود شدند. پس از آن اسلايدها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی اولیه پلی‌کلونال خرگوش (با رقت ۱:۱۰۰۰)، فسفوگلیکوزین سنتاز Anti-Glycogen synthase 1/GYS1 (phospho S641) antibody (ab2479) (آمریکا، Abcam) انکوبه شدند. اسلايدها (۳ بار به مدت ۵ دقيقه) با TBS به اضافه ۰/۰۳ درصد Triton X-100 شسته و ۳ H2O2 درصد را در RT به مدت ۱۰ دقيقه انکوبه کردند و ۴ بار با PBS شستشو داده و با آنتی‌بادی ثانویه چند ظرفیتی بیوتینیل‌بز (زرد) آنتی‌خرگوش (با رقت ۱:۱۰۰۰) (Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC) (۱:۱۰۰۰) (Kit (ab64261) (آمریکا، Abcam) به مدت ۱۰ دقيقه در RT انکوبه شدند. پس از ۳ بار شستشو با TBS به اضافه ۰/۰۳ درصد Triton X-100، بخش‌ها با استرپتاویدین HRP- (صورتی) به مدت ۱۰ دقيقه در RT انکوبه و با PBS شستشو داده شدند و به ترتیب محلول ۳، ۳- Diaminobenzidine (DAB) و آب مقطر اضافه شد و رنگ‌آمیزی

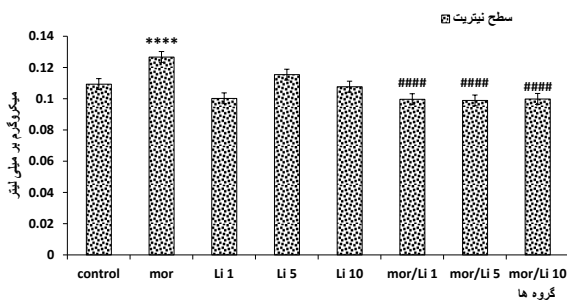


شکل ۲: نقش دوزهای مختلف لیتیموم (۱۰ و ۱، ۵) در تحمل به اثرات ضددردی مورفین طی ۵ روز درمان
 $P < 0.05$ ، * $P < 0.01$ ، *** در مقایسه با گروه کنترل
 $P < 0.05$ ، # $P < 0.01$ ، ### در مقایسه با روز اول گروه مورفین

کاهش تراکم کروماتین وجود داشت. همچنین در نواحی مختلف مغز تراکم نورون‌ها و تراکم زوائد سلولی آنها در فضای بین نورونی کاهش داشت. در برخی مسیرهای عصبی تخریب نسبی میلین و گلیوزیس وجود داشت. درمان گروه مورفین با دوزهای مختلف لیتیموم، نمای بافتی قشر مغز به گروه کنترل شبیه بود و آرایش و مورفولوژی نورونی در هیپوکامپ کاملاً طبیعی و حتی بهتر از گروه کنترل به نظر می‌رسید. عمدتاً سلول‌ها هر می چندوجهی بودند و

درمان مزمن با مورفین در ۵ روز متوالی به طور قابل توجهی سطح نیتريت مغزی را نسبت به گروه کنترل افزایش داد ($P < 0.01$) (نمودار یک). تجویز خوراکی لیتیموم ۴۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین، منجر به کاهش سطح نیتريت ناشی از مورفین در هر سه دوز لیتیموم شد ($P < 0.001$). تجویز لیتیموم به تهای اثر معنی‌داری بر سطح نیتريت بافت مغزی نسبت به گروه کنترل نشان نداد.

در بررسی بافت‌شناسی، لام‌های تهیه شده گروه کنترل از نمونه‌های هیپوکامپ (برش ساژیتال و رنگ آمیزی شده هر نیمکره با روش همتوکسیلین-اوتوزین) نمای طبیعی قشر و لایه‌های تشکیل دهنده آن و هسته‌های مغزی مشاهده شد. پراکنندگی سلولی و ابعاد سلول‌ها در لایه‌های مختلف قشر مغز و تراکم زوائد سلولی در فضای بین نورونی طبیعی بود. نورون‌ها فاقد تغییر التهاب یا تخریب بودند. نمای کروماتین و هسته‌ها طبیعی بود. ارتشاح لکوسیتی وجود نداشت (شکل A-۳). در گروه مورفین (شکل B-۳) ارتشاح لکوسیتی به خصوص لنفوسیتی در برخی نواحی، عمدتاً در نواحی سطحی مشاهده شد. سلول‌های هر می درشت‌تر در نواحی داخلی قشر مغز دارای هسته‌های هتروژن بودند. نورون‌ها در برخی نواحی، فشرده و تیره رنگ و در سایر نواحی از جمله هیپوکامپ هسته‌ها کمرنگ و



