

تأثیر شیر شتر بر درد، اضطراب و حافظه فضایی زاده‌های نر موش صحرایی ماده

مدل اوتیسمی القاء شده توسط والپروئیک اسید

سحر حیدری^۱، علی محمودی^۲، علی طلایی^۳، سید جمال میرموسوی^۴، محمد محمد زاده^{۵*}

۱. کارشناس ارشد فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، ایران

۲. دانشجوی دکتری تخصصی زیست فناوری پزشکی، گروه بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

۳. استاد گروه روانپزشکی، مرکز تحقیقات روانپزشکی و علوم رفتاری، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴. استادیار مرکز تحقیقات سالمندی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

۵. استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: اوتیسم بیماری اختلال طیفی است که مبتلایان آن از اضطراب، نقص در حافظه و درد، رنج می‌برند. شیر شتر دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، تعدیل‌کننده سیستم ایمنی و ضدالتهاب است. هدف مطالعه حاضر تعیین تأثیر شیر شتر بر درد، اضطراب و حافظه فضایی زاده‌های نر موش‌های صحرایی ماده مدل اوتیسمی القاء شده توسط والپروئیک اسید است.

روش‌ها: در یک مطالعه تجربی، به موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار، والپروئیک اسید با دوز ۵۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم در روز ۱۲/۵ حاملگی، به صورت داخل صفاقی تزریق شد. نوزادان نر حاصله به پنج گروه شش‌تایی دست‌نخورده، ریسپریدون، شیر خام شتر+ ریسپریدون، شیر پاستوریزه شتر+ ریسپریدون و والپروئیک اسید تقسیم شدند. در مرحله درمان ریسپریدون با دوز (۰/۲ میلی‌گرم/کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی به زاده‌های نر موش‌های صحرایی ماده تزریق شد و شیر شتر (۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم) روزانه به مدت ۴۲ روز (از روز ۳۵ پس از تولد) توسط سوزن گاواژ به آن‌ها خورانده شد. پاسخ به درد، اضطراب و یادگیری فضایی بعد از اتمام دوره درمان در روزهای ۸۴-۷۷ مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و دوطرفه و آزمون مقایسات چندگانه Tukey تحلیل شدند.

نتایج: پاسخ به درد، اضطراب و یادگیری فضایی در همه گروه‌های درمانی در مقایسه با گروه دست‌نخورده پس از درمان ۴۲ روزه شیر شتر به ترتیب $p < 0/05$ ، $p < 0/01$ ، $p < 0/001$ و متفاوت بود. هم‌چنین بین شیر خام شتر+ ریسپریدون و گروه ریسپریدون در آزمون پاسخ به درد و نیز زمان یافتن سکو در آزمون حافظه فضایی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به اثربخشی شیر شتر در بهبود علائم اوتیسم مانند اضطراب، نقص در حافظه و یادگیری احتمالاً می‌توان شیر شتر را به عنوان یک مکمل غذایی مناسب برای بیماران اوتیسمی توصیه نمود.

کلید واژه‌ها:

اوتیسم، اضطراب، حافظه و یادگیری، شیر شتر، والپروئیک اسید، موش صحرایی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

مطالعات بالینی موجود به صورت گزارش مورد انجام شده است (۱۴)، لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر رژیم حاوی شیر شتر به همراه داروی ریسپریدون بر بهبود علائم رفتاری مانند اضطراب، پاسخ به درد و یادگیری فضایی در زاده‌های نر موش صحرائی ماده مدل اوتیسمی القاء شده توسط والپروئیک اسید انجام شد.

روش‌ها

مطالعه حاضر به روش تجربی در سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه مرکزی دانشکده پزشکی مشهد انجام گردید. موش‌های نر و ماده صحرائی نژاد ویستار (وزن 20 ± 250 گرم) مورد استفاده در این تحقیق از مرکز آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی مشهد به دست آمده‌اند. موش‌ها در یک قفس پلاستیکی آکرلیک در دمای اتاق 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 55 ± 5 ٪ و ۱۲ ساعت چرخه نور / تاریکی قرار گرفتند. حیوانات در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد و کافی داشتند.

پنج موش ماده و یک موش نر در هر قفس قرار داده شدند و آزمایش اسمیر واژن برای تشخیص پلاک‌های بارداری دو بار در روز (۸:۳۰ بعد از ظهر و ۸:۳۰ صبح) انجام شد. پس از تشخیص، موش‌های باردار به قفس‌های جداگانه منتقل شدند و این روز اولین روز بارداری (gestational day 1; GD 1) در نظر گرفته شد.

موش‌های باردار به‌طور تصادفی به دو گروه پنج و دو تایی تقسیم شدند. ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم والپروئیک اسید تهیه شده (از سبحان دارو) به پنج موش ماده باردار (که زاده‌های نر آنها چهار گروه دریافت‌کننده والپروئیک اسید را تشکیل دادند) و به دو موش ماده باردار (که زاده‌های نر آنها به‌عنوان گروه دست‌خورده در نظر گرفته شدند) آب تقطیر شده در روز ۱۲/۵ حاملگی به‌صورت داخل صفاقی (Intraperitoneal; I.P) تزریق شد (۱۵، ۱۶). (منظور از روز ۱۲/۵ حاملگی یعنی اگر اسپرماتوزوئیدها در صبح پیدا شد، به عنوان اولین روز

اوتیسم یکی از شایع‌ترین موارد اختلالات عصبی-تکاملی در حال گسترش در جهان است (۱) در بیشتر موارد، افراد مبتلا به اوتیسم از اختلالات عاطفی نظیر اضطراب و افسردگی (۲) و نیز ناهنجاری حسی رنج می‌برند (۳، ۴). معمولاً علائم این بیماری در اوایل کودکی ظاهر می‌شوند و نقص ایجاد شده مادام‌العمر و بدون درمان اختصاصی است (۵).

مدل‌های حیوانی اوتیسم همچنین اختلالات رفتاری اوتیسم در انسان را به خوبی نشان می‌دهند (۶). استفاده از داروهای ضد صرع در دوران بارداری خطر ابتلاء به اوتیسم را در کودکان افزایش می‌دهد (۷). مادران بارداری که در سه ماهه اول بارداری از والپروئیک اسید استفاده نمایند خطر بروز تولد کودکان اوتیسمی در آنان افزایش می‌یابد (۸). همچنین در میان مدل‌های توسعه یافته برای اوتیسم، مدل حیوانی اسید والپروئیک (Valproic Acid (VPA)) نزدیک‌ترین علائم به بیماری اوتیسم در انسان را دارد (۶). قرار گرفتن در معرض اسید والپروئیک در روز ۱۲ تا ۱۳ حاملگی که یک دوره زمانی حساس برای تکامل اعصاب حسی و حرکتی جنین است باعث ایجاد نقص در لوله عصبی می‌شود که فرزندان آن‌ها رفتارها و مشخصات بیماران اوتیسم را از خود بروز می‌دهند (۹). با توجه به این‌که دارویی قطعی برای درمان اوتیسم وجود ندارد با این‌حال داروی ضد روان‌پریشی ریسپریدون توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده دارای مجوز و تأیید شده است (۱۰).

شیر شتر به دلیل دارا بودن تنوع زیاد خواص درمانی و مکانیسم‌های پیش‌گیری از بیماری‌ها مورد استقبال جمعیت‌های مختلف است (۱۱). شیر شتر دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، تعدیل‌کننده سیستم ایمنی، ضدالتهابی، شبه‌انسولینی و ضد آپوپتوزی است (۱۲). از شیر شتر به‌طور سنتی در مطالعات بالینی و مشاهده‌ای در برخی از مناطق جهان در درمان اوتیسم استفاده می‌شود (۱۳).

در بررسی متون، هیچ مطالعه پیش بالینی در رابطه با تأثیر شیر شتر روی مدل‌های حیوانی اوتیسمی گزارش نشده است و

درمان به مدت ۴۲ روز (روز ۳۵ تا ۷۷ ام) بعد از تولد انجام شد. آزمایش‌های رفتاری به مدت پنج روز قبل از دوره درمان، در روز ۳۰ ام و نیز در آخرین روز درمان، روز ۷۷ ام انجام شد (۱۸) (شکل ۱).

