

## Encefalopatiile mitocondriale, particularități clinico-diagnostice

### Mitochondrial encephalopathies, clinical and diagnostic features

Hadjiu S.<sup>1</sup>, Călcâi C.<sup>1,2</sup>, Revenco N.<sup>1,2</sup>, Iliciuc I.<sup>1</sup>

#### REZUMAT

---

**Rezumat:** Lucrarea reflectă modalitățile de diagnostic ale bolilor mitocondriale la copii. S-a constatat că la copiii cu multiple episoade de accident vascular cerebral, în teritorii vasculare diferite, precum și modificări radioimagistice caracteristice, crize convulsive, deficit motor, hipostatură, afecțiuni gastrointestinale, cardiace, oftalmologice, trebuie inițiate testele de laborator în vederea unor sindroame de deficit al mitocondriilor, în special sindromul MELAS. Prezența fibrelor roșii în mușchiul scheletic și determinările biochimice caracteristice defectelor mitocondriale susțin diagnosticul. Testele genetice moleculare privind modificările ADN-ului mitocondrial vor confirma diagnosticul. Trebuie acordat sfatul genetic atunci când există certitudinea unor mutații în ADN-ul mitocondrial.

**Cuvinte cheie:** EÎM – erori înnăscute de metabolism, EM – encefalopatii mitocondriale, BM – boli mitocondriale, mt - mitocondrii.

#### ABSTRACT

---

**Abstract:** This paper reflects diagnostic criteria of mitochondrial diseases in children. It was noted that in children with multiple stroke – like episodes and neuroimaging changes, seizures, motor deficit, short stature, gastrointestinal, cardiac and ophthalmic disorders, laboratory testing should be initiated to recognize mitochondrial deficiency syndromes, particularly MELAS syndrome. The presence of red fibers in skeletal muscles and characteristic biochemical changes of mitochondrial defects support the diagnosis. Molecular genetic tests on mitochondrial DNA modifications will confirm the diagnosis. Genetic counseling should be given when there are mutations in mitochondrial DNA.

**Keywords:** IEM - inborn errors of metabolism, EM - mitochondrial encephalopathy, MD - mitochondrial disease, mt - mitochondria.

#### ÎNTRUCERE.

BM fac parte din domeniul EÎM care sunt rare ca entități individuale, dar împreună realizează un grup variat și vast de afecțiuni. În prezent, sunt recunoscute peste 6000 tulburări metabolice ereditare rare. [12] Deși întâlnite rar la copii, EÎM sunt cele mai complexe probleme cu care trebuie să se confrunte pediatria și alte domenii de specialitate. Complexitatea derivă din sindroamele clinice care se repetă în cadrul diferitor erori metabolice și multitudinea crescândă a defectelor biochimice identificate. Defectele specifice pot conduce la un spectru larg de manifestări clinice cu debut

la vârste diferite. [13] Diferitor vârste le corespund diferite metode de diagnosticare. Examinările de bază care definesc evaluarea metabolismului includ: analiza nivelului glucozei, lactatului, amoniului, aminoacizilor din plasmă și lichid cefalo-rahidian, aprecierea nivelului acidului uric, rezonanța magnetică nucleară cerebrală (poate sugera prezența citopatiilor mitocondriale). În multe din cazuri sunt necesare teste biochimice și moleculare sofisticate pentru stabilirea unui diagnostic precis, care nu sunt, însă, disponibile tuturor, iar disponibilitatea acestora uneori este combătută de costul investigațiilor respective. Iată de ce această problemă este mai puțin discutată și mai puțin abordată din punct de vedere cli-

---

1 Departamentul Pediatrie, Clinica neuropediatrie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, 2IMSP ICȘDOSMC, Chișinău, Republica Moldova