نمودار ۱: سطح نیتريت پس از قرار گرفتن در معرض مزمن مورفین و دوزهای مختلف لیتیموم (۱، ۵، ۱۰ mg/kg/bw) با مورفین
 $P < 0.001$ ، **** در مقایسه با گروه کنترل
 $P < 0.001$ ، #### در مقایسه با گروه مورفین

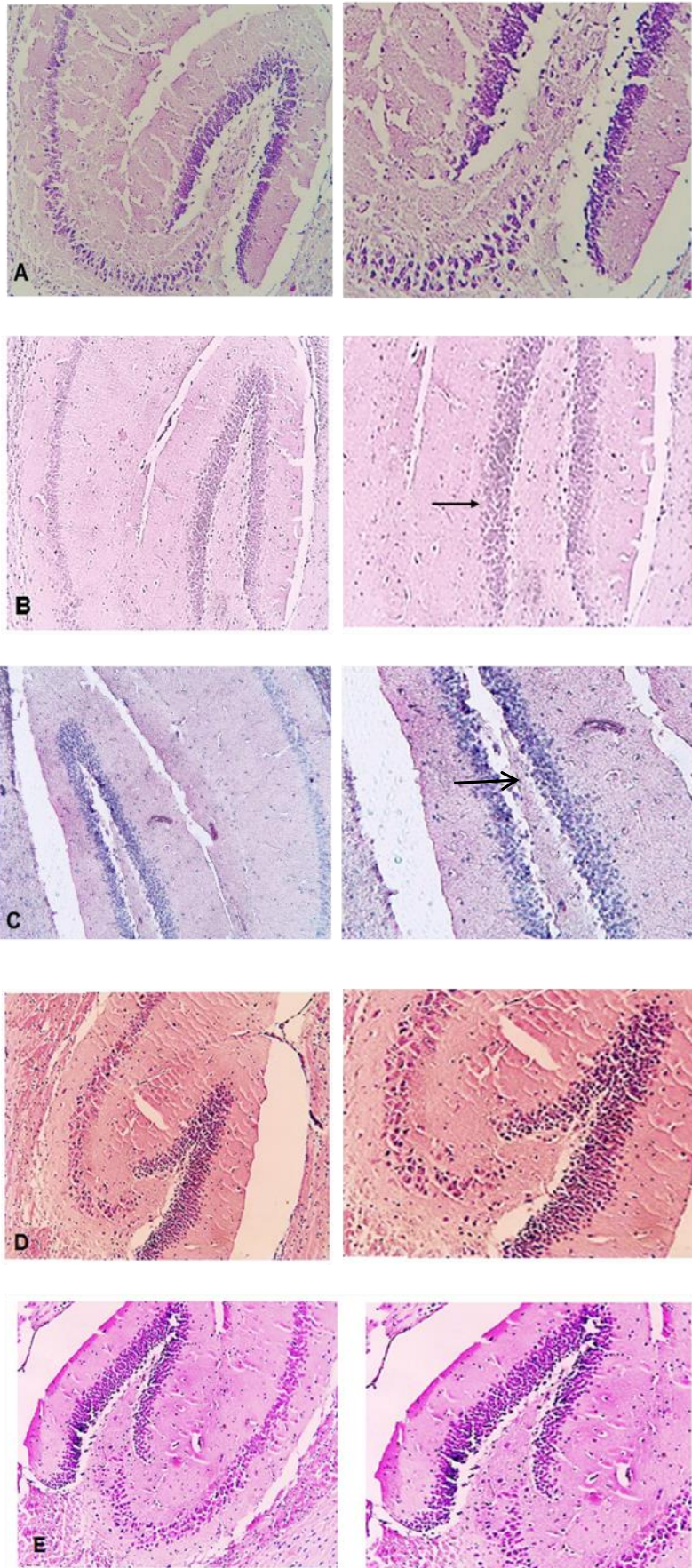
زوائد سلولي تراکم مناسب داشتند. همچنين نماي هسته و کروماتين طبيعي بود. تغييرات التهابي عروق و تخريبي ميليون وجود نداشت و يا بسيار اندک و پراکنده بود (شکل E-C ۳).