برای ارزیابی اضطراب از روش Elevated plus-maze استفاده شد. رفتارهای مرتبط با اضطراب با استفاده از دستگاه ماز صلیبی مرتفع (Mazerouter, Germany) ارزیابی شد. این دستگاه از یک جفت بازوی مخالف (۵۰×۱۰ سانتی‌متر) و نیز یک جفت بازوی مخالف محصور شده با دیوارهای ۴۰ سانتی‌متری تشکیل شده است. دستگاه ۵۰ سانتی‌متر بالاتر از کف زمین قرار دارد. محقق تقریباً باید دو متر از دستگاه فاصله داشته باشد و موش‌های صحرایی را مشاهده کند.

در این آزمون موش صحرایی در مرکز دستگاه روبه‌روی یکی از بازوهای باز قرار گرفت و تمام حرکات حیوان و مسیرهای پیموده شده برای پنج دقیقه توسط دوربین فیلم‌برداری (Huawei Y9 2019, China) ثبت شد. اقدامات مربوط به رفتارهای اضطرابی شامل کل زمان صرف شده و تعداد ورود در بازوهای باز و بسته تعریف شد. بدین گونه که زمان یا ورود بیشتر در بازوهای باز نشان‌گر اضطراب کمتر است. این آزمون برای ارزیابی و مقایسه اضطراب قبل و بعد از درمان در موش‌های صحرایی اوتیسمی صورت گرفت (۱۹).

از آزمون Hot plate برای ارزیابی پاسخ به درد (حساسیت گیرنده دما) استفاده شد. دستگاه شامل یک صفحه فلزی (۲۴/۵×۲۴/۵ سانتی‌متر) است که می‌تواند به‌صورت دمای ثابت گرم شود که بر روی آن یک استوانه پلاستیکی (۲۰×۱۸ سانتی‌متر) قرار داده شده است.

موش‌ها به اتاق آزمایش آورده شدند و اجازه داده شد ۱۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش با شرایط جدید خو بگیرند. تأخیر در پاسخ به محرک حرارتی (۱/۰± ۵۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت زمان ۶۰ ثانیه، از حین قرارگیری در داخل استوانه تا زمان پاس کشیدن یا پرش محاسبه شد. حیواناتی که بعد از ۶۰ ثانیه واکنشی نشان ندادند. برای جلوگیری از آسیب دیدن از صفحه

بارداری تعیین می‌گردد. با توجه به مقالات بهترین زمان برای تزریق جهت ایجاد مدل اوتیسمی روز ۱۲/۵ است.

پس از مشاهده پلاک بارداری در ساعت ۸ صبح روز اول تزریق والپروئیک اسید در ساعت ۲۰ روز ۱۲ ام صورت گرفت. والپروئیک اسید در محلول سالین ۰/۹٪ حل شد و حجم تزریق ۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم بود. همه موش‌ها تا زمان از شیر گرفتن تا روز ۳۰ پس از تولد (Postnatal Day; PND 30) نگهداری شدند. سپس ۳۰ موش از شیر گرفته شده و برای آزمایش‌های پس از زایمان گروه‌بندی شدند که شامل: گروه دست نخورده (Naïve): موش‌هایی که والپروئیک اسید دریافت نکرده‌اند (n=۶)، گروه والپروئیک اسید (Control): موش‌هایی که والپروئیک اسید دریافت کردند ولی درمانی دریافت نکردند (n=۶)، گروه ریسپریدون: موش‌هایی که پس از دریافت والپروئیک اسید، داروی ریسپریدون دریافت کردند (n=۶)، گروه شیر خام شتر + ریسپریدون: موش‌هایی که پس از دریافت والپروئیک اسید، شیر خام شتر به همراه داروی ریسپریدون دریافت کردند (n=۶) و گروه شیر شتر پاستوریزه + ریسپریدون: موش‌هایی که پس از دریافت والپروئیک اسید، شیر شتر پاستوریزه به همراه داروی ریسپریدون دریافت کردند (n=۶)، بودند (شکل ۱).

با توجه به مطالعات گذشته که موش نر در معرض والپروئیک اسید علائم اوتیسمیک بیشتری نشان می‌دهند تنها موش‌های نر در گروه‌ها لحاظ شد (۱۷).

در دوره درمان از رژیم شیر خام و پاستوریزه شتر + ریسپریدون (شرکت سبحان دارو) برای ارزیابی بهبود سطح حافظه، اضطراب و درد زاده‌های نر اوتیسمی مورد سنجش به ترتیب توسط آزمون‌های Morris water maze، Elevated plus maze و نیز Hot plate استفاده شد. ریسپریدون در محلول سالین (محلول ۰/۹٪ نمک سدیم کلراید) حل شد. ریسپریدون به‌صورت داخل صفاقی (I.P) با دوز ۰/۲ میلی‌گرم/کیلوگرم هر روز بر اساس مطالعات گذشته تزریق شد (۱۸). شیر خام و پاستوریزه شتر روزانه (۱۰ میلی‌لیتر در هر ۱۰۰۰ گرم وزن بدن) از طریق سوزن گاوژ به موش‌ها خوراندند شد.

موش‌های صحرائی برای چهار دوره ۶۰ ثانیه‌ای از چهار ربع مختلف به داخل استخر رها شدند و میزان تمایل موش برای بودن و صرف وقت برای پیدا کردن سکو در ربعی که قبلاً سکو در آن بوده است (ربع هدف) ارزیابی شد.

این روز به‌عنوان روز پروپ در نظر گرفته شد. رفتارها توسط دوربین فیلم‌برداری نصب شده بالای مرکز استخر ضبط شدند. دوربین به یک رایانه متصل بود و رفتارها به کمک یک سیستم ردیابی به‌صورت عینی مورد تحلیل قرار گرفت.

در این آزمون شاخص‌های طول مسافت، مدت‌زمان تأخیری در یافتن سکو و سرعت شنا کردن توسط نرم‌افزار ANY-maze (video tracking ۷5.1 مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰).

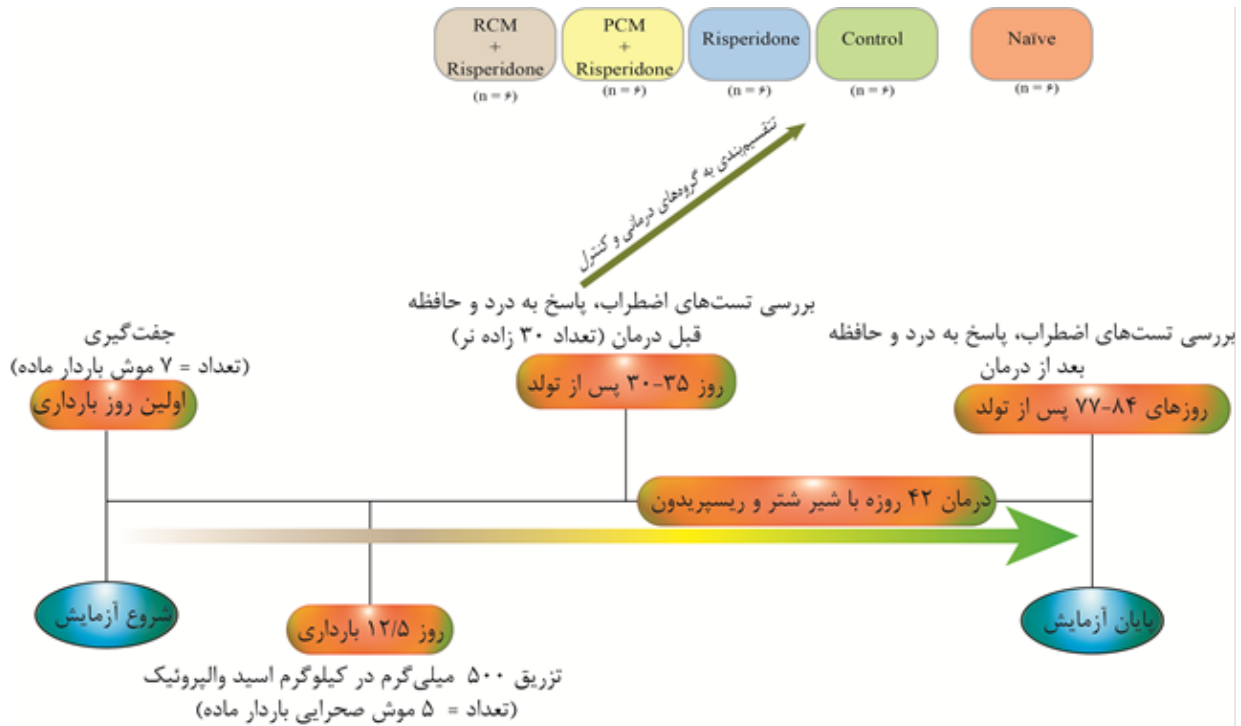
جهت تجزیه و تحلیل داده‌های پژوهش از نرم‌افزارهای Microsoft office excel نسخه ۹ و Graphpad Prism نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد. در همه نمودارها، داده‌ها به صورت "انحراف استاندارد میانگین \pm میانگین" گزارش شده‌اند.

