

УДК 616.896

DOI:10.54503/0514-7484-2024-64.2-56

Вальпроат-индуцированная модель расстройств аутистического спектра

К. С. Ферешетян

*Лаборатория Нейронауки, КоБрейн центр,
ЕГМУ, им. М.Гераци, кафедра биохимии,
0025, Ереван, ул. Корюна, 2*

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра, вальпроевая кислота, пренатальная модель, фенотип

Введение

Расстройства аутистического спектра (РАС) — это расстройства развития нервной системы, характеризующиеся особыми поведенческими нарушениями [33]. Клинические проявления РАС включают нарушения социального взаимодействия, дефицит вербальной и невербальной социальной коммуникации и познания, стереотипное повторяющееся поведение, а также другие сенсорные и двигательные сложности [58]. Большинство симптомов возникают в раннем периоде развития. По данным Национальной ассоциации аутизма, около 1% населения земного шара страдает аутизмом, причем показатель распространенности среди мальчиков выше, чем среди девочек. В США почти у 1 из 54 детей выявлен РАС, по оценкам центра по контролю и профилактике заболеваний [31, 35]. РАС является серьезным заболеванием, влияющим на индивидуальное и общественное здоровье из-за значительных трудностей, таких как финансовые требования и эмоциональное воздействие на семьи больных. К сожалению, несмотря на то, что некоторые симптомы, например бессонница, могут быть улучшены после раннего вмешательства, лекарства от РАС до сих пор не существует [32, 53]. Таким образом, исследования, направленные на обеспечение эффективного лечения РАС, в настоящий момент крайне актуальны.

Факторы риска развития РАС

Имеющиеся на данный момент научные данные свидетельствуют о сложном и многофакторном происхождении РАС, включающем как генетические факторы, так и факторы окружающей среды [57]. В результате многочисленных генетических исследований пациентов с РАС и их семей была доказана гетерогенная природа аутизма. Большинство белков, кодируемых аутизм-ассоциированными генами, участвуют в формировании

синапсов и ремоделировании хроматина [50]. Гены риска РАС кодируют синаптические белки клеточной адгезии, такие как нейролиггин, нейрексин и кадгерин, Shank [23]; белки синаптических везикул синапсин-1 (SYN1) и синапсин-2 (SYN2); натриевые транспортные белки, потенциалзависимые кальциевые каналы, сигнальные белки рецептора глутамата, гамма-субъединицы GABA рецептора [15, 17, 20]. В регуляции процессов развития участвуют такие гены, как хромодомен геликазы ДНК-связывающий белок (Chromodomain helicase DNA-binding protein, CHD8), Т-бокс белок (T-box protein, TBR1), хрупкая X-хромосома (Fragile X mental retardation, FMR1) [17]. Помимо мутаций указанных генов важную роль играют эпигенетические факторы. Гены с эпигенетическими модулирующими функциями кодируют белки метилирования, ремоделирования хроматина (MeCP2), сплайсинга РНК (FMRP), посттрансляционных модификаций (UBE3A). Важно отметить, что ЦНС подвержена воздействию факторов окружающей среды, которые, вероятно, действуют через эпигенетическую регуляцию, на всем протяжении своего развития. Среди пренатальных факторов риска выделяют вирусные инфекции (вирус краснухи, цитомегаловирус), лекарственные средства с тератогенным эффектом (талидомид, вальпроевая кислота), алкоголь, возраст родителей и т.д. [40]. Преждевременные роды, низкая масса тела при рождении, родовая асфиксия, гипотермия, гипогликемия являются важными перинатальными факторами риска нарушения развития ЦНС, в том числе с проявлением аутизма [40]. Вирусные инфекции, аутоиммунные болезни [1], синдром повышенной проницаемости кишечника [16], оксидативный стресс [28], недостаточность витамина D [5], действие тяжелых металлов [48] в период раннего постнатального развития могут повысить риск развития аутизма.