---

1 Department of Pediatrics, Neuropediatric Clinic, State University of Medicine and Pharmacy „Nicolae Testemițanu”, Hospital of Mother and Child Health Care, Chisinau, Moldova

nico-paraclinic la noi în republică, stabilirea diagnosticului constituind o cale destul de prodigioasă. Cu toate acestea, diagnosticul precoce al EÎM este indispensabil având în vedere sechelele și consecințele nefaste pe care le pot avea acestea în rezultatul implicării ireversibile a SNC, dar și a altor organe de importanță vitală. În țările dezvoltate din punct de vedere economic este posibil diagnosticul prenatal al multor boli metabolice înăscute, prin demonstrarea defectului enzimatic primar în țesutul fetal, și prin evidențierea acumulării metaboliților sau produselor de stocaj macromoleculari în lichidul amniotic sau în celulele fetale. Cercetări recente au relevat că diagnosticul EÎM este important din următoarele motive: unele (fenilcetonuria) beneficiază de tratament specific, iar copiii cu aceste afecțiuni au șanse crescute de supraviețuire; diagnosticul tardiv antrenează sechele neurologice ireversibile; pentru părinți și rude diagnosticul este necesar în aplicarea sfatului genetic; nașterea unui copil bolnav poate fi prevenită prin contracepție. Este evident, că pentru soluționarea problemei se cer căi științifice noi de acces, cu aplicarea metodelor moderne de examinare. S-a demonstrat că tehnologiile avansate de studiu precoce al ADN-ului fetal (săptămâna a 10-a) tind să înlocuiască diagnosticul prenatal al EÎM prin amniocenteză. Un diagnostic corect va permite selectarea unui tratament corect și, astfel, vindecării copilului, la etapa când EÎM nu a avut un impact ireversibil. [14] Diagnosticul precoce al EÎM poate preveni progresia bolii până la sechele severe. Diagnosticul precoce lărgeste, de asemenea, fereastra terapeutică pentru diagnosticul prenatal pentru sarcinile ulterioare. Pentru ca acest lucru să fie posibil, medicul clinician trebuie să fie conștient de posibilitatea prezenței unei boli metabolice ca, cauză principală a unui spectru variat de simptome clinice. Postnatal depistarea la timp a afecțiunilor neuro-metabolice, în special a BM este importantă pentru profilaxia complicațiilor grave din partea SNC și ameliorarea invalidității infantile. În prezent se lucrează intens în sensul terapiei de substituție enzimatică și, în cele din urmă, există o speranță în ceea ce ține de terapia genică. Astfel, unele EÎM care nu pot fi tratate la etapa actuală pot deveni tratabile în viitor. [15, 16, 17]

## SCOPUL LUCRĂRII

Este de a scoate în evidență importanța EM din perspectiva unui diagnostic precoce și necesitatea abordării unui tratament timpuriu și individualizat. Realizarea scopului se va efectua în baza studiilor și constatărilor

retrospective și pe exemplul unui lot de pacienți evaluați eredo-colateral și clinico-paraclinic, cu urmărirea dinamicii ulterioare a acestora, pe fon de tratamente specifice, cu decelarea eventualelor consecințe asupra neurodezvoltării și calității vieții copiilor.

## MATERIALE ȘI METODE

Studiul a vizat 6 copii cu vârsta cuprinsă între 1 și 10 ani suspecți pentru diferite forme de BM, internați în Clinica de Neurologie a IMSP IMC. Conform unei scheme standardizate s-a putut urmări vârsta de debut a BM, istoricul eredo-colateral, cele mai frecvente tulburări neurologice asociate acestora, cele mai frecvente forme de epilepsii întâlnite, anomaliiile neuro-imagistice relevate, evoluția și pronosticul pe fonul tratamentului, gradul de mortalitate. În lotul de pacienți studiat s-a observat o prevalență a EM asociate cu diverse tulburări din partea SNC la sexul masculin, în raport de 3:1 (4 băieți – 66,6% și 2 fete – 33,4%). Au fost efectuate teste de laborator, inclusiv: creatinina serică, creatinin chinaza, lactatul seric, EMG, CT cerebrală, RMN cerebrală. Examenul imagistic cerebral a fost efectuat pentru a confirma prezența procesului de demielinizare extensiv, fiind prezentat de un semnal de intensitate înaltă implicând atât substanța subcorticală cât și substanța albă a creierului. Studiul s-a bazat în principal pe semnele clinice caracteristice, plus RMN și biopsia musculară.