با توجه به تست ايمونوهيستوشيمي بافت پره فرونتال کورتکس مغز و شکل ۴ تزريق مزمن مورفين به طور قابل توجهي فسفوريلاسيون GS را در ريشه سرين ۶۴۰ به عنوان يک هدف پايين دست GSK-3 β در مقايسه با گروه کنترل افزايش داد ($P < 0.001$). پيش درماني با لیتيوم (10 mg/kg/bw و 5 و 1) قبل از هر بار تجویز مورفين به طور قابل توجهي مانع اثر مورفين بر سطح p-GSSer640 شد ($P < 0.001$) و کاهش سطح p-GSSer640 توسط تجویز لیتيوم با اثر مهاری بر GSK-3 β مرتبط بود. تجویز لیتيوم در هر سه دوز، به تنهایی نسبت به گروه کنترل تفاوت آماری معنی داری در فسفوريلاسيون GS نشان نداد.

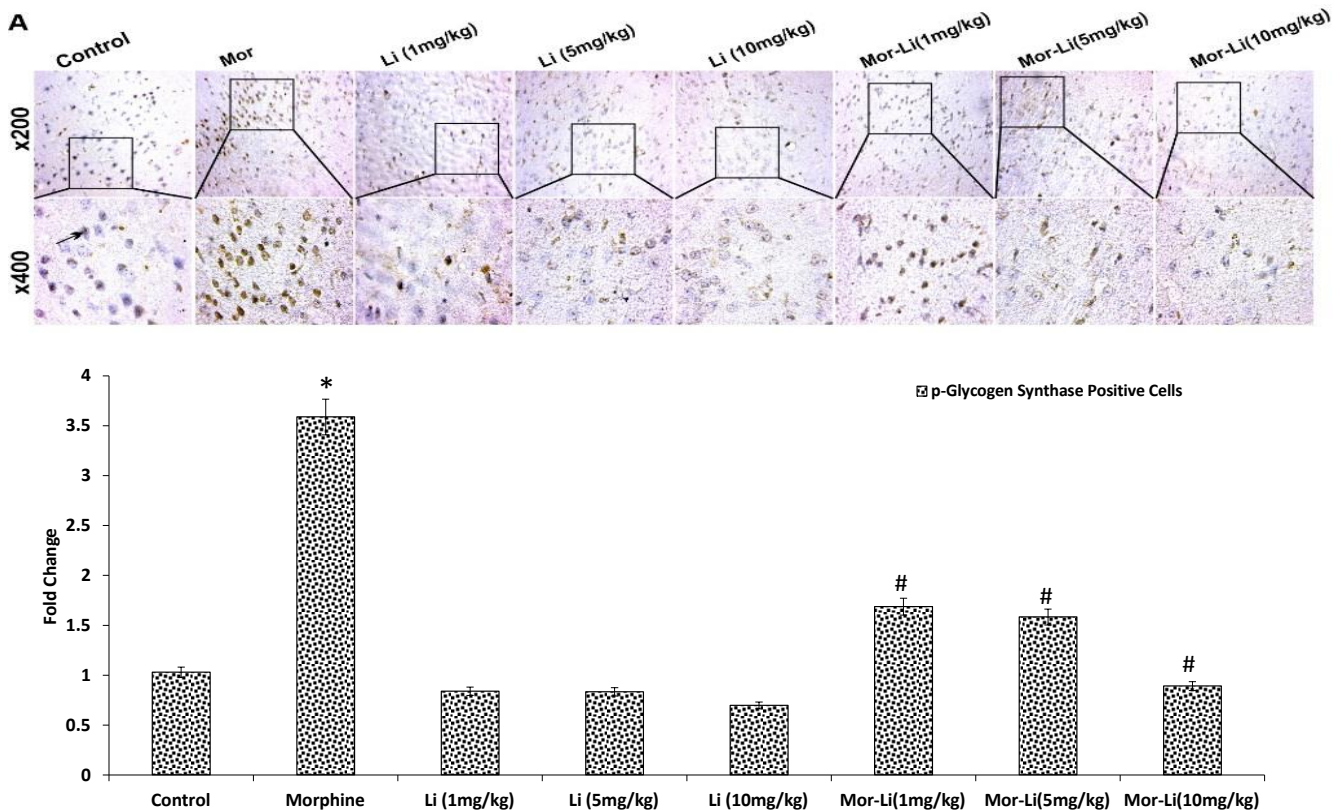
بحث

با توجه به نتایج مطالعه، مصرف همزمان لیتيوم به طور معنی داری تحمل ضد درد را در مقايسه با گروه مورفين در روز ۳ و ۵ افزايش داد. لیتيوم افزايش سطح نيتريت ناشی از مورفين و همچنين آسیب مغزی را کاهش داد. لیتيوم اثرات محافظتی بر تحمل به مورفين را در آزمایش ايمونوهيستوشيمي p-GSSer640 نشان داد و فسفوريلاسيون GS در ريشه سرين ۶۴۰ توسط GSK3 β را کاهش داد که با تجویز مزمن مورفين فعال می شود.

تحمل، وابستگی، سندرم ترک و درد زياد از مهم ترين عوارض جانبي مواد اپیوئیدی است.^{۲۰} اين عوارض جانبي ناشی از چندین مکانيسم مانند افزايش غلظت داخل سلولي کلسيم، مسير $JNK / \text{arrestin } 3$ و آزاد سازی سيتوکين های پيش التهاب از طريق اتصال به گیرنده TLR4 سلول های گلیال است.^{۲۱، ۲۲} مورفين باعث فعال شدن میکروگلیا و متعاقباً باعث افزايش سطح سيتوکين های پيش التهاب مانند $IL-1\beta$ ، $IL-6$ و $TNF-\alpha$ می شود که در پيشرفت تحمل مورفين موثرند.^{۲۳} در هنگام تحمل به اپیوئیدها سطح