Вальпроат-индуцированные РАС. Животные модели РАС

Вальпроевая кислота (ВК) широко используется в клинической практике в качестве антиэпилептического препарата, а также для лечения биполярного расстройства [47]. Тератогенность вальпроевой кислоты является одним из основных рисков применения, особенно в период первого триместра беременности [48]. Многочисленные исследования показали связь вальпроевой кислоты и дефектов эмбрионального развития нервной трубки, а также ряда конгенитальных нарушений, в частности дефекта межпредсердной перегородки, хейлосхизиса (расщелина верхней губы), краниостинотоза, полидактилии. Более того, применение вальпроевой кислоты в период беременности повышает риск развития когнитивных нарушений [10, 11]. Исследования США и Великобритании (Meador et al., 2009) показали, что дети матерей, принимавших монотерапию вальпроевой кислоты в течение беременности, имеют гораздо низкий уровень IQ по сравнению с теми, чьи матери принимали другие антиэпилептические препараты [13]. Ряд других исследований показали повреждающее пренатальное воздействие вальпроевой кислоты на

умственные и вербальные способности детей школьного возраста. Также были выявлены нарушения социальных навыков и невербальных способностей в возрасте трех лет [13]. Многочисленные исследования показали вальпроат-ассоциированный риск развития аутизма или синдрома Аспергера. Результаты датского крупномасштабного исследования показали, что пренатальное применение вальпроевой кислоты повысило риск развития аутизма у родившихся детей на 4,4% [10]. Данные другого проспективного исследования на протяжении 11 лет выявили десятикратное повышение риска развития аутизма и других расстройств развития ЦНС после пренатальной политерапии, включая вальпроат.

Исходя из вышесказанного, введение вальпроевой кислоты беременным крысам на 12-й день беременности стало одной из валидированных и широко используемых животных моделей РАС [34,52]. Однако до сих пор есть много вопросов касательно этой модели. Ряд работ показали зависимость проявляющихся симптомов РАС от времени (эмбриональные дни – 7-19-й), дозы (200-800 мг/кг) и частоты введения вальпроевой кислоты [49]. Таким образом, вопрос точной дозы и времени введения вальпроевой кислоты с целью моделирования РАС остается открытым. В данном контексте важно выделить временные различия развития мозга у людей и крыс. Доказано, что с точки зрения развития мозга первые 10 дней постнатального развития крыс соответствуют 3-му триместру беременности у людей, а 12-13-е дни – дню рождения ребенка [24]. В течение первых двух недель постнатального развития мозг крыс претерпевает такие важные процессы созревания и формирования, как «сбрасывание» синапсов, очищение нейрональных связей [24] и глиогенез [6, 29]. Подобные пластические изменения в раннем постнатальном периоде развития особенно важны в регионах мозга, ответственных за высшие когнитивные функции, например социальное поведение. Еще одним крайне важным процессом, происходящим в указанном временном промежутке, является переход возбуждающего эффекта гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) на ингибирующий [2, 42]. Известно воздействие вальпроевой кислоты на метаболизм ГАМК путем ингибирования ГАМК трансаминазы и активирования глутамат декарбоксилазы, в результате чего повышается количество ГАМК [8]. Таким образом, предполагается, что повышение ГАМК в критический период развития может нарушить переход от возбуждающего нейротрансмиттера в ингибирующий и привести к функциональному дисбалансу. Данное предположение объясняет возможность функциональных нарушений в целевых для аутизма структурах мозга на протяжении раннего постнатального развития [9]. Так, параллельно с пренатальной моделью некоторые научные группы также протестировали постнатальную модель РАС. Исследованы разные схемы введения вальпроевой кислоты: хронические инъекции на постнатальные дни – 2-4-й, 6-12-й, единичные инъекции на 7-

или 14-й день [38, 44, 56]. На животных моделях вальпроат-индуцированного РАС были выявлены модулирующий эффект вальпроата на нейротрансмиссию, а также эпигенетическая регуляция генной экспрессии, путем ремоделирования хроматина. Результаты многих независимых исследований указывают на гиперметилирование H3 и H4 гистонов в мозге мышей, после воздействия вальпроевой кислоты в период эмбрионального развития и аутоподобные поведенческие изменения [27, 37]. Выявлено ингибирующее действие вальпроевой кислоты на гистоновую деацетилазу. В то же время вальпроамид – аналог вальпроевой кислоты без указанного ингибирующего воздействия, не вызывает поведенческие изменения. Эти данные доказывают вовлеченность ингибирования гистоновой деацетилазы в период эмбрионального развития в патогенезе РАС. Другим механизмом действия вальпроевой кислоты является активирование Wnt сигнального пути, который задействован в регуляции дифференциации промежуточных прогениторных клеток в зрелые нейроны. ВК индуцированное активирование β -катенин-Ras-Erk-p21 пути стимулирует дифференциацию прогениторов и ингибирует их пролиферацию [25].