## REZULTATE

Debutul acut al BM în lotul de studiu s-a observat a avea loc în perioada de nou-născut – 3 copii (50%), sugar – 2 copii (33,4%), în perioada de antepreșcolar la 1 copil. În rezultatul colectării datelor eredo-colaterale, pentru fiecare caz în parte, s-a constatat prezența anamnesticalui eredocolateral agravat 66,7% cazuri (4 copii), restul – 33,3% (2 copii), având anamnesic incert sau neagrav. Conform unor date din literatură EM se caracterizează prin următoarele sindroame clinice [4] (*tab 1.*).

Pacienții din studiu au fost clasificați în funcție de fenotipul lor clinic în felul următor : sindromul MELAS – 2 copii, sindromul NARP – 1 copil, sindromul MERRF – 1 copil, sindromul Leigh – 1 copil, sindromul Kearns-Sayre – 1 copil.

Dintre manifestările neurologice comune prezente la copiii din lotul de studiu s-au constatat simptome

Tabelul 1. Sindroamele de bază în EM (conform S. Ilarișchin).

Sindrom clinic	Vârsta de debut	Simptome	Date de laborator
MELAS	5-20 ani	accese pseudoictale, accese migrenoase, vome, convulsii, ataxie, degenerescenta retinei, surditate neurosenzorială, hipostatură, diabet, cardiomiopatie	acidoză lactică
MERRF	În a doua decadă a vieții	epilepsie mioclonică, ataxie, demență, miopatie, hipoacuzie neurosenzorială, retard în dezvoltarea fizică	
NARP	La orice vârstă	neuropatie (preponderant senzomotorie); sunt prezente: ataxie, degenerescentă pigmentară a retinei, demență, retard în dezvoltarea fizică	acidoză lactică
Kearns-Sayre	În prima decadă a vieții	miopatie, cardiomiopatie, bloc atrioventricular, ataxie, oftalmoplegie externă, degenerescentă pigmentară a retinei, hipoacuzie neurosenzorială, tulburari endocrine	LCR proteina (> 1 g/l)
Leber	În decada a doua a treia a vieții	pierderea vederii acută (subacută), rar: distonie, polineuropatie, pareze spastice, deformația scheletului	acidoză lactică
Leigh	În jurul vârstei de un an	semne de afectare a trunchiului cerebral, paralizie de nervi cranieni, nistagmus, sindrom piramidal, extrapiramidal cu evoluție progresivă, tulburări respiratorii (apnee sau polipnee)	acidoză lactică

neurologice (retard neuropsihic, accese pseudoictale, cefalee, vomă, tulburări de tonus, tulburări de motricitate, tulburări de personalitate și comportament, tulburări auditive, tulburări vizuale, slăbiciuni etc.) și extra-neurologice (hipostatură, cardiopatie hipertrofică, retard fizic, tulburări endocrine, anemie ferodeficitară, acidoză lactică). Principalele manifestări neurologice și extraneurologice sunt rezumate în tabelul 2.

La copiii cu crize epileptice au fost observate următoarele tipuri de crize: mioclonice – 1 copil, tonico-clonice – 1 copil, atonice – 1 copil. Printre manifestările clinice extraneurologice s-au întâlnit și hepato-splenomegalia la 2 copii, trasături caracteristice ale aspectului exterior la 2 copii, simptome digestive la 2 copii, cardiomiopatie la 2 copii, aritmie cardiacă la 1 copil.

Rezultatele studiului efectuat demonstrează că cele mai frecvente manifestări neurologice la copiii din lotul de studiu au fost: retardul neuropsihic, accesele pseudoictale, ataxia, hipoacuzia senzorială, retinită pigmentară, demența, iar printre cele extraneurologice cele mai frecvente s-au înregistrat: cardiopatia hipertrofică, hipostatură, acidoză lactică, retardul fizic.