قبل از تجزیه و تحلیل داده‌ها، آزمون طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون ناپارامتریک Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت. به منظور توصیف داده‌ها، رسم نمودارها و نیز جهت مقایسه اثر شیر شتر و داروی ریسپریدون بین گروه‌ها و نیز قبل و بعد از درمان گروه‌ها برای اضطراب (زمان صرف شده در بازوی باز، زمان صرف شده در بازوی بسته، تعداد ورود به بازوهای باز، تعداد ورود به بازوی بسته) و پاسخ به درد از آنالیز واریانس دوطرفه، برای آنالیز حافظه فضایی از آنالیز واریانس یک‌طرفه و نیز برای بررسی یادگیری فضایی از آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری‌های مکرر و برای بررسی مقایسه میانگین داده‌های پژوهش از آزمون مقایسات چندگانه Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها نیز ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدا شدند (۱۹). این آزمون در سه مرحله و هر مرحله ۶۰ ثانیه در عرض یک ساعت انجام گرفت. از این آزمون برای ارزیابی میزان حساسیت گیرنده‌های دما و درد موش‌های صحرائی اوتیسمی و ارزیابی تأثیر شیر شتر و ریسپریدون بر این موارد انجام شد (۱۹).

از آزمون Morris water maze برای ارزیابی و مقایسه میزان یادگیری و حافظه کوتاه مدت موش‌های صحرائی اوتیسمی قبل و بعد از درمان با شیر شتر و ریسپریدون استفاده شد. دستگاه ماز آبی (شرکت فنی مهندسی کیمیا کهربای مبین، ایران) حوضچه‌ای است استوانه‌ای شکل به قطر دو متر و عمق ۴۵ سانتی‌متر پر از آب با دمای 25 ± 0.1 درجه سانتی‌گراد که دارای چهار ربع مساوی با نام‌گذاری شمال شرقی (Q1، NE)، شمال غربی (Q2، NW)، جنوب شرقی (Q3، SE) و جنوب غربی (Q4، SW) است. یک سکو با قطر ۱۱ سانتی‌متر به‌اندازه یک سانتی‌متر در زیر سطح آب در ربع اول (Q1) استخر تعبیه شده است. استخر و پلتفرم هر دو از پلاستیک سیاه و سفید ساخته شده‌اند (۲۰).

یادگیری فضایی و حافظه موش صحرائی برای پیدا کردن سکو به مدت ۴ روز متوالی ارزیابی شد و در هرروز از هر موش صحرائی اوتیسمی ۴ مرحله آزمون گرفته شد. بدین صورت که هر موش صحرائی از هر چهار ربع حوضچه برای ارزیابی حافظه و یادگیری در مدت زمان معین ۶۰ ثانیه به داخل حوضچه رها شد که میزان و زمان مسافت طی شده به‌همراه سرعت حرکت موش به‌وسیله سیستم ردیابی مورد ارزیابی قرار گرفت. اگر موش صحرائی در مدت زمان ۶۰ ثانیه سکو را پیدا نمی‌کرد، به سمت آن هدایت می‌شد. هر موش قبل از خارج شدن به مدت ۱۵ ثانیه برای تثبیت یادگیری فضایی و موقعیت فضایی‌اش بر روی سکو می‌ماند و دوباره از ربع بعدی به داخل حوضچه رها می‌شد. در روز ۵، یک آزمایش کاوشگر انجام گرفت بدین معنی که سکو از داخل استخر برداشته شد. سپس



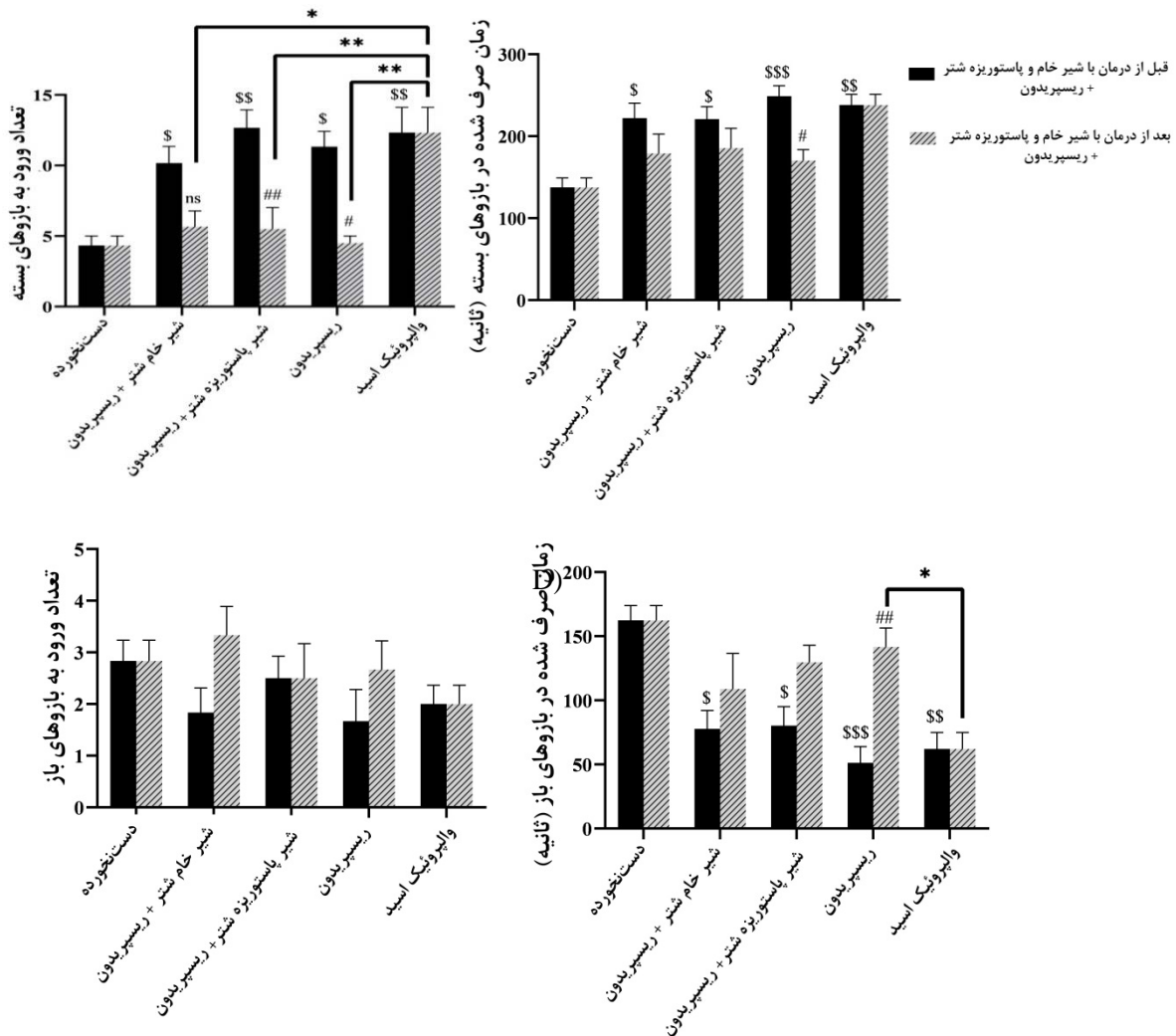
شکل ۱- نمای کلی از مطالعه صورت گرفته. گروه‌های مطالعه شامل: دست نخورده (Naïve)، شیر خام شتر (RCM camel milk؛