Молекулярно-клеточные и функциональные нарушения вальпроат-индуцированной модели РАС

Многие исследования, направленные на изучение клеточных и молекулярных изменений, сопровождающихся аутистическими чертами поведения после пренатального воздействия ВК, показали морфологические нарушения клеток и синаптических сетей нейронов. Исследования показали меньшую плотность дендритных шипов у детей с аутизмом, сравнительно со здоровыми детьми, в то время как у подростков с аутизмом наблюдается обратная закономерность. Также характерна повышенная плотность дендритных шипов специфических нейронов верхнего V слоя коры у пациентов с аутизмом. Это указывает на то, что арборизация дендритных шипов уменьшается у пациентов с аутизмом [55].

Морфологические исследования мозга мышей, подвергшихся воздействию ВК в пренатальном периоде, выявили уменьшение Нисль-позитивных нейронов в средних (II-III) и нижнем (V) слоях префронтальной коры и в нижних (IV-V) слоях соматосенсорной коры [27]. Клеточные и электрофизиологические исследования подтверждают перестройки нейронных связей после пренатального воздействия ВК. Так, например, у крыс, подвергшихся воздействию ВК, наблюдается более разветвленная дендритная система пирамидных клеток двигательной коры, чем у контрольной группы, предполагая, что ВК замедляет процесс обрезки нейронов [39]. Кроме того, Bringas et al. показали уменьшение плотности дендритных шипиков в префронтальной коре, но увеличение числа шипиков в вентральном гиппокампе крыс, подвергшихся воздействию ВК, что предполагает дистальную гипоконнективность и

локальную гиперконнективность [4]. Примечательно, что это доказательство согласуется с выводами Rinaldi et al. согласно которым, дистальные области «аутистического мозга» недостаточно связаны, а локальные области чрезмерно связаны [45].

На молекулярном уровне Rouillet et al. показали более низкую экспрессию мРНК нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в соматосенсорной коре мышей, подвергшихся воздействию ВК [49]. BDNF — это белок, необходимый для развития мозга. В некоторых исследованиях сообщалось о повышенной иммунореактивности BDNF в тканях головного мозга, сыворотке и плазме пациентов с аутизмом [14, 18]. Это связано с повышенным уровнем proBDNF в результате снижения процессинга предшественника BDNF, т.к. не выявлены изменения уровней мРНК BDNF. Также было выявлено снижение уровня рецептора BDNF TrkB и компонентов сигнального пути, опосредованных PI3K, регулирующих функцию и морфологию дендритных шипов, в веретенообразной извилине [18]. В частности, снижение общего белка и фосфорилированных компонентов PI3K регулируемого пути, Akt, mTOR были обнаружены в височно-теменной коре головного мозга крыс, подвергшихся воздействию ВК [41].

Дисбаланс между возбуждающей и тормозящей синаптической передачей в головном мозге связан с РАС. Исследования показывают, что дисфункция рецепторов NMDA в возбуждающих синапсах связана с аутистическим поведением у животных. Введение ВК в пренатальном периоде развития приводит к изменениям активности синаптических связей медиальной префронтальной коры. В частности снижается возбудимость и увеличиваются локальные связи из-за повышения экспрессии рецептора NMDA. Rinaldi et al. обнаружили, что изменения NMDA глутаматергических рецепторов и кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII) связаны с гиперпластичностью, наблюдаемой в соматосенсорной коре головного мозга крыс, подвергшихся воздействию ВК [46]. Было показано, что повышенные экспрессии субъединиц рецептора NMDA (NR2A и NR2B) и CaMKII усиливают передачу, опосредованную рецептором NMDA, и увеличивают постсинаптическую долговременную потенцию в соматосенсорной коре головного мозга крыс, подвергшихся воздействию ВК [46].