La toți copiii s-au efectuat următoarele investigații: hemoleucograma, examenul biochimic complet, sumarul urinei, ECG. Toți copiii au beneficiat de consultul neurologului și geneticianului. Consultația oftalmologului s-a efectuat la toți copiii, audiografia la 3 copii, consultația cardiologului la 2 copii, consultația hematologului la 1 copil și gastrologului la 2 copii. Examenul suplimentar efectuat au fost USG abdominală, RMN cerebrală, CT cerebrală, radiografia

scheletului, USG al aparatului renourinar, ecocardiografia. Trei copii au beneficiat de EEG cu inducere în somn. Printre examenele cu aspect neurologic cităm datele expuse în tab. 3.

Datele expuse în tabelul 3 relatează cele mai informative metode de diagnostic care au fost utilizate

Tabelul 2 - Manifestările neurologice și extra-neurologice la copiii din lotul de studiu

Semne neurologice:	Caz I	Caz II	Caz III	Caz IV	Caz V	Caz VI
Sindroame de bază	MELAS	NARP	MERRF	Kearns-Sayre	MELAS	Leigh
Retard neuropsihic	+	-	+	-	+	-
Accese pseudoictale	+	-	-	-	+	-
Cefalee, vomă	-	-	-	-	+	-
Convulsii	+	-	+	-	+	-
Afectarea trunchiului cerebral	+	-	-	-	-	+
Pierderea auzului tip sensorial	+	-	+	+	-	-
Paralizie de nervi cranieni	-	-	-	-	-	+
Nistagmus	-	-	-	-	-	+
Sindrom piramidal	-	-	-	-	-	+
Sindrom extrapiramidal (distonie)	-	-	-	-	-	+
Ataxie	-	+	+	+	+	+
Retinită pigmentară	-	+	-	+	-	-
Epilepsie mioclonică	-	-	+	-	-	-
Demență	-	+	+	-	-	-
<b>Semne extraneurologice:</b>						
Tulburări respiratorii (apnee sau polipnee)	-	-	-	-	-	+
Hipostatură	+	-	-	-	+	-
Retard fizic	-	+	+	-	-	-
Cardiopatie hipertrofică	-	-	-	+	+	-
Tulburări endocrine	+	-	-	-	+	-
Anemie ferodeficitară		-	-	-	+	-
Acidoză lactică	+	+	-	+	+	+

Tabelul 3 – Investigații paraclinice în lotul studiat

Investigații paraclinice:	Cazul I (MELAS)	Cazul II (NARP)	Cazul III (MERRF)	Cazul IV (Kearns)	Cazul V (MELAS)	Cazul VI (Leigh)
B i o p s i a musculară	Fibre musculare roșii în lambouri	Distrofie lipidică intracelulară	Fibre musculare roșii în lambouri	Fibre musculare roșii în lambouri	Fibre musculare roșii în lambouri	-
EMG	Potențiale mio-patice	Semne de neuropatie periferică senzomotorie	Fără modificări esențiale	Fără modificări esențiale	Potențiale mio-patice	Fără modificări esențiale
RMN	Focar hipodens în proiecția lobului parietal pe dreapta de tip ischemic, atrofie corticală cu dilatare ventriculară moderată	Zone hiperintense la nivelul Ganglionilor bazali și a trunchiului	Calcificări în ganglionii bazali	Atrofie corticală cu dilatare ventriculară moderată	Focar hipodens în proiecția lobului parietal pe dreapta de tip ischemic.	Leziuni chistice simetrice și glioză cortexului, ganglionilor bazali și a cerebelului cu hipomielinizare incompletă
Biochimia	Lactacidoză	Lactacidoză		Lactacidoză, hiperpiruvatemie	Lactacidoză	Lactacidoză (și în LCR), piruvatemie (și în LCR), hiperalaninemie, hiperamoniemie

