

## اثر لیتیم کلراید بر تشکیل جسم زرد و رگزایی آن

اسماعیل گودرزی<sup>۱</sup>، دکتر ناصر نژادی<sup>۲</sup>، دکتر عبدالرحیم نیک ضمیر<sup>۳</sup>، دکتر علیرضا احمدزاده<sup>۴،۵</sup>، ثریا فیضی<sup>۶</sup>، زبیده احمدزاده<sup>۶</sup>

۱. گروه تکوین، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات پرتوگیمیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

۵. گروه پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۶. دبیر آموزش و پژوهش، شهرستان دره شهر، استان ایلام، ایران

### چکیده

سابقه و هدف: لیتیم کلراید (LiCl) اگرچه در درمان اختلالات روانی کاربرد دارد، ولی با اثرگذاری بر آنزیمهای مانند GSK3β، بر تخمک گذاری و تشکیل جسم زرد، اثر نامطلوب به جا می‌گذارد. آنزیم GSK3β از آنزیمهای کلیدی در مسیرهای سیگنانالینگ می‌باشد. شواهد نشان می‌دهد که این مسیرهای سیگنانالینگ، نقش مهمی در تخمک گذاری دارد. ثابت شده است که لیتیم بر GSK3β اثر مهاری دارد. لذا هدف این مطالعه، تعیین اثر لیتیم کلراید بر رگزایی و تکوین فولیکول‌های تخدمانی در موش‌های Wistar می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، با تزریق Pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) به موش‌های ماده‌ی ۲۳ روزه، رشد فولیکولی در تخدمان آنها تحریک و پس از ۴۸ ساعت، با تزریق HCG، فاز تخمک گذاری و تشکیل جسم زرد در آنها القا گردید. در این آزمایش، از لیتیم کلراید به صورت همزمان با HCG برای تیمار ۱۵ موش گروه تجربی، استفاده شد. همچنین، به ۱۵ موش گروه کنترل، به جای لیتیم کلراید، سرم فیزیولوژی تزریق شد. سپس در زمان ۴، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق، تخدمان‌ها خارج و برای ۲۴ ساعت، در فیکساتیوها بونن قرار گرفته و جهت بررسی بافت‌شناسی آماده گردیدند. برای آنالیز آماری، از T-test استفاده شد.

یافته‌ها: تفاوت معنی‌داری بین تخمک گذاری در گروهی که لیتیم کلراید دریافت کرده بودند با گروه کنترل وجود نداشت. این در حالی است که تعداد عروق خونی در تخدمان گروهی که لیتیم کلراید دریافت کرده بودند ( $10.5 \pm 5.5$ ) در مقایسه با گروه شاهد ( $37.5 \pm 5.5$ ، کاهش معنی‌داری نشان داد ( $P < 0.05$ )).

نتیجه‌گیری: لیتیم کلراید بر تخمک گذاری تأثیری نداشته ولی باعث ایجاد اختلال در کیفیت جسم زرد شده است.

### وازگان کلیدی: لیتیم کلراید، رگزایی جسم زرد، گلیکوژن سینتزرین-۳- بتا، موش صحرایی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Goodarzi I, Nejadi N, Nikzamir A, Karimi P, Ahmadzadeh A, Feizi S, Ahmadzadeh Z. The effect of LiCl on the corpus luteum formation and angiogenesis. Pejouhandeh 2015;20(3):130-135.

### مقدمه

درصد گزارش شده است که این میزان در ایران، کمی بالاتر از آمارهای جهانی و در حدود ۲۲ درصد می‌باشد (۱). در بین عوامل مؤثر بر نازایی، علاوه بر تأخیر در سن ازدواج، تغییر در سن داشتن فرزند، افزایش استفاده از روش‌های پیشگیری و مصرف داروهایی مانند لیتیم که در درمان بیماری‌های روانی و اختلالات دوقطبی به کار می‌رود نیز در کنار این عوامل، مطرح شده است. با توجه به صرف هزینه‌های فراوانی که درمان نازایی به جامعه تحمیل می‌کند، توجه به عوامل ایجاد کننده‌ی آن و جلوگیری از آنها، از اهمیت بالایی برخوردار است (۲-۴).