Поведенческое фенотипирование вальпроат-индуцированной модели РАС

Валидация животных моделей требует выполнения следующих критериев: поведенческая (face validity), фармакологическая (construct validity) и предсказательная (predictive validity). Поведенческая валидность отражает степень схожести симптоматики и внешних проявлений расстройств. Многие исследования показали сильную поведенческую валидность вальпроат-индуцированной модели РАС. Так, после пренатального

воздействия вальпроевой кислоты отмечается стереотипное и повторяющееся поведение, снижение социальной активности, нарушение чувства страха и повышенная тревожность [21, 47]. Важно отметить, что социальные проявления зависят от ряда факторов: возраста, пола, окружающей среды. Результаты исследований с размерами выборки, превышающими 40, как правило, свидетельствуют об умеренном снижении социального дефицита с увеличением возраста [48]. Аналогичным образом результаты исследований с участием 40 или более участников, в которых использовалась социальная сфера шкал адаптивного поведения Вайнленда [49], предполагают, что адаптивные социальные способности увеличиваются с возрастом. Однако улучшения редко приводят к выходу из спектра аутизма. У детей с типичным развитием социальная активность повышается к подростковому периоду и является максимальной по сравнению с другими периодами жизни. Подобная закономерность наблюдается также у крыс. Так, например, игровая активность у крыс максимально проявляется на 30-35-е дни постнатального развития.

Основными поведенческими тестами, используемыми для оценки социальной активности животных, являются тест трех камер, тест социальной взаимосвязи, ультразвуковая вокализация. Тест трех камер позволяет оценить как общую социальную активность, так и степень социальной новизны — проявление предпочтения незнакомым животным. По данным метаанализа, результаты 51 исследования показали снижение социальной новизны после воздействия вальпроевой кислотой в дозе 300-600 мг/кг в промежутке 10-13 дней эмбрионального развития. Около восьмидесяти исследований посвящено оценке социального предпочтения на вальпроат-индуцированной модели РАС. Среднестатистически результаты всех работ выявили пониженную заинтересованность живым объектом и большее предпочтение неодушевленному объекту или пустому сектору после введения вальпроевой кислоты в дозе 300-600 мг/кг в периоде 9,5-15 дни беременности. Сорок четыре исследования выявили влияния вальпроевой кислоты на социальное поведение. После пренатального введения вальпроевой кислоты в дозе 400-600 мг/кг в периоде 11,5-12,5 дней уровень социального взаимодействия между животными был понижен. Ряд других исследований показали снижение ультразвуковой вокализации после изоляции детенышей от матерей в возрасте до 2 недель. Наблюдалось как понижение частоты «криков», так и уменьшение их количества за тестируемое время. Некоторые исследования также обнаружили изменение типа «крика» с пониженной амплитудой и с преобладанием плоских, сложных и нисходящих, с уменьшением двух-сложных криков.

Еще одним тестом для фенотипической валидации животной модели РАС является тест открытого поля. Результаты многочисленных исследований, в которых применяли 400–600 мг/кг ВК в период беременности

крыс, показали, что стереотипное поведение грызунов усиливается [48, 52]. Также наблюдается понижение исследовательского поведения. Данные локомоторной активности показывают смешанные результаты: у некоторых наблюдается усиление локомоции (гиперлокомоция), у других – снижение локомоции. Результаты исследования поведения крыс на Y-/T-образных тестах после введения 400–600 мг/кг ВК между 11,5 и 13 днями беременности показывают уменьшение спонтанной альтернации [52].

Ограничения вальпроат-индуцированной модели РАС

С момента создания первой модели на грызунах в 1970-х годах ВК широко используется для изучения этиологии и патогенеза РАС. Основным преимуществом данных моделей является то, что у животных, подвергшихся воздействию ВК, развивается устойчивый фенотип, напоминающий основные симптомы пациентов с РАС. Простые экспериментальные протоколы позволяют широко использовать данную модель для изучения патофизиологии РАС от молекулярно-клеточного до поведенческого уровней на протяжении десятилетий. Более того, поскольку ВК является ингибитором гистоновой деацетилазы, животные модели ВК могут помочь понять эпигенетическую основу этиологии РАС. Однако данная модель также имеет некоторые ограничения: во-первых, воздействие ВК является одним из многих экологических факторов риска РАС, во-вторых, пациенты с РАС, подвергшиеся воздействию ВК по материнской линии, представляют собой небольшую популяцию пациентов с РАС. Таким образом, патофизиология, вызванная ВК, может составлять часть целостной картины РАС. Тем не менее, поскольку патофизиология, вызванная ВК, имеет некоторое сходство с генетическими моделями РАС, например, синаптопатией [53], данные, полученные на этой модели, могут быть использованы для тестирования и скрининга фармакологических препаратов [54].