la copiii din lotul de studiu. În patru cazuri, biopsia musculară a relevat prezența fibrelor musculare roșii în lambouri. Pe traseele EMG, în două cazuri, s-au observat potențiale miopatică, în unul din cazuri semne de neuropatie periferică. La examenul prin RMN, în două cazuri, s-au depistat focare hipodense, în două cazuri - atrofie corticală, în unul din cazuri s-au constatat zone hiperintense la nivelul ganglionilor bazali și a trunchiului cerebral, în alt caz - calcificări în ganglionii bazali, iar în ultimul caz - leziuni chistice simetrice și glioză cortexului, ganglionilor bazali și a cerebelului cu hipomielinizare incompletă. Analiza de laborator a atestat lactacidoză în cinci din cazuri și hiperpiruvatemie în două cazuri. Raport lactat/piruvat în LCR este unul din examinările esențiale în caz de suspectare a BM, ca și prelevare de biotat tisular - pentru aprecierea modificărilor specifice tisulare.

Tratamentul copiilor din lotul de studiu a fost unul simptomatic - în 100%. Doar 1 copil a manifestat răspuns terapeutic satisfăcător la preparatele antiepileptice convenționale, iar 2 copii au manifestat răspuns terapeutic slab la acestea (cu reducerea crizelor epileptice cu <50%). Toți copiii au fost suplimentați cu cofactorul tiamină, carnitină și acid lipoic, ca și standard al terapiei medicale. Leziunile cerebrale au fost comune pentru toate BM ceea ce limitează recuperarea funcției normale cerebrale. Corectarea acidozei este indicată atunci când aceasta este ridicată, însă nu remite toate simptomele. 2 copii au manifestat răspuns terapeutic satisfăcător după administrarea de Cofac-

tor de Piridoxină, iar 1 copil - după Acidul folic, rezultatul copiilor nu au manifestat răspuns terapeutic la nici una dintre măsurile terapeutice întreprinse.

În toate cazurile studiate prognosticul a fost unul rezervat în legătură cu retardul mintal și psiho-motor asociat.

## DISCUȚII

BM fac parte din grupul EÎM, sunt patologii asociate cu tulburări multisistemice caracterizate prin defecte mitocondriale biochimice și genetice având o transmitere ereditară datorate tulburării funcției lanțului respirator oxido-reductor de la nivelul membranei mitocondriale interne. [1, 3, 9, 10] EM sunt rar întâlnite în practica medicală cu o simptomatologie variată și reprezintă o problemă diagnostică majoră.

Noțiunea EÎM este introdusă inițial de Archibald Garrod (1902-1908), acesta definindu-le ca pe un grup, ce întrunește o sumă de maladii variate, consecutive unor abateri de la desfășurarea normală a diferitor procese metabolice în care sunt implicați: aminoacizi, hidrocarburați, lipide, pigmenți, săruri minerale, vitamine, mitocondriile etc. [14, 18, 19]

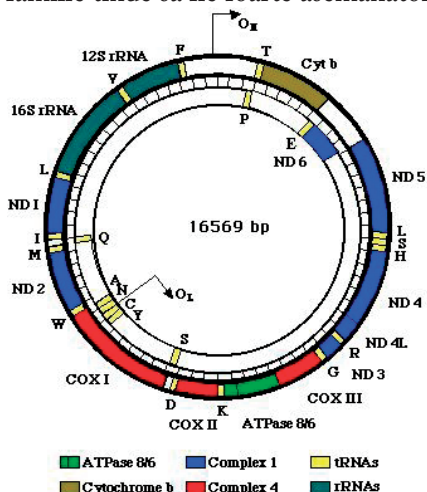
Funcționarea mitocondrii în condiții normale presupune integritatea tuturor structurilor ei componente și un echilibru funcțional, care admite mici variații, fără ca acestea să pericliteze starea de normalitate a organitului. Pentru îndeplinirea rolului său în celulă, mitocondria trebuie să se afle într-o



permanentă interacțiune cu citosolul și, implicit, cu celelalte componente celulare.