در طی سال‌های اخیر در ایران و سایر کشورها، باروری در زوج‌های جوان به میزان چشمگیری کاهش نشان داده است. به طور کلی، شیوع ناباروری در جهان در حدود ۱۰ تا ۲۰

\*نویسنده مسئول مکاتبات: علیرضا احمدزاده؛ تهران، میدان ولی‌عصر، نرسیده به میدان فاطمی، خیابان میرهادی، مجتمع تخصصی شهید بیگ محمدی، پلاک ۹، کد پستی: ۱۴۱۵۸۹۴۱۸۱، تلفن: ۰۲۱ (۸۸۹۰ ۴۵۴۶)، نمبر: ali2@khayam.ut.ac.ir؛ پست الکترونیک: ali2@khayam.ut.ac.ir

پژوهش، اثر لیتیم به عنوان یک مهارکننده‌ی GSK-3 بر تخمک‌گذاری، تشکیل جسم زرد و رگزایی، در موش‌های نابالغ آزمایشگاهی، بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

لیتیم کلراید از شرکت sigma خریداری شد. سایر مواد استفاده شده در این تحقیق، از کمپانی Merck (آلمان) تهیه و استفاده شد. در این آزمایش، از رت‌های ماده‌ی ۲۳ روزه‌ی نرّاز Wistar که به طور متوسط وزن آنها ۵۰ گرم بود، استفاده شد. برای این مطالعه، تعداد ۳۰ موش از حیوان‌خانه‌ی اسستیتو پاستور ایران تهیه گردید. حیوانات در گروه‌های کنترل و گروه دریافت‌کننده‌ی لیتیم (گروه تجربی) به تعداد مساوی (۱۵ موش در هر گروه) به شرح زیر قرار گرفتند (جدول ۱):

جدول ۱. طبقه‌بندی تیمار حیوانات.

گروه‌ها	کنترل	تجربی	PMSC and HCG	سرم فیزیولوژیک	کلرید لیتیم
-	+	+	-	+	-
+	-	+	+	-	+

به منظور رعایت حقوق حیوانات و توجه به اخلاق در بحث پژوهش، مطابق دستورالعمل‌های مصوب کمیته‌ی پژوهش کشور استرالیا، عمل شد (۲۴).

(Pregnant mare's serum gonadotropin) PMSC مقدار ۱۵ IU به منظور تحریک شروع تکوین فولیکولی تزریق Human Chorionic (HCG) گردید. پس از ۴۸ ساعت، (gonadotropin) به مقدار ۱۵ IU برای القای تخمک‌گذاری و کلرید لیتیم به مقدار ۲۵۰ mg/kg بر اساس مطالعات قبلی، به طور همزمان به صورت داخل صفاقی، به رت‌ها تزریق گردید. رت‌های گروه کنترل به جای لیتیم کلراید، سرم فیزیولوژیک دریافت کردند. در ادامه و طبق مطالعه‌ی قبلی در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۲۴ ساعت پس از تزریق، تخدمان‌ها خارج شدند (۲۵). برای این منظور، ابتدا موش‌ها با مقداری اتر بیهوده و پس از باز نمودن شکم حیوان، تخدمان‌ها خارج گردیدند و به دقت از بافت‌های اطراف تمیز شده و در داخل محلول بوئن قرار گرفتند تا برای بررسی‌های بافت شناسی معمولی (با رنگ‌آمیزی E & H) طبق پروتکل موجود، مورد استفاده قرار گیرند (۲۶). برای برش‌گیری، از میکروتوم روتاری استفاده شد و برش‌های سریال با قطر ۷ میکرون تهیه شد. مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده، بهوسیله‌ی میکروسکپ نوری، مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب، نمونه‌هایی که لیتیوم کلراید دریافت کرده بودند (گروه تجربی) با گروه