Поступила 28.12.23

ԱՌՆԻՔԻ սպեկտրի խանգարումների վաղադրությամբ մակաձված մոդել

Կ. Ս. Ֆերեշեյան

ԱՌՆԻՔԻ սպեկտրի խանգարումը նյարդային համակարգի զարգացման խանգարում է, որը բնութագրվում է սոցիալական հաղորդակցության և փոխազդեցության խանգարումներով, ինչպես նաև կրկնվող և կարծրատիպային վարքագծով: Ի լրումն ուժեղ գենետիկ բաղադրիչի, շրջակա միջավայրի գործոնները, ներառյալ տոքսինները, վարակները և դեղամիջոցները, հայտնի

են որպես ռիսկի գործոններ՝ հավանաբար առաջացնելով էպիգենետիկ փոփոխություններ: Մասնավորապես ապացուցվել է, որ հղիության ընթացքում վալպրոյաթթվի օգտագործումը մեծացնում է երեխաների մոտ աուտիզմի վտանգը: Վալպրոյաթթվի կիրառումը հղի կենդանիների մոտ աուտիզմի սպեկտրի խանգարումների հաստատված կենդանական մոդել է: Այս մոդելը կարող է ավելի լավ ներկայացնել իդիոպաթիկ աուտիզմի բազմաթիվ դեպքեր, քան տրանսգենային մոդելները, որոնք կրում են աուտիզմի հետ կապված առանձին գեների մուտացիաներ: Կենդանական մոդելը կարևոր է աուտիստիկ վարքագծի հիմքում ընկած նյարդակենսաբանական խանգարումների ուսումնասիրության և նոր թերապևտիկ նյութերի գնահատման համար: Այս հոդվածը վերանայում է վալպրոյաթթվով մակածված աուտիզմի կենդանական մոդելը՝ ընդգծելով դրա կարևորությունն ու հուսալիությունը՝ որպես աուտիզմի ոչ տրանսգենային մոդել:

Valproic acid induced model of autism spectrum disorders

K.S. Fereshetyan

Autism is a neurodevelopmental disorder characterized by impairments in social communication and interaction and by repetitive patterns of behavior. While autism has a strong genetic component, environmental factors including toxins, infection and drugs are known to confer autism susceptibility, likely by inducing epigenetic changes. In particular, exposure to valproic acid (VPA) during pregnancy has been demonstrated to increase the risk of autism in children. Prenatal administration of valproic acid has become an accepted animal model of ASD. This model might better represent the many cases of idiopathic autism which are of environmental/epigenetic origins than do transgenic models carrying mutations in single autism-associated genes. The VPA model provides a valuable tool to investigate the neurobiology underlying autistic behavior and to screen for novel therapeutics. Here we review the VPA-induced rodent model of autism, highlighting its importance and reliability as an environmentally induced animal model of autism.

Литература

1. Ashwood, P., & van de Water, J. (2004). Is autism an autoimmune disease? *Autoimmunity Reviews*, 3(7–8), 557–562. <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2004.07.036>
2. Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.-L., Tyzio, R., & Khazipov, R. (2007). GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. *Physiological Reviews*, 87(4), 1215–1284. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2006>
3. Bourgeron, T. (2007). The Possible Interplay of Synaptic and Clock Genes in Autism Spectrum Disorders. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72(1), 645–654. <https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.020>
4. Bringas, M. E., Carvajal-Flores, F. N., López-Ramírez, T. A., Atzori, M., & Flores, G. (2013). Rearrangement of the dendritic morphology in limbic regions and altered exploratory behavior in a rat model of autism spectrum disorder. *Neuroscience*, 241, 170–187. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2013.03.030>