شکل ۳: رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اؤزین از هیپوکامپ (سمت چپ بزرگنمایی $\times 10$ ، سمت راست بزرگنمایی $\times 40$) (A) کنترل، (B) مورفين، (C) مورفين + لیتيوم، (D) مورفين + لیتيوم، (E) مورفين + لیتيوم 10



شکل ۴: تجزیه و تحلیل ایمنوهیستوشیمیایی بیان p_GSser640 در پره فورونتا کورتکس مغز حیوانات. (* $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل، # $P < 0.001$ ر مقایسه با گروه مورفین)

مورفین منجر به تنظیم مسیر سیگنالینگ cAMP و فسفوریلاسیون پروتئین DARPP-32 و در نهایت دفسفوریلاسیون GSK-3 β (شکل فعال) می‌شود.^{۱۳} در مطالعه Barr و Unterwald نقش GSK-3 β در تحمل مواد اپیوئیدی، سیگنالینگ ضد درد و وابستگی از طریق کنترل عملکرد NMDAR گزارش شده است.^{۲۹} در مطالعه *in vitro* نظام‌الاسلامی و همکاران لیتیوم به عنوان یک مهار کننده GSK-3 β باعث کاهش تحمل و مورفین در سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان و کاهش سطح نیتريت گردید.^{۳۰} در مطالعه انجام شده روی موش سوری، تزریقات مکرر مورفین منجر به فعال‌سازی GSK-3 β و در نهایت کاهش اثر ضددردی گردید. به طوری که در موش‌هایی با GSK-3 β غیرفعال، تحمل به اثر ضددردی مورفین مهار گردید.^{۳۱} از طرفی نقش GSK-3 β در بروز درد و فرآیندهای مرتبط با التهاب اعصاب و بیماری‌های نورودژنراتیو ثابت شده است.^{۳۲} نتایج یک مطالعه نشان داد که بیان آنزیم GSK-3 β در مغز بیماران معتاد به اوبیوئیدها افزایش یافته و در نوروپاتولوژی مرتبط با اوبیوئیدها ارتباط مستقیم دارد. به نحوی که با مهار این آنزیم از آثار نوروتوکسیک مورفین پیشگیری خواهد شد.^{۳۳} در مطالعه دیگر، با تزریقات مکرر مورفین طی ۶ روز نسبت به اثرات ضد دردی مورفین تحمل ایجاد شد و در گروه‌هایی که علاوه بر مورفین، مهار کننده‌های GSK-3 β شامل SB216763 و SB415286 را دریافت کرده بودند؛ تحمل ایجاد شد و علائم سندرم قطع بعد از تجویز