تخمک‌گذاری، شامل تخریب بخشی از جدار فولیکول بالغ و رهایی اووسیت است. افزایش سطح استروژن، هیپوفیز قدامی را به ترشح LH تحریک می‌کند. چند دقیقه پس از افزایش سطح خونی LH، جریان خون تخدمان افزایش یافته و با تراوش پروتئین‌های پلاسمای مایع میان بافتی، باعث ایجاد ادم می‌شود. در این شرایط، آزاد سازی موضعی پروستاگلاندین‌ها، هیستامین، وازوپرسین و کلازناز نیز رخ می‌دهد (۲۷، ۲۸). با افزایش LH، تخمک‌گذاری و لوئینیزاسیون به صورت همزمان انجام می‌شود. در حقیقت، وقایعی که در تخمک‌گذاری صورت می‌گیرد، در تنظیم و کنترل بیان ژن‌هایی که در لوئینیزاسیون فعل می‌شوند نیز نقش حیاتی دارد (۲۹-۳۰).

تخریب دیواره‌ی فولیکولی، نیازمند آبشارهای پیام‌رسانی داخل سلولی است که کاملاً کنترل شده هستند. یکی از این مولکول‌هایی که سرنوشت سلولی و تمایز و رشد سلولی را تنظیم می‌کند، گلیکوپروتین‌های خانواده‌ی Wnt و رسپتور آنها یعنی Frizzled می‌باشد (۳۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد که ژن‌های مربوط به Wnt و Frizzled و در مراحل مختلف تکوین فولیکولی، تخمک‌گذاری و تشکیل جسم زرد، بیان شده و در کنترل چرخه‌ی تخدمانی، نقش دارند (۳۲-۳۳).

لیتیم بر تکوین موجودات مختلفی اثرگذار است. به عنوان مثال، در دیکتیوسیتلوم که یک موجود یوکاریوتی ساده است، چنانچه در مراحل اولیه‌ی تکوین، در معرض لیتیم قرار گیرد، متابولیسم، ارتباطات عصبی و تکثیر سلولی در آن، تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۳۴-۳۶). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد لیتیم می‌تواند باعث مهار GSK-3 $\alpha$ ، GSK-3 $\beta$  شود. لازم به ذکر است GSK-3 در شرایطی که مسیر Wnt غیرفعال است، به کمک پروتئین‌های دیگر، سبب غیرفعال شدن بتا کاتینین می‌شود. بتاکاتینین به عنوان یک فاکتور رونویسی، بر رونویسی بسیاری از ژن‌ها اثر می‌گذارد (۳۷، ۳۸). همچنین در یک بررسی نشان داده شد است که تیمار رت‌ها با لیتیم، وزن و حجم تخدمان‌ها را کاهش می‌دهد. در این بررسی مشخص گردید که لیتیم این عمل خود را از طریق کاهش FSH و LH مترشحه از هیپوفیز انجام می‌دهد (۳۹، ۴۰). در مطالعات دیگر، نشان داده شد که مسیر سیگنالینگ Wnt می‌تواند بر رگزایی اثر بگذارد. در نتیجه، لیتیم به عنوان مهارکننده‌ی GSK-3 و FSH کننده‌ی مسیر Wnt، می‌تواند بر رگزایی اثر بگذارد (۴۱، ۴۲). همچنین در مطالعات دیگر دیده شد که لیتیم با ایجاد اختلال در تخمک‌گذاری، اثرات نامطلوبی بر تخدمان رت‌های تیمار شده با آن به جای می‌گذارد (۴۳). لذا در این

۲۴ ساعت (E) در گروه کنترل ایجاد کند و تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت.