5. *Cannell, J. J.* (2008). Autism and vitamin D. *Medical Hypotheses*, 70(4), 750–759. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2007.08.016>
6. *Catalani, A., Sabbatini, M., Consoli, C., Cinque, C., Tomassoni, D., Azmitia, E., Angelucci, L., & Amenta, F.* (2002). Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(5), 481–490. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796133>
7. *Chaliha, D., Albrecht, M., Vaccarezza, M., Takechi, R., Lam, V., Al-Salami, H., & Mamo, J.* (2020). A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. *Developmental Neuroscience*, 42(1), 12–48. <https://doi.org/10.1159/000509109>
8. *Chapman, A. G., Riley, K., Evans, M. C., & Meldrum, B. S.* (1982). Acute effects of sodium valproate and gamma-vinyl GABA on regional amino acid metabolism in the rat brain: incorporation of 2-[14C] glucose into amino acids. *Neurochemical Research*, 7(9), 1089–1105. <https://doi.org/10.1007/bf00964888>
9. *Chomiak, T., Karnik, V., Block, E., & Hu, B.* (2010). Altering the trajectory of early postnatal cortical development can lead to structural and behavioural features of autism. *BMC Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-102>
10. *Christensen, J., Grønberg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., & Vestergaard, M.* (2013a). Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. *JAMA*, 309(16), 1696. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>
11. *Christensen, J., Pedersen, L., Sun, Y., Dreier, J. W., Brikell, I., & Dalsgaard, S.* (2019). Association of Prenatal Exposure to Valproate and Other Antiepileptic Drugs With Risk for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Offspring. *JAMA Network Open*, 2(1), e186606. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2018.6606>
12. *Clancy, B., Finlay, B. L., Darlington, R. B., & Anand, K. J. S.* (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*, 28(5), 931–937. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.01.014>
13. *Cohen, M. J., Meador, K. J., Browning, N., Baker, G. A., Clayton-Smith, J., Kalayjian, L. A., Kanner, A., Liporace, J. D., Pennell, P. B., Privitera, M., & Loring, D. W.* (2011). Fetal antiepileptic drug exposure: Motor, adaptive, and emotional/behavioral functioning at age 3 years. *Epilepsy & Behavior*, 22(2), 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2011.06.014>
14. *Connolly, A. M., Chez, M., Streif, E. M., Keeling, R. M., Golumbek, P. T., Kwon, J. M., Riviello, J. J., Robinson, R. G., Neuman, R. J., & Deuel, R. M. K.* (2006). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Autoantibodies to Neural Antigens in Sera of Children with Autistic Spectrum Disorders, Landau-Kleffner Syndrome, and Epilepsy. *Biological Psychiatry*, 59(4), 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.07.004>
15. *Durand, C. M., Perroy, J., Loll, F., Perrais, D., Fagni, L., Bourgeron, T., Montcouquiol, M., & Sans, N.* (2012). SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Molecular Psychiatry*, 17(1), 71–84. <https://doi.org/10.1038/MP.2011.57>
16. *Fouquier, J., Huizar, N. M., Donnelly, J., Glickman, C., Kang, D.-W., Maldonado, J., Jones, R. A., Johnson, K., Adams, J. B., Krajmalnik-Brown, R., & Lozupone, C.* (2021). The Gut Microbiome in Autism: Study-Site Effects and Longitudinal Analysis of Behavior Change. *MSystems*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00848-20>
17. *Freitag, C. M.* (2007). The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Molecular Psychiatry*, 12(1), 2–22. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001896>
18. *Garcia, K. L. P., Yu, G., Nicolini, C., Michalski, B., Garzon, D. J., Chiu, V. S., Tongiorgi, E., Szatmari, P., & Fahnestock, M.* (2012). Altered Balance of Proteolytic Isoforms of Pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor in Autism. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 71(4), 289–297. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31824b27e4>
19. *Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Baronio, D., Zanatta, G., Silvestrin, R. B., Vaccaro, T., & Riesgo, R.* (n.d.). Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model. <https://doi.org/10.5772/54824>