cAMP و نیتريك اکساید و همچنین فعالیت تعدادی از آنزیم‌ها مانند MAPK، PKC و iNOS افزایش می‌یابد.^{۱۹} نیتريك اکسید یک نقش برجسته در تحمل به مورفین دارد. بعضی از مطالعات نشان داده‌اند مهار آنزیم نیتريك اکساید سینتاز سبب مهار علائم سندرم قطع به دنبال استفاده از نالوکسون می‌شود. همچنین مهار تولید NO از طریق مهارکنندگان اختصاصی NOS باعث کاهش علائم تحمل و وابستگی به مورفین می‌شود.^{۲۴} مطالعات مختلف *in vitro* و *in vivo* مبنی بر اثرات داروهای مختلف بر مهار تحمل به مورفین انجام شده که باعث مهار افزایش سطح NO طی استفاده مکرر مورفین و مانع از بروز تحمل به اثرات مورفین شدند.^{۲۵} علاوه بر این، برخی از کینازها مانند GSK-3 β در تحمل مواد اپیوئیدی نقش دارند.^{۲۶} گلیکوژن سینتاز کیناز، یک سرین/تروئونین پروتئین کیناز است که منجر به فسفوریلاسیون ریشه‌های سرین و تروئونین در پروتئین‌های پایین دست خود می‌شود. مهم‌ترین پروتئین‌های پایین دست آن GS (گلیکوژن سینتاز)، فاکتور رونویسی eIF2B و β -catenin است که طی فسفوریلاسیون توسط GSK غیرفعال می‌شوند. آنزیم GSK-3 β در مسیرهای مختلف سلولی از جمله پرولیفراسیون سلولی، تنظیم گلوکز، بیان پروتئین‌ها و آپوپتوز نقش برجسته‌ای دارد. این آنزیم توسط آنزیم‌های مختلف مانند Akt و MAPK در ریشه‌های مختلف سرین فسفریله و غیرفعال می‌شود و در زمان غیرفسفریله بودن، فعال است.^{۲۷، ۲۸} استفاده طولانی مدت از

اسکار، کاهش التهاب نورون‌ها در مغز موش و همچنین کاهش پهنای ماده خاکستری نخاع شده است.^{۴۳،۴۴} نتایج بررسی بافت‌شناسی در این مطالعه نشان داد که قرار گرفتن در معرض مزمن مورفین منجر به اتساع عروق، تغییر سلول‌های هرمی در مناطق داخلی قشر مغز به شکل گرد، تخریب نسبی میلین، نفوذ لنفوسیت و التهاب می‌شود؛ اما در تجویز لیتیموم قبل از هر تزریق مورفین این تغییرات پاتولوژیک را معکوس کرده است. لیتیموم علاوه بر مهار مستقیم عملکرد آنزیمی GSK-3β به طور غیرمستقیم از طریق افزایش فسفوریلاسیون Ser21/9 منجر به مهار آن می‌گردد.^{۱۱}

در مطالعه حاضر استفاده طولانی مدت از مورفین به میزان قابل توجهی سطح p-GSSer640 را افزایش داد که تایید کننده آن است که مورفین باعث افزایش فعالیت GSK-3β می‌شود. در حالی که پیش‌درمانی با لیتیموم قبل از هر بار تزریق مورفین به طور قابل توجهی باعث کاهش p-GSSer640 و کاهش فعالیت بالای GSK-3β گردید.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که لیتیموم به عنوان یک مهار کننده GSK-3β می‌تواند کیفیت تجویز طولانی مدت مورفین را در موش سوئیسی نر بالغ بهبود بخشد. یکی از گزینه‌های درمانی مناسب برای درمان عوارض ناشی از مورفین می‌تواند تعدیل فعالیت GSK-3β باشد. با توجه به نقش لیتیموم در ایجاد تحمل ضد درد مورفین، می‌توان از آن در ترکیب با مورفین برای جلوگیری از تحمل استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای سامان برزگر برای اخذ درجه دکتری حرفه‌ای در رشته داروسازی (شماره ۹۹۰۲۲۸) از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه بود. نویسندگان اعلام می‌دارند که تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Dai WL, Xiong F, Yan B, Cao ZY, Liu WT, Liu JH, et al. Blockade of neuronal dopamine D2 receptor attenuates morphine tolerance in mice spinal cord. *Sci Rep*. 2016; 6: 38746. DOI: 10.1038/srep38746
2. Esmaili-Mahani S, Ebrahimi B, Abbasnejad M, Rasouljan B, Sheibani V. Satreja khuzestanica prevents the development of morphine analgesic tolerance through suppression of spinal glial cell activation in rats. *J Nat Med*. 2015 Apr; 69(2): 165-70. DOI: 10.1007/s11418-013-0796-6
3. Cooper ZD, Johnson KW, Pavlicova M, Glass A, Vosburg SK, Sullivan MA, et al. The effects of ibudilast, a glial activation inhibitor, on opioid withdrawal symptoms in opioid-dependent volunteers. *Addict Biol*. 2016 Jul; 21(4): 895-903. DOI: 10.1111/adb.12261
4. Liao WW, Tsai SY, Liao CC, Chen KB, Yeh GC, Chen JY, et al. Coadministration of glycogen-synthase kinase 3 inhibitor with morphine attenuates chronic morphine-induced analgesic