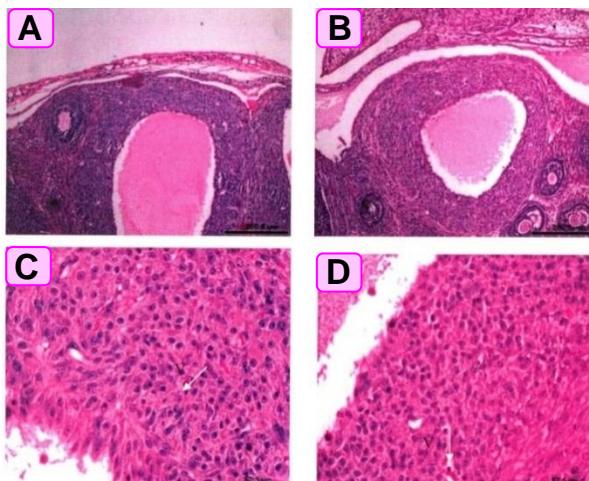
ارزیابی جسم زردهای تشکیل شده. دو نوع جسم زرد مشاهده شد: ۱) جسم زرد کامل (mature) و ۲) جسم زرد ناکامل (immature). البته در زمان‌های شمارش، بالغ بودن یا نبودن ملاک نبود، بلکه در ابتدا، تعداد آنها شمارش شد و سپس در مرحله‌ی بعد، این تفاوت با شمارش دوم کامل گردید. جسم زردهای بالغ دارای قطر  $250 \pm 40$  میکرومتر ( $425 \pm 75$ ) بودند، در حالی که جسم زردهای نابالغ، دارای قطر  $200 \pm 40$  میکرومتر ( $90 \pm 30$ ) بودند.

اگرچه بررسی تعداد جسم زردهای تشکیل شده، تفاوت معنی‌داری را در دو گروه کنترل و تجربی نشان نمی‌دهد، اما ارزیابی تعداد عروق تشکیل شده نشان داد که تعداد عروق تشکیل شده، کاهش معنی‌داری در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل داشته است. بر اساس نتایج موجود (شکل ۲)، در رت‌های گروه تجربی که در زمان‌های ۱۲ ساعت پس از تزریق لیتیم کلراید (B) و ۲۴ ساعت بعد (D)، تخدمان‌های آنها خارج شده میزان عروق خونی در مقایسه با گروه کنترل در همان زمان‌ها (A: ۱۲ ساعت) و (C: ۲۴ ساعت) که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند، کاهش نشان می‌دهد.

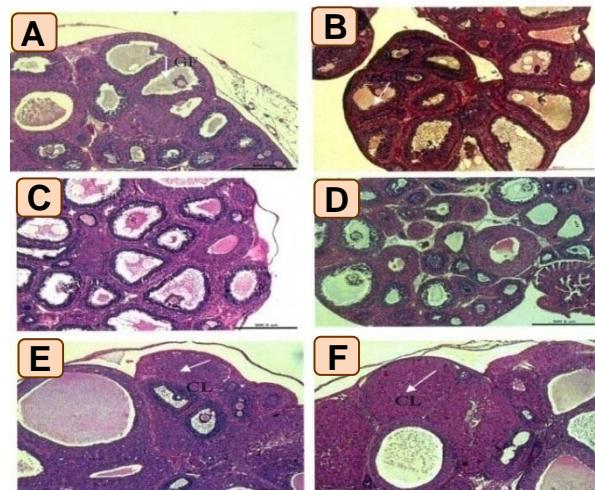
کنترل، مورد مقایسه قرار گرفتند. شمارش تعداد فولیکول‌های گراف و جسم زرد و نیز اندازه‌ی قطر جسم زردها و میزان رگزایی در اجسام زرد، با بزرگنمایی  $X 10$  و  $X 20$  انجام شد. برای اندازه‌گیری قطرها، از گرانیکول چشمی استفاده شد. به منظور شمارش فولیکولی در یک تخدمان، همه‌ی فولیکول‌های گراف که دارای یک آنتروم واحد و اووسیت کامل بودند، برای شمارش انتخاب شدند. دامنه‌ی قطر فولیکول‌های گراف، از  $250 \pm 40$  تا  $1100 \pm 100$  میکرومتر ( $490 \pm 62$ ) بود. به منظور انجام آنالیزهای آماری، از نرم افزار SPSS 17 و T-test استفاده گردید و  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری تعریف شد.