20. Guang, S., Pang, N., Deng, X., Yang, L., He, F., Wu, L., Chen, C., Yin, F., & Peng, J. (2018). Synaptopathology involved in autism spectrum disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 470. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00470/BIBTEX>
21. Harden, C. L. (2013). In utero valproate exposure and autism: long suspected, finally proven. *Epilepsy Currents*, 13(6), 282–284. <https://doi.org/10.5698/1535-7597-13.6.282>
22. Hashimoto, K., Iwata, Y., Nakamura, K., Tsujii, M., Tsuchiya, K. J., Sekine, Y., Suzuki, K., Minabe, Y., Takei, N., Iyo, M., & Mori, N. (2006). Reduced serum levels of brain-derived neurotrophic factor in adult male patients with autism. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30(8), 1529–1531. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.06.018>
23. Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., & Bourgeron, T. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*, 34(1), 27–29. <https://doi.org/10.1038/ng1136>
24. Johnston, M. v. (2004). Clinical disorders of brain plasticity. *Brain and Development*, 26(2), 73–80. [https://doi.org/10.1016/S0387-7604\(03\)00102-5](https://doi.org/10.1016/S0387-7604(03)00102-5)
25. Jung, G. A., Yoon, J. Y., Moon, B. S., Yang, D. H., Kim, H. Y., Lee, S. H., Bryja, V., Arenas, E., & Choi, K. Y. (2008). Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK-p21Cip/WAF1 pathway. *BMC Cell Biology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-9-66>
26. Kang, J., & Kim, E. (2015). Suppression of NMDA receptor function in mice prenatally exposed to valproic acid improves social deficits and repetitive behaviors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8(MAY), 17. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2015.00017/ABSTRACT>
27. Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., & Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(1), 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>
28. Kern, J. K., & Jones, A. M. (2006). Evidence of Toxicity, Oxidative Stress, and Neuronal Insult in Autism. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 9(6), 485–499. <https://doi.org/10.1080/10937400600882079>
29. Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 149–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
30. Kuo, H. Y., & Liu, F. C. (2018). Molecular pathology and pharmacological treatment of autism spectrum disorder-like phenotypes using rodent models. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 422. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00422/BIBTEX>
31. Li, Q., Li, Y., Liu, B., Chen, Q., Xing, X., Xu, G., & Yang, W. (2022). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children and Adolescents in the United States From 2019 to 2020. *JAMA Pediatrics*, 176(9), 943–945. <https://doi.org/10.1001/JAMAPEDIATRICS.2022.1846>
32. Livingston, L. A., & Happé, F. (2017). Conceptualising compensation in neurodevelopmental disorders: Reflections from autism spectrum disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 80, 729–742. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2017.06.005>
33. Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, 392(10146), 508–520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)
34. Mabunga, D. F. N., Gonzales, E. L. T., Kim, J.-W., Kim, K. C., & Shin, C. Y. (2015). Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 285–300. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>
35. Maenner, M. J., Shaw, K. A., Baio, J., Washington, A., Patrick, M., DiRienzo, M., Christensen, D. L., Wiggins, L. D., Pettygrove, S., Andrews, J. G., Lopez, M., Hudson, A., Baroud, T., Schwenk, Y., White, T., Rosenberg, C. R., Lee, L. C., Harrington, R. A., Huston, M., ... Dietz, P. M. (2020). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network,