نالوکسان را کاهش دادند.^۴ لیتیموم یکی از پرکاربردترین داروهای تثبیت کننده خلق و خو برای مدیریت اختلال دوقطبی است. کلرید لیتیموم (LiCl) در غلظت سرمی درمانی (یک میلی مولار)، یک مهار کننده مستقیم ضعیف^{۳۳،۳۵} و مهارکننده غیرمستقیم قوی GSK-3β از طریق فعال‌سازی Akt و مهار فسفوریلاسیون GSK-3β است.^{۳۶} علاوه بر این، لیتیموم می‌تواند با فعال کردن فسفودی استراز وابسته به cGMP (PDE) هیدرولیز cAMP را القا کند.^{۳۷} لیتیموم با استفاده از مکانیسم‌های مختلف، گیرنده‌های N-Methyl-d-aspartate (NMDA) را تنظیم می‌کند. همچنین لیتیموم بر مسیر پیام‌رسانی NMDA/NOS/NO تأثیر می‌گذارد و تولید NO را کاهش می‌دهد.^{۳۸} لیتیموم علاوه بر تعدیل کننده تولید NO در مغز، پروتئین‌های Gi و Gs را مهار می‌کند که منجر به مهار سیکلازهای آدنیلات و گوانیلات و پروتئین کینازهای مختلف می‌شود.^{۳۹} لیتیموم بر روی آبشار آدنیلیل سیکلاز/cAMP تأثیر می‌گذارد و از تشکیل cAMP جلوگیری می‌کند. لیتیموم می‌تواند افزایش cAMP را به دلیل قرار گرفتن در معرض مورفین طی یک دوره ۴۸ ساعته با سلول‌ها سرکوب کند.^{۴۰} علاوه بر این، خواص ضدالتهابی لیتیموم منجر به تنظیم نادرست سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و اینترلوکین TNF-α و مکانیسم‌های داخل سلولی از جمله GSK-3β می‌شود.^{۴۱} در مطالعه حاضر تحمل ضد درد مورفین با تجویز مزمن لیتیموم از بین رفت. پیش‌تجویز لیتیموم در مقایسه با گروه مورفین توانست از کاهش آستانه ضد درد جلوگیری کند. نتایج مطالعه البرزی و همکاران نشان داد لیتیموم می‌تواند از القای تحمل و وابستگی ناشی از مورفین در مدل ایلوم خو کچه هندی جلوگیری کند. این برهمکنش ممکن است به دلیل کاهش فعالیت سنتاز اکسید عصبی (nNOS)، به دلیل تغییرات در انتشار انتقال دهنده عصبی و یا ممکن است شامل تغییرات در بیان ژن nNOS باشد.^{۴۲} در مطالعه حاضر لیتیموم باعث کاهش میزان اکسید نیتریک ناشی از تزریق مزمن مورفین و کاهش تحمل مورفین شد. مطالعاتی نشان داده‌اند که مورفین منجر به افزایش سلول‌های گلیال

- tolerance and withdrawal syndrome. *J Chin Med Assoc*. 2014 Jan; 77(1): 31-37. DOI: 10.1016/j.jcma.2013.09.008
5. Shams J, Sahraei H, Faghieh-Monzavi Z, Salimi SH, Fatemi SM, Pourmatabbed A, et al. Effects of Papaver rhoeas Extract on the Tolerance Development to Analgesic Effects of Morphine in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2008; 7(2): 141-47.
 6. Hamdy MM, Elbadr MM, Barakat A. Bupropion attenuates morphine tolerance and dependence: Possible role of glutamate, norepinephrine, inflammation, and oxidative stress. *Pharmacol Rep*. 2018 Oct; 70(5): 955-62. DOI: 10.1016/j.pharep.2018.04.003
 7. Hassanipour M, Rajai N, Rahimi N, Fatemi I, Jalali M, Akbarian R, et al. Sumatriptan effects on morphine-induced antinociceptive tolerance and physical dependence: The role of nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. 2018 Sep; 835: 52-60. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.07.021