RCM)، شیر پاستوریزه شتر (Pasteurized camel milk؛ PCM)، ریسپریدون (Risperidone)، والپروئیک اسید (Control)

نتایج

معنی‌داری تعداد ورود آن‌ها به بازوی بسته ($p < 0.01$ ، $p < 0.05$) کاهش یافت. در گروه ریسپریدون نیز زمان کمتری در بازوی بسته نسبت به قبل درمان ($p < 0.05$) سپری کردند. نتایج درمان با شیر خام شتر با وجود کاهش زمان و تعداد ورود به بازوی بسته نسبت به قبل درمان از نظر آماری معنی‌دار نشد در حالی‌که در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.05$) معنی‌دار شد (نمودار ۱، A و B). با این حال مقایسه میانگین در تعداد ورود به بازوی باز بین گروه‌ها و قبل و بعد درمان معنی‌دار نشد، ولی زمان ماندن در بازوی باز در گروه‌های دریافت‌کننده والپروئیک اسید نسبت به گروه Naïve کمتر بود و اختلاف معنی‌دار (شیر خام شتر + ریسپریدون: $p < 0.05$)، (شیر پاستوریزه شتر + ریسپریدون: $p < 0.05$)، (ریسپریدون: $p < 0.001$) وجود داشت (نمودار ۱، C و D). پس از دوره درمانی با توجه به افزایش زمان صرف شده در بازوی باز در تمام گروه‌های درمانی نسبت به گروه قبل درمان ولی تنها گروه ریسپریدون اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) ثبت کرد.

در گزارش نتایج برای تمام آزمون‌های انجام شده، داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند. در آنالیز واریانس دوطرفه، نتایج آزمون اضطراب نشان داد موش‌های Naïve معمولاً زمان بیشتری را در بازوهای باز نسبت به بازوی بسته که یک رفتار طبیعی است گذراندند. زاده‌های موش‌هایی که والپروئیک اسید دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه Naïve در قبل از درمان تعداد ورود بیشتری به بازوهای بسته داشتند (شیر خام شتر + ریسپریدون: $p < 0.05$)، (شیر پاستوریزه شتر + ریسپریدون: $p < 0.01$)، (ریسپریدون: $p < 0.05$) و همچنین زمان بیشتری را در این بازوها گذراندند (شیر خام شتر + ریسپریدون: $p < 0.05$)، (شیر پاستوریزه شتر + ریسپریدون: $p < 0.05$)، (ریسپریدون: $p < 0.001$) که این نشان‌دهنده رفتار اوتیسمی است (نمودار ۱، A و B). این نتایج نشان دهنده اضطراب در موش‌های صحرائی مدل اوتیسمی والپروئیک اسید است. موش‌های تحت درمان با شیر پاستوریزه شتر + ریسپریدون و گروه ریسپریدون نسبت به قبل درمان به‌طور



نمودار ۱- اثر شیر خام و پاستوریزه شتر به همراه داروی ریسپیریدون بر آزمون اضطراب در موش‌های صحرائی القاء شده با والپروئیک اسید

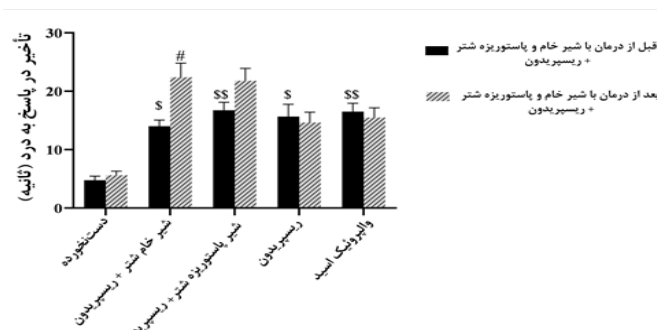
(A) تعداد ورود به بازوی بسته، (B) زمان ماندن در بازوی بسته، (C) تعداد ورود به بازوی باز، (D) زمان ماندن در بازوی باز. نمودارها به صورت "انحراف استاندارد میانگین ± میانگین" رسم شده‌اند و تعداد موش‌ها در هر گروه (n=6) بود. برای مقایسه بین گروه‌ها، قبل و بعد از درمان و نیز Naïve قبل از درمان با سایر گروه‌ها از آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شده است. اختلاف معنی‌داری برای مقایسه قبل و بعد از درمان (# نشان دهنده $P < 0.05$), (## نشان دهنده $P < 0.01$), برای مقایسه بین گروه‌ها بعد درمان (* نشان دهنده $p < 0.05$), (** نشان دهنده $p < 0.01$), برای مقایسه Naïve قبل از درمان با سایر گروه‌ها (\$ نشان دهنده $p < 0.05$), (\$\$ نشان دهنده $p < 0.01$) و (\$\$\$ نشان دهنده $p < 0.001$) نشان داده شد. non-significant=ns نشان دهنده عدم معنی‌داری است. اختصارات گروه‌ها شامل: دست‌نخورده (Naïve)، شیر خام شتر (RCM)، شیر پاستوریزه شتر (PCM)، ریسپیریدون (Ris)، والپروئیک اسید (Control)، شیر شتر (CM)

در مورد زمان تأخیر در آزمون پاسخ به درد، آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد گروه Naïve در مقایسه با تمام موش‌های متولد شده که در دوره جنینی والپروئیک اسید دریافت کردند

کاهش نشان داد. فرزندان موش‌های صحرائی که شیر شتر همراه ریسپیریدون دریافت کردند؛ در تأخیر پاسخ به درد در مقایسه با قبل از درمان افزایش نشان

دادند که تنها نتایج گروه شیر خام شتر به صورت اختلاف معنادار ثبت شد ($p < 0/05$) (نمودار ۲). همچنین بین شیر خام شتر + ریسپریدون و گروه ریسپریدون اختلاف معنی‌داری

معنادار ثبت شد ($p < 0/05$) (نمودار ۲). همچنین بین شیر خام شتر + ریسپریدون و گروه ریسپریدون اختلاف معنی‌داری



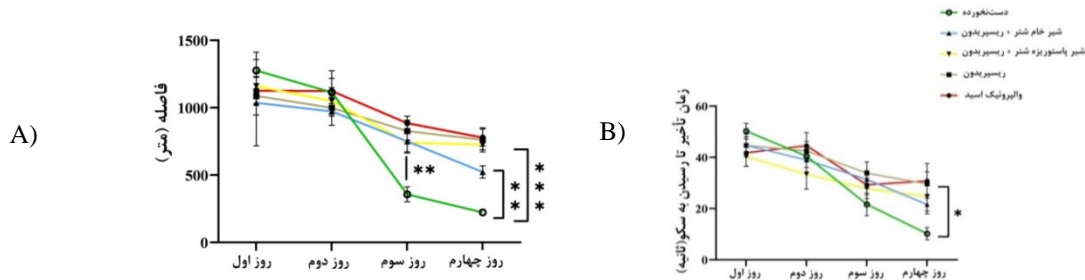
نمودار ۲- اثر شیر خام و پاستوریزه شتر به همراه داروی ریسپریدون بر آزمون پاسخ به درد موش‌های صحرائی القا شده با والپروئیک اسید. نمودار به صورت "انحراف استاندارد میانگین \pm میانگین" رسم شده‌اند و تعداد موش‌ها در هر گروه ($n=6$) بود. برای مقایسه بین گروه‌ها، قبل و بعد از درمان و نیز Naive قبل از درمان با سایر گروه‌ها از آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شده است. اختلاف معنی‌داری برای مقایسه قبل و بعد از درمان (# نشان دهنده $p < 0/05$)، برای مقایسه Naive قبل از درمان با سایر گروه‌ها ($\$$ نشان دهنده $p < 0/05$)، ($\$$ نشان دهنده $p < 0/01$) نشان داده شد. اختصارات گروه‌ها شامل: دست‌نخورده (Naive)، شیر خام شتر (RCM)، شیر پاستوریزه شتر (PCM)، ریسپریدون (Ris)، والپروئیک اسید (Control)

در بررسی حافظه یادگیری، بر اساس تجزیه و تحلیل آماری آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری‌های مکرر در آزمون مسافت طی شده، بین روزهای یک تا چهار فرزندان موش‌هایی که والپروئیک اسید دریافت کرده بودند اختلاف معنی‌داری در رسیدن به سکو مشاهده نشد ($p > 0/05$).