- 11 Sites, United States, 2016. MMWR. Surveillance Summaries, 69(4), 1–12. <https://doi.org/10.15585/MMWR.SS6904A1>
36. Miyazaki, C., Matsuyama, K., Goto, S., & Ichikawa, M. (1988). Effect of Sodium Valproate (VPA) on Cerebral Amino Acids: Mechanism of γ -Aminobutyric Acid (GABA) Elevation and Possible Causal Relation of VPA-Induced Encephalopathy and Glutamine Level. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36(9), 3589–3594. <https://doi.org/10.1248/cpb.36.3589>
37. Moldrich, R. X., Leanage, G., She, D., Dolan-Evans, E., Nelson, M., Reza, N., & Reutens, D. C. (2013). Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behavioural Brain Research*, 257, 253–264. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2013.09.049>
38. Morakotsriwan, N., Wattanathorn, J., Kirsattayakul, W., & Chaisiwamongkol, K. (2016). 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. <https://doi.org/10.1155/2016/3206561>
39. Mychasiuk, R., Richards, S., Nakahashi, A., Kolb, B., & Gibb, R. (2012). Effects of Rat Prenatal Exposure to Valproic Acid on Behaviour and Neuro-Anatomy. *Developmental Neuroscience*, 34(2–3), 268–276. <https://doi.org/10.1159/000341786>
40. Ng, M., de Montigny, J. G., Ofner, M., & Do, M. T. (2017). Environmental factors associated with autism spectrum disorder: a scoping review for the years 2003–2013. *Health Promotion and Chronic Disease Prevention in Canada: Research, Policy and Practice*, 37(1), 1. <https://doi.org/10.24095/HPCDP.37.1.01>
41. Nicolini C., Ahn Y., Michalski B., Rho J.M., Fahnestock M.. (2015). “Decreased mTOR signaling pathway in human idiopathic autism and in rats exposed to valproic acid” *Acta neuropathologica communications*, vol.3, no.1, p. 3. doi: 10.1186/S40478-015-0184-4/TABLES/3
42. Pizzarelli, R., & Cherubini, E. (2011). Alterations of GABAergic signaling in autism spectrum disorders. *Neural Plasticity*, 2011, 297153. <https://doi.org/10.1155/2011/297153>
43. Raza, S., Harker, A., Richards, S., Kolb, B., & Gibb, R. (2015). Tactile stimulation improves neuroanatomical pathology but not behavior in rats prenatally exposed to valproic acid. *Behavioural Brain Research*, 282, 25–36. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2014.12.055>
44. Reynolds, S., Millette, A., & Devine, D. P. (2012). Sensory and motor characterization in the postnatal valproate rat model of autism. *Developmental Neuroscience*, 34(2–3), 258–267. <https://doi.org/10.1159/000336646>
45. Rinaldi, T. (2008). Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic acid animal model of autism. *Frontiers in Neural Circuits*, 2(OCT), 4. <https://doi.org/10.3389/neuro.04.004.2008>
46. Rinaldi, T., Kulangara, K., Antonello, K., & Markram, H. (2007). Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation induced by prenatal exposure to valproic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), 13501–13506. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704391104>
47. Romoli, M., Mazzocchi, P., D'Alonzo, R., Siliquini, S., Rinaldi, V. E., Verrotti, A., Calabresi, P., & Costa, C. (2019). Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *Current Neuropharmacology*, 17(10), 926–946. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666181227165722>
48. Rossignol, D. A., Genuis, S. J., & Frye, R. E. (2014). Environmental toxicants and autism spectrum disorders: a systematic review. *Translational Psychiatry*, 4(2), e360. <https://doi.org/10.1038/TP.2014.4>
49. Roulet, F. I., Lai, J. K. Y., & Foster, J. A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism - A current review of clinical and animal studies. In *Neurotoxicology and Teratology* (Vol. 36, pp. 47–56). <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.004>

50. Satterstrom, F. K., Kosmicki, J. A., Wang, J., Breen, M. S., de Rubeis, S., An, J. Y., Peng, M., Collins, R., Grove, J., Klei, L., Stevens, C., Reichert, J., Mulhern, M. S., Artomov, M., Gerges, S., Sheppard, B., Xu, X., Bhaduri, A., Norman, U., ... Buxbaum, J. D. (2020). Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell*, 180(3), 568-584.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.036>
51. Schmunk, G., & Gargus, J. J. (2013). Channelopathy pathogenesis in autism spectrum disorders. *Frontiers in Genetics*, 4(NOV). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2013.00222>
52. Schneider, T., & Przewlocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
53. Sharma, S. R., Gonda, X., & Tarazi, F. I. (2018). Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 190, 91–104. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2018.05.007>
54. Taleb, A., Lin, W., Xu, X., Zhang, G., Zhou, Q. G., Naveed, M., Meng, F., Fukunaga, K., & Han, F. (2021). Emerging mechanisms of valproic acid-induced neurotoxic events in autism and its implications for pharmacological treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111322. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111322>
55. Tang, G., Gudsnek, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio, O., Peterson, B. S., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J., & Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron*, 83(6), 1482. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2014.09.001>
56. Wagner, G. C., Reuhl, K. R., Cheh, M., McRae, P., & Halladay, A. K. (2006). A new neurobehavioral model of autism in mice: Pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 36(6), 779–793. <https://doi.org/10.1007/s10803-006-0117-y>
57. Watts, T. J. (2008). The Pathogenesis of Autism. *Clinical Medicine. Pathology*, 1, 99. <https://doi.org/10.4137/CPATH.S1143>
58. Yenkovyan, K., Grigoryan, A., Fereshetyan, K., & Yepremyan, D. (2017). Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Behavioural Brain Research*, 331, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.038>