Mitocondriile pot fi considerate sediile energetice ale celulei deoarece generează cea mai mare parte a cantității de ATP. Numărul de mitocondrii dintr-o celulă depinde de necesarul energetic al acesteia, în celulele musculare, spre exemplu, numărul mitocondriilor fiind foarte mare. Aceste organite sunt indispensabile celulei atât pentru aportul energetic, cât și pentru rolul pe care îl joacă în moartea programată a celulei. [20, 21]

Fiecare mitocondrie din fiecare celulă conține mai multe copii de molecule ADN circulare, dublu-catenare (ADNmt) care conțin gene ce codifică sinteza de ARN ribozomal și diverse ARNmt necesare pentru biosinteza mitocondrială de proteină, precum și a unora dintre proteinele implicate în transportul de electroni mitocondriali (Fig. 1). Genomul mitocondrial constă din 16.569 de perechi de baze, care cuprind 5.523 codoni, care codifică producerea a 37 de produse genetice. Marea majoritate a proteinelor mitocondriale, inclusiv cele mai multe subunități proteice implicate în transportul de electroni, sunt codificate de gene nucleare. Mutațiile acestor gene cauzează maladii cu transmitere autozomal recesivă, în care fenotipul bolii la diferite persoane afectate din aceeași familie tinde să fie foarte asemănător.



**Figura 1.** Genomul mitocondrial uman. Identitatea și locațiile relative ale diferitelor gene mitocondriale.

Mitocondriile în celulele fiecărui individ sunt derivate din momentul concepției de la mitocondriile din citoplasma ovulului; mitocondriile și ADNmt din spermatozoid se pierd în timpul procesului de fertilizare. Rezultă că mutațiile ADNmt sunt, de asemenea, moștenite numai de la mamă. Atunci când mai mulți

membri ai unei familii sunt afectați de o anumită maladie, în legătură cu moștenirea unei mutații ADNmt, modelul de moștenire posedă următorul caracter:

- Toți descendenții individului de sex feminin purtător de mutație ADNmt, pot fi considerați purtători ai mutației ADNmt, indiferent dacă sunt prezente manifestările clinice sau nu.

- Expresia fenotipică a bolii la diferiți indivizi cu mutație moștenită ADNmt, de obicei este foarte variată, atât în ceea ce privește sistemele de organe afectate cât și severitatea îmbolnăvirii.

- Moștenirea maladiilor ereditare metabolice mitocondriale de la părintele de sex masculin este exclusă.

Fiecare celulă conține cel puțin sute de mitocondrii, iar ADNmt poate afecta toate mitocondriile (homoplasmie) sau doar o fracțiune (heteroplasmie) din totalul de mitocondrii. Efectul fenotipic al fiecărei mutații în particular, depinde de severitatea mutației ADNmt, proporția de mitocondrii afectate și susceptibilitatea diferitor țesuturi la afectarea metabolismului energetic mitocondrial. Acest lucru face ca fenotipul clinic să varieze considerabil de la un individ la altul în cadrul aceleiași mutații ADNmt. O femeie sănătoasă clinic, care posedă o mutație specifică ADNmt poate produce urmași clinic complet sănătoși, în timp ce alții pot muri în copilărie fragedă, iar unii pot fi afectați de variante intermediare din punct de vedere clinic (cu retard mintal, retinita pigmentosum, ataxie). Astfel, lipsa manifestărilor clinice la una din rudele probandului sau prezența unor semne și simptome ne semnificative sau chiar diferite de cele recunoscute la proband, nu exclude posibilitatea existenței mutației la cel dintâi. Rata mutațiilor ADNmt este cu mult mai mare decât cea a ADN nuclear. [22, 23]

Afectarea mitocondrii poate avea drept cauză mutațiile la nivelul ADNului mitocondrial sau a ADNului nuclear, caz în care are de suferit toată celula.

Efectele bolilor mitocondriale pot fi destul de variate, de vreme ce distribuția ADNului defectuos poate varia de la un organ la altul. Mutațiile care la o persoană poate cauza boli de ficat pot, la alta persoană, să cauzeze o boala a creierului. În plus, severitatea defectului poate fi mare sau mică. Defectele minore produc doar intoleranța la efort, fără a cauza alte boli sau dizabilități serioase. Alte defecte au impact asupra funcționalității mitocondrii și poate avea un efect negativ asupra întregului organism. Ca o regula gene-

rală, bolile sunt cele mai grave atunci când mitocondria bolnavă e prezentă în mușchi și nervi, deoarece celulele acestora sunt cele mai mari consumatoare de energie.