8. Zheng GL, Su Z, An LJ, Liu HL. [Roles of GSK-3beta signaling pathway in chronic morphine tolerance in rat]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2015 Sep; 31(5): 389-91. [Article in Chinese]
9. Kalinderi K, Fidani L, Katsarou Z, Clarimón J, Bostantjopoulou S, Kotsis A. GSK3β polymorphisms, MAPT H1 haplotype and Parkinson's disease in a Greek cohort. *Neurobiol Aging*. 2011 Mar; 32(3): 546.e1-5. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.05.007
10. Snitow ME, Bhansali RS, Klein PS. Lithium and Therapeutic Targeting of GSK-3. *Cells*. 2021 Jan; 10(2): 255. DOI: 10.3390/cells10020255
11. Muneer A. Wnt and GSK3 Signaling Pathways in Bipolar Disorder: Clinical and Therapeutic Implications. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2017 May; 15(2): 100-14. DOI: 10.9758/cpn.2017.15.2.100
12. Muller DL, Unterwald EM. In vivo regulation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and protein kinase B (Akt) phosphorylation by acute and chronic morphine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Aug; 310(2): 774-82. DOI: 10.1124/jpet.104.066548
13. Parkitna JR, Obara I, Wawrzczak-Bargiela A, Makuch W, Przewlocka B, Przewlocki R. Effects of glycogen synthase kinase 3beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibitors on morphine-induced analgesia and tolerance in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Nov; 319(2): 832-39. DOI: 10.1124/jpet.106.107581
14. Baser T, Ozdemir E, Filiz AK, Taskiran AS, Gursoy S. Ghrelin receptor agonist hexarelin attenuates antinociceptive tolerance to morphine in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2021 May; 99(5): 461-67. DOI: 10.1139/cjpp-2020-0218
15. O'Brien WT, Klein PS. Validating GSK3 as an in vivo target of lithium action. *Biochem Soc Trans*. 2009 Oct; 37(Pt 5): 1133-38. DOI: 10.1042/BST0371133
16. Kocman AE, DAĞ İ, ŞENGELEK T, Sortutar E, CANBEK M. The effect of lithium and lithium-loaded hyaluronic acid hydrogel applications on nerve regeneration and recovery of motor functions in peripheral nerve injury. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*. 2020; 31(3): 889-904. DOI: 10.1007/s12210-020-00919-5
17. Shimizu T, Shibata M, Wakisaka S, Inoue T, Mashimo T, Yoshiya I. Intrathecal lithium reduces neuropathic pain responses in a rat model of peripheral neuropathy. *Pain*. 2000 Mar; 85(1-2): 59-64. DOI: 10.1016/s0304-3959(99)00249-3
18. Shirooie S, Esmaeili J, Sureda A, Esmaeili N, Mirzaee Saffari P, Yousefi-Manesh H, et al. Evaluation of the effects of metformin administration on morphine tolerance in mice. *Neurosci Lett*. 2020 Jan; 716: 134638. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134638
19. Shirooie S, Sahebgharani M, Esmaeili J, Dehpour AR. In vitro evaluation of effects of metformin on morphine and methadone tolerance through mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2019 Mar; 234(3): 3058-66. DOI: 10.1002/jcp.27125
20. Montgomery LS. Pain management with opioids in adults. *J Neurosci Res*. 2022 Jan; 100(1): 10-18. DOI: 10.1002/jnr.24695
21. Colvin LA, Bull F, Hales TG. Perioperative opioid analgesia-when is enough too much? A review of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *Lancet*. 2019 Apr; 393(10180): 1558-68. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30430-1
22. Allouche S, Noble F, Marie N. Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. *Front Pharmacol*. 2014 Dec; 5: 280. DOI: 10.3389/fphar.2014.00280
23. Pan Y, Sun X, Jiang L, Hu L, Kong H, Han Y, et al. Metformin reduces morphine tolerance by inhibiting microglial-mediated neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2016 Nov; 13(1): 294. DOI: 10.1186/s12974-016-0754-9
24. Javadi S, Ejtemaimehr S, Keyvanfar HR, Moghaddas P, Aminian A, Rajabzadeh A, et al. Pioglitazone potentiates development of morphine-dependence in mice: possible role of NO/cGMP pathway. *Brain Res*. 2013 May; 1510: 22-37. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.12.035
25. Toda N, Kishioka S, Hatano Y, Toda H. Modulation of opioid actions by nitric oxide signaling. *Anesthesiology*. 2009 Jan; 110(1): 166-81. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31819146a9
26. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015 Apr; 148: 114-31. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016
27. Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*. 1980 Jun; 107(2): 519-27.
28. Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, et al. Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell*. 2001 Jun; 105(6): 721-32. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00374-9
29. Barr JL, Unterwald EM. Glycogen synthase kinase-3 signaling in cellular and behavioral responses to psychostimulant drugs. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020 Sep; 1867(9): 118746. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118746
30. Nezamoleslami S, Sheibani M, Mumtaz F, Esmaeili J, Shafaroodi H, Dehpour AR. Lithium reverses the effect of opioids on eNOS/nitric oxide pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Biol Rep*. 2020 Sep; 47(9): 6829-40. DOI: 10.1007/s11033-020-05740-9
31. Dobashi T, Tanabe S, Jin H, Mimura N, Yamamoto T, Nishino T, et al. BiP, an endoplasmic reticulum chaperone, modulates the development of morphine antinociceptive tolerance. *J Cell Mol Med*. 2010 Dec; 14(12): 2816-26. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00932.x
32. Maixner DW, Weng HR. The Role of Glycogen Synthase Kinase 3 Beta in Neuroinflammation and Pain. *J Pharm Pharmacol (Los Angel)*. 2013; 1(1): 001. DOI: 10.13188/2327-204X.1000001
33. Masvekar RR, El-Hage N, Hauser KF, Knapp PE. GSK3β-activation is a point of convergence for HIV-1 and opiate-mediated interactive neurotoxicity. *Mol Cell Neurosci*. 2015 Mar; 65: 11-20. DOI: 10.1016/j.mcn.2015.01.001
34. Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug; 93(16): 8455-59. DOI: 10.1073/pnas.93.16.8455
35. Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol*. 1996 Dec; 6(12): 1664-68. DOI: 10.1016/s0960-9822(02)70790-2
36. Chalecka-Franaszek E, Chuang DM. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul; 96(15): 8745-50. DOI: 10.1073/pnas.96.15.8745
37. Harvey B, Carstens M, Taljaard J. Lithium modulation of cortical cyclic nucleotides: evidence for the Yin-Yang hypothesis. *Eur J Pharmacol*. 1990 Jan; 175(2): 129-36. DOI: 10.1016/0014-2999(90)90223-s
38. Ghasemi M, Dehpour AR. The NMDA receptor/nitric oxide pathway: a target for the therapeutic and toxic effects of lithium. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 Jul; 32(7): 420-34. DOI: 10.1016/j.tips.2011.03.006