## یافته‌ها

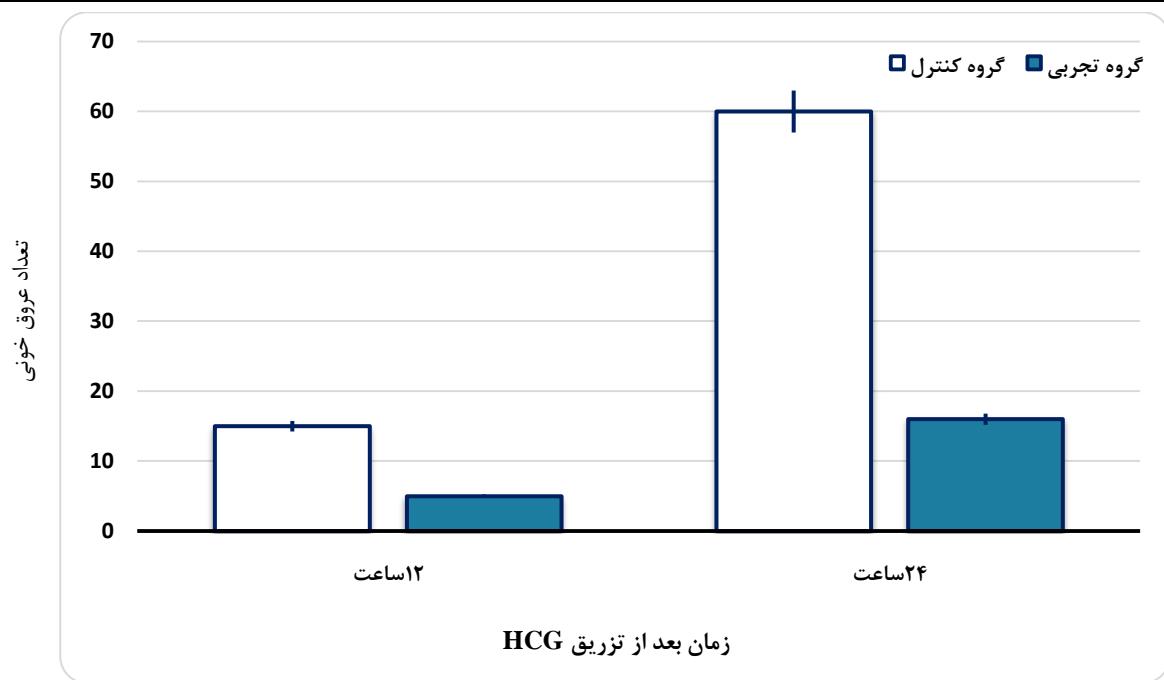
در این مطالعه، تخمک‌گذاری در گروه‌های تجربی و کنترل در حضور و عدم حضور لیتیم کلراید مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، لیتیم کلراید در زمان ۴ ساعت پس از تزریق (B)، ۱۲ ساعت بعد از تزریق (D) و ۲۴ ساعت پس تزریق (F)، نتوانست تغییرات قابل توجهی در تخدمان‌های موش‌های گروه تجربی در مقایسه با زمان‌های ۴ ساعت بعد از تزریق سرم فیزیولوژی (A)، ۱۲ ساعت (C) و



شکل ۲. اثر لیتیم کلراید بر تشکیل عروق خونی در جسم زرد. گروه کنترل (C.A) و گروه تجربی (D.B) در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق برای هر کدام نتایج تفاوت معنی‌داری بین عروق خونی تشکیل شده در گروه کنترل و تجربی دیده می‌شود.