Mutațiile la nivelul ADNului mitocondrial apar frecvent în mod spontan. Câteodată, enzimele care controlează duplicarea ADNului mitocondrial și care sunt codate de genele din ADNul nuclear, sunt defectuoase, cauzând apariția cu o rată crescută a mutațiilor ADNului mitocondrial. În diviziunea mitocondrială, ADNul este împărțit în mod aleator mitocondriilor noi. Se poate întâmpla astfel că, dacă numai puține dintre copiile ADNului moștenite de la mamă sunt mutante, multe dintre copiile defecte să ajungă doar în una dintre molecule. Boala mitocondrială începe să devină vizibilă atunci când numărul mitocondriilor afectate ajunge la un anumit nivel, când mai mult de jumătate din copiile ADNului mitocondrial sunt defecte, cauzând boli mitocondriale. [20, 21]

#### **Mutațiile punctiforme ale ADNmt afectează:**

- genele necesare sintezei de proteine mitocondriale, cel mai frecvent genele ARNt, consecința fiind afectarea secundară a tuturor complexelor lanțului respirator, cu excepția CII (a cărui sinteză este codificată la nivel nuclear);

- genele care codifică proteinele subunităților lanțului respirator, consecința fiind afectarea izolată a sintezei unei anumite subunități a acestuia.

**Distribuția mutațiilor:** homoplasmică (similară la nivelul tuturor țesuturilor) și heteroplasmică (variabilă, prezența ADN-ului mutant și ADN-ului normal la nivelul aceluiași țesut).

**Frecvența mutațiilor:** 6 - 17/100 000

#### **Sindroame clinice - Caracteristici generale**

- transmitere strict pe linie maternă (deoarece mitocondriile oului fecundat provin doar de la ovul, nu și de la spermatozoid) la toți decendenții, indiferent de sex;

- prezența efectului de „prag”: procentul ADN-ului mitocondrial mutant trebuie să depășească un anumit prag pentru a produce sindromul clinic;

- prezența segregării mitotice: procentul de ADNmt mutant la nivelul celulelor-fiice se poate modifica în cursul diviziunii, ceea ce poate determina modificări ale genotipului cu depășirea rapidă a pragului;

- acidoza lactică este constantă;

- proliferarea mitocondrială masivă la nivelul musculaturii striate este responsabilă de apariția unor

fibre musculare roșii care, în mod tipic, sunt negative pentru activitatea citocrom c oxidazei. [2, 3, 4, 5]

Conform datelor investigate, unele din particularitățile BM sunt:

- se întâlnesc destul de rar;

- s-a observat că majoritatea celorlți afectați au tulburări neurologice la vârstele mici;

- debutul acut al BM cu manifestări neurologice are loc preponderent în perioada de sugar;

- diagnosticul BM se stabilește, de obicei, la vârsta sugarului (copilului mic);

Având în vedere discrepanța dintre timpul de debut al bolii și perioada efectuării diagnosticului, se cere a fi evidențiate următoarele cauze ale întârzierii acestuia:

a. întârzierea recunoașterii precoce a fenotipurilor obișnuite;

b. părerea falsă că BM au tablouri clinice particulare;

c. asemănarea manifestărilor clinice cu cele întâlnite în alte afecțiuni cu care este necesar de efectuat un diagnostic diferențial: septicemia, retardul creșterii intrauterine, detresa respiratorie, vărsăturile recurente, etc.;

d. acumularea moleculelor mici exercită un efect toxic asupra sistemului nervos, fără simptomatologie și semne clinice specifice.