در حالی که بین تمام روزهای Naive اختلاف معنی‌دار ($p < 0/001$) بین روزهای یک و سه، یک و چهار، دو و سه، دو و چهار مشاهده شد و نیز پس از ۴۲ روز تیمار بین روزهای یک و چهار، دو و چهار در گروه شیر خام شتر + ریسپریدون معنی‌دار ($p < 0/05$) شد. همچنین بین روزهای یک و سه، یک و چهار، دو و چهار در شیر پاستوریزه شتر + ریسپریدون اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$)، ($p < 0/01$) مشاهده شد. در گروه ریسپریدون بین روزهای یک و سه، یک و چهار، دو و چهار اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$)، ($p < 0/01$) وجود داشت. در مقایسه با گروه Naive، گروه کنترل، ریسپریدون در روز چهارم و گروه شیر خام شتر و شیر پاستوریزه شتر در روزهای مختلف با گروه Naive اختلاف معنی‌داری ثبت نکردند ($p > 0/05$).

شیر خام شتر + ریسپریدون در روزهای مختلف با گروه Naive اختلاف معنی‌داری ثبت نکردند. این بدان معنا است که حافظه موش‌ها با دریافت شیر خام شتر بهبود یافته است (نمودار ۳، A). طبق نتایج سه گروه: کنترل، گروه ریسپریدون و گروه شیر پاستوریزه شتر + ریسپریدون در آزمون تأخیر در یافتن سکو بین روزهای آن‌ها اختلاف معنی‌داری در یافتن سکو مشاهده نشد. در حالی‌که بین تمام روزهای Naive ($p < 0/05$)، ($p < 0/01$)، ($p < 0/001$) و نیز روزهای یک و چهار، دو و چهار در گروه شیر خام شتر + ریسپریدون معنی‌دار ($p < 0/05$)، ($p < 0/01$) شد. در مقایسه با گروه Naive، گروه کنترل، ریسپریدون در روز چهارم اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) دیده شد. در حالی‌که گروه شیر خام شتر و شیر پاستوریزه شتر در روزهای مختلف با گروه Naive اختلاف معنی‌داری ثبت نکردند ($p > 0/05$). این بدان معنی است که حافظه موش‌ها با دریافت شیر خام بهبود یافته است (نمودار ۳، B).

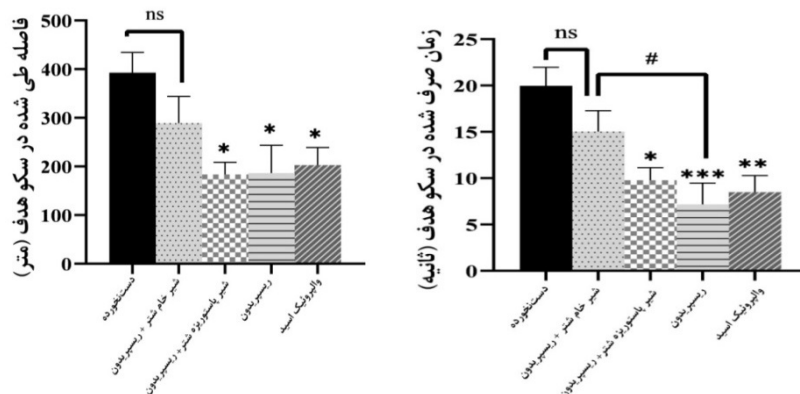
در بررسی حافظه یادگیری، بر اساس تجزیه و تحلیل آماری آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری‌های مکرر در آزمون مسافت طی شده، بین روزهای یک تا چهار فرزندان موش‌هایی که والپروئیک اسید دریافت کرده بودند اختلاف معنی‌داری در رسیدن به سکو مشاهده نشد ($p > 0/05$).



نمودار ۳- اثر شیر خام و پاستوریزه شتر به همراه داروی ریسپریدون بر آزمون یادگیری فضایی در موش‌های صحرائی القاء شده با والپروئیک اسید. (A) فاصله طی شده برای رسیدن به سکو. (B) زمان تأخیر تا رسیدن به سکو. نمودارها به صورت "انحراف استاندارد میانگین ± میانگین" رسم شده‌اند و تعداد موش‌ها در هر گروه (n=۶) بود. برای مقایسه بین گروه‌ها بعد درمان (* نشان دهنده $p < 0.05$)، (** نشان دهنده $p < 0.01$) و (***) نشان دهنده $p < 0.001$) است. اختصارات گروه‌ها شامل: دست‌نخورده (Naive)، شیر خام شتر (RCM)، شیر پاستوریزه شتر (PCM)، ریسپریدون (Ris)، والپروئیک اسید (Control).

شتر زمان بیشتری را در بخش سکو برداشته شده برای یافتن سکو صرف کرد. در حالی‌که گروه شیر پاستوریزه شتر + ریسپریدون، گروه کنترل و گروه ریسپریدون به ترتیب $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار با گروه سالم داشتند (نمودار ۴، B). این نتایج نشان داد تنها شیر خام شتر در بهبود حافظه فضایی نقش دارد. همچنین شیر خام شتر + ریسپریدون نسبت به گروه ریسپریدون در زمان تأخیر یافتن به سکو اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) ثبت کرد.

برای بررسی حافظه مرجع، آزمایش پروب در روز پنجم انجام شد. با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه، اثر معنی‌داری مسافت طی شده در بخش سکوی برداشته شده در مقایسه با Naive سه گروه شیر پاستوریزه شتر + ریسپریدون، ریسپریدون و گروه کنترل اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0.05$)، در حالی‌که بین گروه شیر خام شتر + ریسپریدون اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد که این نشان از تأثیر شیر خام شتر بر حافظه فضایی است (نمودار ۴، A). محاسبه تأخیر در رسیدن به سکو نیز همانند مسافت طی شده گروه شیر خام



نمودار ۴- اثر شیر خام و پاستوریزه شتر به همراه داروی ریسپریدون بر آزمون حافظه فضایی در موش‌های صحرائی القاء شده با والپروئیک اسید. (A) فاصله طی شده در بخش سکو هدف. (B) زمان صرف شده در بخش سکو هدف. نمودارها به صورت "انحراف استاندارد میانگین ± میانگین" رسم شده‌اند و تعداد موش‌ها در هر گروه (n=۶) بود. اختلاف معنی‌داری برای مقایسه بین گروه‌ها بعد از درمان (# نشان دهنده $P < 0.05$)، برای مقایسه Naive با سایر گروه‌ها بعد از درمان (* نشان دهنده $p < 0.05$)، (** نشان دهنده $p < 0.01$) و (***) نشان دهنده $p < 0.001$) است.

$(p < 0.01)$ و $(p < 0.001)$ (***) نشان دهنده $ns = \text{non-significant}$ نشان دهنده عدم معنی‌داری است. اختصارات گروه‌ها شامل:

دست‌نخورده (Naïve)، شیر خام شتر (RCM)، شیر پاستوریزه شتر (PCM)، ریسپریدون (Ris)، والپروئیک اسید (Control)

بحث

نشان داد که موش‌های اوتیسمی از اضطراب بیشتری نسبت به موش‌های سالم برخوردار هستند. پس از دریافت درمان تا حدودی اضطراب آن‌ها به واسطه قرارگیری بیشتر در بازوی باز و کمتر در بازوی بسته بهبود بخشید. در مطالعات گذشته نیز نشان داده شد موش‌های اوتیسمی ترجیح می‌دهند زمان بیشتری در بازوی بسته سپری کنند و نیز تعداد ورود آن‌ها به بازوی بسته بیشتر بود.

این مطالعات توانستند با داروهای متفاوت مانند متفورمین، فنوبورات اضطراب ناشی از تزریق والپروئیک اسید را تا حدودی بهبود بخشند (۱۵، ۲۰). در مطالعه حاضر نیز داروی ریسپریدون نشان داد می‌تواند در درمان اضطراب مفید باشد. در مطالعات گذشته گزارش شده است که افراد جوان دارای اوتیسم در مقایسه با سایر هم سن‌وسالان خود از اختلالات اضطرابی بالایی (۴۰٪) برخوردار هستند (۲۳، ۲۴).