شکل ۱. فتومیکروگراف از تخدمان موش‌های تحریک شده پس از دریافت سرم فیزیولوژیک (E,C,A) یا لیتیم کلراید (F,D,B) در ساعت‌های ۴، ۱۲ و ۲۴ پس از خروج تخدمان. جسم زرد (CL) و فولیکول گراف (GF) قابل مشاهده است.



شکل ۳. اثر لیتیم کلراید بر تعداد عروق خونی تشکیل شده با گندادوتروپین پس از تیمار با سدیم کلراید (کنترل) یا لیتیم کلراید (تجربی)، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق هورمون کوریونیک گندادوتروپین انسانی (HCG).

زردهای تشکیل شده در ساعت مذکور بین گروه‌های شاهد و گروهی که لیتیم کلراید دریافت کرده بودند (گروه تجربی) وجود نداشت. بنابراین، دوز استفاده شده‌ی لیتیم در مورد موش‌های مورد آزمایش ما در تخمک‌گذاری تأثیر معنی‌داری ایجاد نکرد. پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که لیتیم با کاهش میزان استرادیول، باعث کاهش رشد و تکثیر سلول‌های گرانولوزا می‌شود. در بررسی‌های دیگر، گزارش شده است که تیمار موش‌های صحرایی با لیتیم، وزن و حجم تخدمان‌ها را کاهش می‌دهد. لیتیم باعث کاهش فولیکول‌های سالم و افزایش فولیکول‌های آتریک (Atresia) می‌شود. لیتیم این عمل خود را به واسطه‌ی کاهش گندادوتروپین‌ها (FSHLH) انجام می‌دهد (۳۰). همچنین دیده شده است که لیتیم کلراید با ایجاد اختلال در عملکرد و تشکیل corpus luteum، اثرات نامطلوبی از خود بر تخدمان‌رهای تیمار شده با آن به جا می‌گذارد (۲۳) که در مطالعه‌ی ما این اثرات با دوز استفاده شده برای لیتیم کلراید، دیده نشد.

با توجه به اینکه لیتیم تأثیر معنی‌داری در تخمک‌گذاری ایجاد نکرده بود، لذا در ادامه بر آن شدیم تا اثر آن بر رگزایی را بررسی کنیم. بدین منظور ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق HCG، تعداد عروق خونی تشکیل شده، مورد شمارش قرار گرفت. مشاهدات ما نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در تعداد عروق خونی تشکیل شده در جسم زردهای تشکیل شده بین گروهی که لیتیم کلراید دریافت کرده بودند (گروه

## بحث

در این پژوهش اثر لیتیم به عنوان یک مهارکننده GSK-3 بر تخمک‌گذاری، تشکیل جسم زرد و رگزایی در موش‌های نابالغ آزمایشگاهی بررسی شد. به طور کلی، تفاوت معنی‌داری بین تخمک‌گذاری در گروهی که لیتیوم کلراید دریافت کرده بودند با گروه کنترل وجود نداشت، ولی تعداد عروق خونی در تخدمان گروهی که لیتیوم کلراید دریافت کرده بودند، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد.

در بررسی‌های مختلفی، بر نقش مسیر سیگنال‌دهی Wnt در تکامل، تمایز و تعیین سرنوشت فولیکول‌ها و تخمک‌گذاری اشاره شده است. در واقع می‌توان گفت که گندادوتروپین‌ها از طریق مسیرهایی مانند Wnt وارد عمل می‌شوند (۲۸، ۲۷). بنابراین در این آزمایش از لیتیم به عنوان یک مهارکننده‌ی اختصاصی آنزیم GSK-3 $\beta$  و فعال‌کننده‌ی مسیر سیگنال‌دهی Wnt استفاده شد تا اثر آن بر تخمک‌گذاری و تشکیل جسم زرد، مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به نقش مسیر Wnt در تخمک‌گذاری، انتظار می‌رفت که لیتیم با فعال‌سازی نایجای مسیر Wnt سبب اختلال در تخمک‌گذاری شود.