39. Weinsanto I, Mouheiche J, Laux-Biehlmann A, Aouad M, Maduna T, Petit-Demoulière N, et al. Lithium reverses mechanical allodynia through a mu opioid-dependent mechanism. *Mol Pain*. 2018 Jan-Dec; 14: 1744806917754142. DOI: 10.1177/1744806917754142
40. Belmaker RH, Agam G. The Effect of Lithium on Adenylyl Cyclase: Thirty-Five Years of Research (1975~2010). *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*. 2010; 8(3): 127-32.
41. Nassar A, Azab AN. Effects of lithium on inflammation. *ACS Chem Neurosci*. 2014 Jun; 5(6): 451-58. DOI: 10.1021/cn500038f
42. Alborzi A, Mehr SE, Rezaia F, Badakhshan S, Mombeini T, Shafaroodi H, et al. The effect of lithium chloride on morphine-induced tolerance and dependence in isolated guinea pig ileum. *Eur J Pharmacol*. 2006 Sep; 545(2-3): 123-28. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.06.061
43. Iranpour M, Torkzadeh-Tabrizi S, Khatoon-Asadi Z, Malekpour-Afshar R. Immunohistochemical Assessment of Inflammation and Regeneration in Morphine-Dependent Rat Brain. *Addict Health*. 2018 Jul; 10(3): 156-61. DOI: 10.22122/ahj.v10i3.651
44. Niknam NA, Azarnia M, Bahadoran H, Kazemi M, Tekieh E, Ranjbaran M, et al. Evaluating the effects of oral morphine on embryonic development of cerebellum in wistar rats. *Basic Clin Neurosci*. 2013; 4(2): 130-35.