درک درد به دلیل فعال شدن مسیره‌های آوران محیط (Peripheral afferent pathways) و از طریق شبکه‌های حسی در هنگام قرار گرفتن در معرض محرک‌های مکانیکی، شیمیایی و الکتریکی باعث تحریک تکانه‌های بین نخاع و مغز می‌شود. در این آزمایش افزایش آستانه درد در موش‌های صحرایی در معرض والپروئیک اسید مشاهده شد. به‌خوبی مستند شده است که قرار گرفتن در معرض والپروئیک اسید در دوران بارداری، باعث آسیب به مسیره‌های تعدیل‌کننده درد در جنین می‌شود که در ماه اول زندگی پس از تولد قابل مشاهده است (۲۵). افزایش آستانه درد در گروه‌های والپروئیک اسید در این مطالعه مطابق با گزارش‌هایی است که نشان دهنده کاهش حساسیت به محرک‌های درد و نیز پاسخ درد در آزمون Hot-plate هستند (۱۹، ۲۶-۲۷). با این حال، برخلاف نتایج حاصله، نویسندگان دیگر گزارش دادند که پاسخ و آستانه درد در بیماران اوتیسم تغییر نمی‌کند، اما کودکان مبتلا به اوتیسم نمی‌توانند واکنش خود را نسبت به محرک‌های دردناک به همان شیوه‌ای که یک

شیر شتر دارای اثرات درمانی بالقوه در اوتیسم اخیراً اهداف مطالعاتی گسترده‌ای را در بر گرفته است. با توجه به این‌که اکثر مطالعات گزارش شده گزارش مودی بودند و نیز مطالعه جامع حیوانی و یا سلولی و حتی کارآزمایی بالینی به آن صورت گزارش نشده است نیاز است برای مطمئن شدن از اثر شیر شتر و نیز مکانیسم اثر آن بر خصوصیات و مؤلفه‌های رفتاری بیشتر مورد بررسی قرار گیرد. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر مصرف شیر شتر بر آزمون رفتاری اجتماعی روی موش‌های صحرایی اوتیسمی است.

در مطالعه حاضر ابتدا مدل موش اوتیسمی ایجاد شد. در این زمینه، اسید والپروئیک در روز ۱۲/۵ حاملگی به موش‌های صحرایی ماده تزریق شد. حیواناتی که در مرحله قبل از تولد در معرض اسید والپروئیک قرار گرفتند، افزایش اضطراب، پاسخ به درد و همچنین کاهش یادگیری فضایی و مرجع را نشان دادند. در حالی‌که درمان با شیر شتر و ریسپریدون باعث بهبود اختلال رفتاری در موش‌های صحرایی شد.

در مطالعه‌ای با مقایسه دوزهای مختلف والپروئیک که در روز ۱۲/۵ حاملگی تجویز شد، مشاهده شد که دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ارتباطات اجتماعی و تبعیض اجتماعی در فرزندان را نشان می‌دهد و دوزهای ۳۰۰ تا ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فنوتیپ‌های شبه اوتیسم در سویه‌های مختلف موش‌ها ایجاد می‌کند (۲۱). با این حال، به نظر می‌آید دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم مؤثرترین دوز در موش‌های ماده باردار در ایجاد علائم اصلی اوتیسم در فرزندان است (۲۲).

با توجه به نتایج این مطالعه در آزمون‌های تداخلات رفتاری و نیز تکراری مشاهده شد که موش‌هایی که والپروئیک اسید دریافت کرده بودند نسبت به کنترل اختلاف معنی‌داری داشتند که این موضوع مؤید مطالعات گذشته است.

در مطالعه حاضر، آزمون اضطراب توسط Elevated plus maze

مطالعات گذشته حاکی از آن است که درمان با ریسپریدون، نقایص مربوط به حافظه را تشدید می‌کند که ممکن است به دلیل اختلال در رمزگذاری اطلاعات در حافظه فعال و یا اثر نامطلوب ظاهری ریسپریدون در عملکردهای تعدیل‌کننده سیستم‌های گیرنده D1 در ناحیه پیشانی باشد (۳۷). همچنین در مطالعه دیگر با روش Morris water maze نشان داده شده است که ریسپریدون تأثیری بر حافظه و یادگیری ندارد (۳۸).

در مطالعه اخیر نشان داده شده است که ریسپریدون نسبت به proBDNF / BDNF فاکتور نورون‌زایی مشتق شده از مغز (Brain-derived neurotrophic factor) را در هیپوکامپ و قشر جلوی پیشانی افزایش می‌دهد. همچنین منجر به کاهش فسفوریلاسیون پروتئین کیناز بی (Protein kinase B; PKB) و فسفوریلاسیون پروتئین کیناز سی (Protein kinase C; PKC) در قشر جلوی پیشانی می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که ریسپریدون، ممکن است تأثیر منفی بر حافظه شناسایی و مولکول‌های سیگنالینگ مرتبط با نوروتروفین بگذارد که از انعطاف‌پذیری سیناپسی و عملکرد شناختی پشتیبانی می‌کنند (۳۹). در مطالعه حاضر بی‌اثر بودن گروه درمانی شیر پاستوریزه و کم‌اثر بودن شیر خام ممکن است به دلیل اثر ریسپریدون باشد.

در مطالعه‌ای مشاهده شده است که مصرف شیر شتر به مدت ۳۰ روز، علائم اوتیسم در کودکان زیر ۱۵ سال را کاهش می‌دهد (۴۰). برخی از والدین گزارش دادند فرزندان آن‌ها که از اوتیسم رنج می‌بردند، پس از استفاده شیر شتر، برخی از علائم آن‌ها مانند کیفیت خواب، برنامه‌ریزی حرکتی، آگاهی فضایی (Spatial awareness) تماس چشمی، گفتار و عملکرد دستگاه گوارش بهبود یافته است. در مطالعه‌ای که بر روی ۶۰ بیمار مبتلا به اوتیسم (۲ تا ۱۲ سال) در عربستان سعودی انجام شد، روش کار به این صورت بود که ۵۰۰ میلی‌لیتر شیر دو بار در روز و به مدت دو هفته به کودکان داده شد، تجزیه و تحلیل داده‌ها حاکی از آن بود که سطح پایه آنتی‌اکسیدان‌ها در همه کودکان پایین بود و بهبود قابل‌توجهی در آزمون‌های شناختی و رفتاری مشهود بود و اثرات استرس اکسیداتیو کاهش یافت.

کودک عادی نشان می‌دهد، نشان دهند (۲۸-۲۹). درمان شیر شتر با اثرات ضد دردی همراه بود به طوری که حساسیت درد در موش‌های صحرایی در معرض بارداری والپروئیک اسید کاهش یافت. در حقیقت، شیر شتر در مطالعات گذشته به دلیل داشتن لاکتوفرون زیاد که تولید opinid به‌عنوان واسطه گیرنده بی‌دردی همچنین به‌عنوان آنتاگونیست با واسطه‌های گیرنده‌های درد عمل ضد درد را می‌تواند ایفا کند (۳۰-۳۱).

پپیدگی‌ها در بیماران اوتیسم معمولاً با یادگیری فضایی و نقص حافظه همراه است (۳۲). پاسخ اجتماعی ضعیف و عدم مهارت زبانی لازم برای بیان در کودکان مبتلا به اوتیسم با نقص در یادگیری فضایی و حافظه مرتبط است (۳۳). کاربرد Morris water maze به عنوان یک روش کلاسیک برای آزمایش یادگیری فضایی وابسته به هیپوکامپ و حافظه فضایی در جوندگان است. بدین‌گونه که توانایی یک حیوان در استفاده از نشانه‌های دیداری دور برای هدایت مسیر مستقیم به یک سکوی مخفی سنجش می‌شود (۳۴). یافته‌های این مطالعه نشان داد که قرار گرفتن جنین در معرض والپروئیک اسید منجر به تولد فرزندان می‌شود که توانایی یادگیری فضایی ضعیفی دارند که در طولانی شدن زمان تأخیر و طی مسافت طولانی در آزمون Morris water maze مشهود است.

مطالعات زیادی نشان دادند که والپروئیک اسید در آزمون Morris water maze باعث اختلال یادگیری و حافظه فضایی می‌شود (۲۰، ۳۵). در مطالعه‌ای همبستگی شدید بین تأخیر در رسیدن به سکو و طول مسیر در آزمون Morris water maze گزارش شده است (۳۶).