گزارشات نشان می‌دهند که ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق HCG، تخمک‌گذاری و تشکیل جسم زرد شروع می‌شود (۲۹، ۵). لذا اثر لیتیم بر تخمک‌گذاری در زمان‌های ۱۲، ۴ و ۲۴ ساعت پس از تزریق HCG و لیتیم کلراید انجام شد (۲۵). نتایج نشان داد تفاوت قابل توجهی در تعداد جسم

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، لیتیم کلراید تفاوت معنی‌داری در تخمک‌گذاری در گروه تجربی به مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد، اما میزان عروق خونی در همین گروه نسبت به کنترل، کاهش چشمگیر نشان داد. از آنجا که این مطالعه به صورت یک مطالعه‌ی بافت‌شناسی با میکروسکوپ نوری بوده است، پیشنهاد می‌شود که در آینده با بررسی فاکتورهای رگزایی مانند آنزیبوبیتین و فاکتورهای رشد عروقی به وسیله‌ی تکنیک‌های مولکولی مانند PCR و روش‌های ایمونوهیستوشیمی، بتوان تفسیر بهتری از اثر لیتیم در تخدمان موش‌های تیمار شده با لیتیم داشت. از مهم‌ترین محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به کم بودن تعداد نمونه‌های موشی اشاره کرد. همچنین، مشاهده‌ی کاهش تعداد عروق خونی در نمونه‌ی تیمار شده با لیتیم کلراید از نکات جالب توجه این مطالعه بود. در پایان متدکر می‌شوم که اگرچه در این مطالعه برای دوز استفاده شده‌ی لیتیم کلراید، تأثیری بر تشکیل جسم زرد و تخمک‌گذاری دیده نشد، ولی این بررسی را می‌توان با دوزهای دیگر این دارو نیز انجام داد.

تجربی) و شاهد وجود دارد به این ترتیب که میزان عروق خونی در گروه تجربی به شدت کاهش یافته است. بنابراین، گرچه لیتیم در تخمک‌گذاری تأثیر معنی‌داری نداشته، اما در روند تشکیل عروق خونی در جسم زرد اختلال ایجاد کرده است. از آنجایی که در روند تشکیل عروق، فاکتورهایی چون AnY2 و MMP، VEGF می‌کنند، لذا به نظر می‌رسد که لیتیم می‌تواند با ایجاد اختلال در بیان این فاکتورها نقش خود را انجام داده باشد که بررسی‌های مولکولی در این زمینه می‌تواند مفید باشد.

اختلال در تشکیل عروق خونی به وسیله‌ی لیتیم قبل‌از نیز توسط دیگران گزارش شده است، به طوری که دیده شده در محیط *in vitro* تیمار جنین‌های موش با لیتیم، منفذهایی در دیواره‌ی عروق خونی به وجود می‌آورد. همچنین مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که لیتیم در زمان حاملگی از جفت عور کرده و رگزایی را در جنین انسان مختل کرده و باعث نقايسی ژنتیکی می‌شود (۳۲-۳۴).