در مطالعه حاضر نیز نتایج زمان تأخیر و مسافت طی شده در بین گروه‌ها نتایج مشابه‌ای داشت. علاوه بر این، در آزمایش پروب، والپروئیک اسید کاهش قابل توجهی در زمان صرف شده و مسافت طی شده در محل سکو را نشان داد که نشان دهنده نقص حافظه فضایی است. با این حال، ضعف در یادگیری فضایی ناشی از والپروئیک اسید و اختلال حافظه با استفاده از شیر شتر بهبود یافت.

شیر شتر و بررسی مواد مؤثره آن با دوزهای متنوع به همراه دیگر داروهای مؤثر در بهبود علائم اوتیسم در گروه‌های مجزا تست کردند و همچنین برای درک بهتر تأثیر شیر شتر در اوتیسم، مکانیسم مولکولی و ژن‌های مؤثر در اوتیسم بررسی شوند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد شیر شتر به‌عنوان یک ماده سرشار از مواد مغذی به‌عنوان یک مکمل غذایی مناسب در بهبود علائم اوتیسم همانند اضطراب و اختلال در حافظه با توجه به نتایج آزمون‌های رفتاری انجام شده می‌تواند مفید باشد. همچنین در آینده با مطالعه و آنالیز ترکیبات شیر شتر ممکن است بتوان به فهم مکانیسم درمانی آن دست یافت.

تشکر و قدردانی

محققان از دانشگاه علوم پزشکی مشهد به دلیل حمایت مالی و همچنین از واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان قائم (عج) دانشگاه علوم پزشکی مشهد، جهت همکاری در نشر مقاله تقدیر و تشکر می‌نمایند. این مطالعه با تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد و شناسنامه IR.MUMS.MEDICAL.REC.1398.264 انجام شد.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده‌ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها: سحر حیدری، علی محمودی، علی طلایی، سید جمال میرموسوی، محمد محمدزاده
(۲) تهیه پیش نویس مقاله یا بازرینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه: سحر حیدری، علی محمودی، سید جمال، محمد محمدزاده

(۳) تایید نهایی دستنوشته پیش از ارسال به مجله:

سحر حیدری، علی محمودی، علی طلایی، سید جمال میرموسوی، محمد محمدزاده

محققان نشان دادند که شیر شتر در تنظیم سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مواد آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیماتیک نقش مهمی دارد و اثرات استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد و علائم روان‌شناختی را بهبود می‌بخشد (۴۱). در گزارش موردی در سال ۲۰۱۳، پسری دارای علائم اوتیسم به مدت شش سال با مصرف هر شب یک لیوان شیر شتر بهبود علائم اوتیسمی را تجربه کرد (۱۴). یک مطالعه بالینی دیگر تأثیر شیر شتر بر روی نشانگرهای بیوشیمیایی را بررسی کرد. چهل و پنج کودک مبتلا به اوتیسم به‌طور تصادفی انتخاب شدند و به مدت دو هفته شیر شتر پاستوریزه برای گروه I (۱۵ نفر)، شیر شتر خام برای گروه II (۱۵ نفر) و دارونما برای گروه III (۱۵ نفر) دریافت کردند که نتایج علائم بالینی اوتیسم را به‌طور قابل‌توجهی بهبود بخشید و سطح سرمی "تیموس و کموکین تنظیم-فعالیت ۱" (thymus and activation-regulated chemokine) را در کودکان اوتیسم کاهش داد (۴۲).

در مطالعه‌ای که روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شیر خام و پاستوریزه شتر در کودکان اوتیسمی انجام شد، نشان داد خاصیت آنتی‌اکسیدانی بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری ندارد. شیر شتر در مطالعه‌ای نشان داد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مولکول‌های آنتی‌اکسیدان غیر آنزیماتیک بهبود پیدا کردند. همچنین براساس مقیاس رتبه‌بندی اوتیسم (Childhood autism rating scale; CARS) رفتار اجتماعی کودکان مورد ارزیابی بهبود پیدا کردند (۴۰). در مطالعه گذشته محققان تأثیر شیر شتر با افزایش میزان سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به همراه بهبود رفتارهای تکراری و اجتماعی گزارش شد (۴۳).

در این مطالعه با توجه به ملاحظات اخلاقی در انجام پژوهش در حوزه حیوانات آزمایشگاهی مبنی بر استفاده حداقل تعداد حیوانات به همراه محدودیت‌های دیگر منجر به عدم بررسی مکانیسم‌های مولکولی و نیز آنالیز مواد مؤثره شیر شتر شده است. لذا پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی باخالص سازی

References

1. Lyall K, Croen L, Daniels J, Fallin MD, Ladd-Acosta C, Lee BK, et al. The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annual Review of Public Health*. 2017;38: 81-102.
2. Viscidi EW, Johnson AL, Spence SJ, Buka SL, Morrow EM, Triche EW. The association between epilepsy and autism symptoms and maladaptive behaviors in children with autism spectrum disorder. *Autism*. 2014;18(8):996-1006
3. Yasuda Y, Hashimoto R, Nakae A, Kang H, Ohi K, Yamamori H, et al. Sensory cognitive abnormalities of pain in autism spectrum disorder: A case-control study. *Annals of General Psychiatry*. 2016;15(1):1-8.
4. Zhang M, Jiao J, Hu X, Yang P, Huang Y, Situ M, et al. Exploring the spatial working memory and visual perception in children with autism spectrum disorder and general population with high autism-like traits. *PloS one*. 2020;15(7):e0235552.
5. Jin Y, Wee C-Y, Shi F, Thung K-H, Yap P-T, Shen D, editors. Identification of infants at risk for autism using multi-parameter hierarchical white matter connectomes. *International Workshop on Machine Learning in Medical Imaging*; 2015: Springer.
6. Yenkovyan K, Grigoryan A, Fereshetyan K, Yepremyan D. Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Behavioural brain research*. 2017;331:92-101.
7. Kellogg M, Meador KJ. Neurodevelopmental effects of antiepileptic drugs. *Neurochemical research*. 2017;42(7):2065-70.
8. Veroniki AA, Rios P, Cogo E, Straus SE, Finkelstein Y, Kealey R, et al. Comparative safety of antiepileptic drugs for neurological development in children exposed during pregnancy and breast feeding: a systematic review and network meta-analysis. *BMJ open*. 2017;7(7):e017248.
9. Inui T, Kumagaya S, Myowa-Yamakoshi M. Neurodevelopmental Hypothesis about the Etiology of Autism Spectrum Disorders. *Front Hum Neurosci*. 2017;11:354.
10. Lamy M, Erickson CA. Pharmacological management of behavioral disturbances in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Current problems in pediatric and adolescent health care*. 2018;48(10):250-64.
11. Yagil R. Camel milk and its unique anti-diarrheal properties. *Isr Med Assoc J*. 2013;15(1):35-6.
12. Izadi A, Khedmat L, Mojtahedi SY. Nutritional and therapeutic perspectives of camel milk and its protein hydrolysates: A review on versatile biofunctional properties. *Journal of Functional Foods*. 2019;60:103441.
13. Zibae S. Nutritional and therapeutic characteristics of camel milk in children: a systematic review. *Electronic physician*. 2015;7(7):1523.
14. Adams CM. Patient report: autism spectrum disorder treated with camel milk. *Global advances in health and medicine*. 2013;2(6):78-80.
15. Mirza R, Sharma B. Benefits of Fenofibrate in prenatal valproic acid-induced autism spectrum disorder related phenotype in rats. *Brain research bulletin*. 2019;147:36-46.
16. Hamzawy MA, El-Ghandour YB, Abdel-Aziem SH, Ali ZH. Leptin and camel milk abate oxidative stress status, genotoxicity induced in valproic acid rat model of autism. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2018;32:2058738418785514.
17. Hara Y, Takuma K, Takano E, Katashiba K, Taruta A, Higashino K, et al. Reduced prefrontal dopaminergic activity in valproic acid-treated mouse autism model. *Behavioural brain research*. 2015;289:39-47.
18. Hara Y, Ago Y, Taruta A, Hasebe S, Kawase H, Tanabe W, et al. Risperidone and aripiprazole alleviate prenatal valproic acid-induced abnormalities in behaviors and dendritic spine density in mice. *Psychopharmacology*. 2017;234(21):3217-28.
19. Shamsi Meymandi M, Sepehri G, Moslemizadeh A, Vakili Shahrababaki S, Bashiri H. Prenatal pregabalin is associated with sex-dependent alterations in some behavioral parameters in valproic acid-induced autism in rat offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2020;80(6):500-11.
20. Ishola IO, Balogun AO, Adeyemi OO. Novel potential of metformin on valproic acid-induced autism spectrum disorder in rats: involvement of antioxidant defence system. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2020;34(6):650-61.

21. Servadio M, Manduca A, Melancia F, Leboffe L, Schiavi S, Campolongo P, et al. Impaired repair of DNA damage is associated with autistic-like traits in rats prenatally exposed to valproic acid. *European Neuropsychopharmacology*. 2018;28(1):85-96.
22. Hara Y, Ago Y, Higuchi M, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, et al. Oxytocin attenuates deficits in social interaction but not recognition memory in a prenatal valproic acid-induced mouse model of autism. *Hormones and behavior*. 2017;96:130-6.
23. Hollocks MJ, Pickles A, Howlin P, Simonoff E. Dual cognitive and biological correlates of anxiety in autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2016;46(10):3295-307.
24. Bitsika V, Sharpley CF, Andronicos NM, Agnew LL. Prevalence, structure and correlates of anxiety-depression in boys with an autism spectrum disorder. *Research in developmental disabilities*. 2016;49:302-11.
25. Chen JY-R, Yeh G-C, Tao P-L, Kuo C-T, Chen K-B, Wen Y-R. Prenatal exposure to methamphetamine alters the mechanical withdrawal threshold and tonic hyperalgesia in the offspring. *Neurotoxicology*. 2010;31(5):432-8.
26. Morakotsriwan N, Wattanathorn J, Kirisattayakul W, Chaisiwamongkol K. Autistic-like behaviors, oxidative stress status, and histopathological changes in cerebellum of valproic acid rat model of autism are improved by the combined extract of purple rice and silkworm pupae. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016.
27. Edalatmanesh MA, Nikfarjam H, Vafae F, Moghadas M. Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. *Brain research*. 2013;1526:15-25.
28. Moore DJ. Acute pain experience in individuals with autism spectrum disorders: A review. *Autism*. 2015;19(4):387-99.
29. Allely C. Pain sensitivity and observer perception of pain in individuals with autistic spectrum disorder. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.
30. Tanhaeian A, Nazifi N, Shahriari Ahmadi F, Akhlaghi M. Comparative study of antimicrobial activity between some medicine plants and recombinant Lactoferrin peptide against some pathogens of cultivated button mushroom. *Archives of Microbiology*. 2020;202(9):2525-32.
31. Superti F. Lactoferrin from bovine milk: a protective companion for life. *Nutrients*. 2020;12(9):2562.
32. Foti F, De Crescenzo F, Vivanti G, Menghini D, Vicari S. Implicit learning in individuals with autism spectrum disorders: a meta-analysis. *Psychological medicine*. 2015;45(5):897-910.
33. Church BA, Rice CL, Dovgopoly A, Lopata CJ, Thomeer ML, Nelson A, et al. Learning, plasticity, and atypical generalization in children with autism. *Psychonomic Bulletin & Review*. 2015;22(5):1342-8.
34. Lu Z, Yang T, Wang L, Qiu Q, Zhao Y, Wu A, et al. Comparison of different protocols of Morris water maze in cognitive impairment with heart failure. *Brain and behavior*. 2020;10(2):e01519.
35. Bambini-Junior V, Rodrigues L, Behr GA, Moreira JCF, Riesgo R, Gottfried C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain research*. 2011;1408:8-16.
36. Ishola IO, Adeyemi OO, Agbaje EO, Tota S, Shukla R. Combretum mucronatum and Capparis thoningii prevent scopolamine-induced memory deficit in mice. *Pharmaceutical biology*. 2013;51(1):49-57.
37. Reilly JL, Harris MS, Keshavan MS, Sweeney JA. Adverse effects of risperidone on spatial working memory in first-episode schizophrenia. *Archives of general psychiatry*. 2006;63(11):1189-97.
38. Celikyurt IK, Akar FY, Ulak G, Mutlu O, Erden F. Effects of Risperidone on Learning and Memory in Naive and MK-801-Treated Rats. *Pharmacology*. 2011;87(3-4):187-94.
39. Poddar I, Callahan PM, Hernandez CM, Pillai A, Yang X, Bartlett MG, et al. Chronic oral treatment with risperidone impairs recognition memory and alters brain-derived neurotrophic factor and related signaling molecules in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2020;189:172853.
40. Sathe N, Andrews JC, McPheeters ML, Warren ZE. Nutritional and dietary interventions for autism spectrum disorder: a systematic review. *Pediatrics*. 2017;139(6).
41. Al-Ayadhi LY, Elamin NE. Camel Milk as a Potential Therapy as an Antioxidant in Autism Spectrum Disorder (ASD). *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:602834.

42. Bashir S, Al-Ayadhi LY. Effect of camel milk on thymus and activation-regulated chemokine in autistic children: double-blind study. *Pediatric Research*. 2014;75(4):559-63.
43. Heydari S, Mahmoudi A, Amin B, Pejhan A, Mirmoosavi SJ, Gholami O, et al. Effects of Camel Milk on Antioxidant Activity in Rats with Valproic Acid-induced Autism. *Journal of Nutrition, Fasting and Health*. 2021;9(2):160-70.

The effect of camel milk on pain, anxiety and spatial memory in male offspring of female rat model of autism induced by valproic acid

Sahar Heydari¹, Ali mahmoudi², Ali Talaei³, Seyed Jamal Mirmoosavi⁴, Mohammad Mohammadzadeh^{5*}

1. M.Sc. Student of Medical Physiology, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Iran

2. P.h.D student of medical biotechnology, Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Iran

3. Professor, Department of Psychiatry, Psychiatry and Behavioral Sciences Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4. Assistant Professor in Iranian Research Center for Healthy Aging, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

5. Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Iran

Corresponding author: Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Iran Email: mohamad1353@gmail.com

Abstract

Background & Aim: Autism is a disorder characterized by anxiety, impairment in memory, and pain. Camel milk has antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory properties. This study aimed to determine the effect of camel milk on pain, anxiety, and spatial memory in male offspring of female model rats induced via valproic acid.

Methods: In an experimental study, female Wistar rats were injected intraperitoneally valproic acid (500 mg/kg) on day 12.5 of gestation. Then, male offspring were divided into five groups (n=6) including Naïve, risperidone, raw camel milk + risperidone, pasteurized camel milk + risperidone, and valproic acid. In the treatment phase, risperidone was injected at a dose of 0.2 mg/kg, and camel milk was given 10 ml/kg daily for 42 days with a gavage needle on the 35th day after the birth. Pain response, anxiety test, and spatial memory were measured before treatment on days 30 to 35 and also after completion of treatment on days 77-84. Data were analyzed using one-way and two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests.

Results: After receiving valproic acid and birth of offspring, there was a significant difference in pain response, anxiety, and spatial learning and memory between the naïve group compared to the entire groups after 42 days of treatment ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $P < 0.001$, respectively). Response to pain and anxiety decreased after receiving camel milk. Also, there was a significant difference between raw camel milk + risperidone and risperidone group in pain response test and platform finding time in spatial memory test ($p < 0.05$).

Conclusion: With the improvement of autism symptoms such as anxiety, memory impairment and learning, camel milk can probably be recommended as a suitable dietary supplement for autistic patients.

Keywords:

Autism spectrum disorder, Anxiety, Memory and learning tests, Camelus milk, Valproic acid, Rat

How to Cite this Article: Heydari S ,Mahmoudi A, Talaei A , S Mirmoosavi J, Mohammadzadeh M. The effect of camel milk on pain, anxiety and spatial memory in male offspring of female rat model of autism induced by valproic acid . Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2021;9(3):22-36.

*آدرس نویسنده مسئول استاد گروه فیزیولوژی ، دانشکده پزشکی،
دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران
آدرس پست الکترونیک: mohamad1353@gmail.com