## REFERENCES

1. Direkvand-Moghadam A, Sayehmiri K, Delpisheh A, Direkvand-Moghadam A. The global trend of infertility: an original review and meta-analysis. *Int J Epidemiol Res* 2014; 1(1): 35-43.
2. Bschor T, Uhr M, Baethge C, Lewitzka U, Ising M, Erbe S, et al. Acute antidepressive efficacy of lithium monotherapy, not citalopram, depends on recurrent course of depression. *J Clin Psychopharmacol* 2013; 33(1): 38-44.
3. Speroff LE, Glass RH, Kase NG. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 6<sup>th</sup> ed. Baltimore Maryland: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p. 1015-37.
4. Strunecka A, Patocka J, Sarek M. How does lithium mediate its therapeutic effects? *Appl Biomed* 2005; 3: 25-35.
5. Guyton AC, Hall JE. Text book of medical physiology. 10<sup>th</sup> ed. 2006.
6. Jonquiera LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic histology. 9<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2005.
7. Jin SLC, Richard FJ, Kuo WP, D'Ercole AJ, Conti M. Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(21): 11998-2003.
8. Richards JS. Perspective: The ovarian follicle - A perspective in 2001. *Endocrinology* 2001; 142(6): 2184-93.
9. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000; 80(1): 1-29.
10. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999; 397(6718): 405-9.
11. Hsieh M, Johnson MA, Greenberg NM, Richards JS. Regulated expression of Wnts and frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology* 2002; 143(3): 898-908.
12. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 195-220.
13. Wang HY, Malbon CC. Wnt-frizzled signaling to G-protein-coupled effectors. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(1): 69-75.
14. Gurvich N, Klein PS. Lithium and valproic acid: parallels and contrasts in diverse signaling contexts. *Pharmacol Ther* 2002; 96(1): 45-66.
15. Richards JS. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 2001; 15(2): 209-18.
16. Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(16): 8455-9.

17. Yost C, Farr GH, Pierce SB, Ferkey DM, Chen MM, Kimelman D. GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in *Xenopus* development and oncogenesis. *Cell* 1998; 93(6): 1031-41.
18. Sirois J, Richards JS. Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Evidence for the role of a cis-acting C/EBP beta promoter element. *J Biol Chem* 1993; 268(29): 21931-8.
19. Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal* 2006; 18(9): 1351-9.
20. Phiel CJ, Klein PS. Molecular targets of lithium action. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 789-813.
21. Ohlmann A, Tamm ER. Norrin: molecular and functional properties of an angiogenic and neuroprotective growth factor. *Prog Retin Eye Res* 2012; 31(3): 243-57.
22. Ye X, Wang Y, Nathans J. The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends Mol Med* 2010; 16(9): 417-25.
23. khodadadi M, Ansari Pirsaraei Z. Disrupting effects of lithium chloride in the rat ovary: Involves impaired formation and function of corpus luteum. *Middle East Fertil Soc J* 2013; 18(1): 18-23.
24. National Health and Medical Research Council. Canberra: Australian Government. Australian code of practice for the care and use of animals for scientific purposes; 2004. p. 21-32.
25. Niikura Y, Niikura T, Tilly JL. Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Aging (Albany NY)* 2009; 1(12): 971-8.
26. Comanescu M, Annaratone L, D'Armento G, Cardos G, Sapino A, Bussolati G. Critical steps in tissue processing in histopathology. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2012; 6(1): 22-32.
27. Miller JR. The wnts. *Genome Biol* 2002; 3(1): 1-15.
28. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 2006; 25(57): 7461-8.
29. McGee EA, Hsueh AJW. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21(2): 200-14.
30. Jana D, Nandi D, Maiti RK, Ghosh D. Effect of human chorionic gonadotrophin coadministration on the activities of ovarian Delta(5)-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and ovarian and uterine histology in lithium chloride-treated albino rats. *Reprod Toxicol* 2001; 15(2): 215-9.
31. Khodadadi M, Basavaiah S, Abediankenari S. Effect of lithium chloride on the luteal steroidogenesis in gonadotropin-stimulated rat. *Iran J Reprod Med* 2012; 10(3): 223-8.
32. Giles JJ, Bannigan JB. The effects of lithium on neurulation stage mouse embryos. *Arch Toxicol* 1997; 71(8): 519-28.
33. Liebner S, Plate KH. Differentiation of the brain vasculature: the answer came blowing by the Wnt. *J Angiogenes Res* 2010; 2: 1.
34. Horton S, Tuerk A, Cook D, Cook J, Dhurjati P. Maximum recommended dosage of lithium for pregnant women based on a PBPK model for lithium absorption. *Adv Bioinformatics* 2012; 2012: 352729.