- lotul studiat indică că ar fi o prevalență la sexul masculin al BM asociate cu manifestări neurologice;

- în mai mult de o treime din pacienții studiați anamnestical eredo-colateral s-a dovedit a fi agravat, ceea ce demonstrează importanța acestuia în cadrul diagnosticării BM;

- epilepsiile constituie o apariție frecventă în cadrul BM, fiind cea mai frecventă dintre manifestările neurologice asociate acestora, urmată ulterior de retardul psiho-motor, tulburări de tonus și motilitate, afectarea organelor senzoriale, tulburări de personalitate și comportament;

- în majoritatea cazurilor se administrează terapia cu medicamente antiepileptice (DAE), aceasta fiind, însă, inefficientă în unele BM, precum este mitocondriopatia înăscută;

- instituirea întârziată a tratamentului antiepileptic adecvat duce la consecințe ireversibile, până la deces, în rezultatul decompensării organice și/sau adoptării unor tactici greșite terapeutice;

*Simptomele clinice apar odată cu creșterea copilului.*

- cu cât copilul este mai mic, cu atât simptomele

sunt mai puțin variate (și acestea acompaniază semnele clinice sistemice);

- în perioada de n.n., cele mai frecvente manifestări clinice ale unei EM sunt: convulsiile, apnea, vărsăturile recurente și refuzul alimentației etc.;

- în perioada de sugară se asociază: întârzierea procesului de dezvoltare, spasticitatea sau hipotonia, manifestările autistice, mișcările oculare anormale și coreoatetoză;

- în perioada de școlar se evidențiază: deteriorarea performanțelor școlare, pierderea vederii, tulburările de comportament;

- BM au o evoluție cronică și multe din ele - progresivă;

- deseori problema rămâne ascunsă („dormantă”), o altă boală sau un stres duce la perturbarea echilibrului precar, facilitând apariția simptomelor clinice;

- prognosticul în formele cronice este nefavorabil, dar mai bun în comparație cu formele precoce;

- decesul este un fenomen frecvent în rândul BM cu afectarea SNC, datorat atât severității maladiei, cât și întârzierii diagnosticului și/sau instituirii unui tratament corect.

Pentru stabilirea diagnosticului clinic s-au constatat a fi indispensabili următorii pași:

- o anamneză detaliată - cel mai important pas în suspectarea unei BM. Un istoric familial pozitiv este extrem de informativ;

- prezența tulburărilor neurologice inexplicabile: retardul mintal, paralizia cerebrală, convulsiile, retardul psiho-motor, tulburări de motilitate;

- pierderea achizițiilor dobândite anterior este sugestivă pentru o degenerescență progresivă a SNC;

- în cazul când se suspectează o EÎM sunt necesare investigații suplimentare.

Astfel, maladiile mitocondriale pot debuta la orice vîrstă. Ele evoluează variat, sunt frecvent grave, cu deces în primele luni de viață sau în cursul copilăriei uneori prelungite în cursul a mai mulți ani, cîteodată benigne. Fenotipul clinic poate prezenta elemente foarte importante pentru orientarea diagnosticului [6, 7, 9, 11].

Simptomele clinice comune în BM sunt cerebrale, musculare, cardiace și neurosenzoriale. Aceste manifestări clinice se pot grupa în sindroame bine individualizate, ca miopatiile cu oftalmoplegia externă, sindromul Kearns-Sayre, sindromul Leigh, sindromul MELAS și MERFF. Uneori simptomele clinice nu se încadrează în nici unul din sindroamele descrise.

Pot exprima afectarea preponderent la nivel de SNC și muscular, dar pot fi prezente semne de afectare și a altor organe și sisteme: sistemul osteo-articular, ficat, sistemul hematopoietic, tractul digestiv și țesutul cutanat. O citopatie mitocondrială trebuie să fie evocată în cadrul asocierii inexplicite de semne ce interesează mai multe organe ce nu au origine embriologică [7, 8, 9, 11].

BM pot debuta însă și prin tulburări ale funcției altor organe, iar după un scurt interval de timp acestor tulburări li se adaugă, inevitabil, semne de afectare neuromusculară.

Deseori manifestările clinice apărute primar în cadrul citopatiilor mitocondriale exprimă suferința unui singur organ. Nici una dintre manifestările clinice apărute la debutul bolii nu este suficientă să orienteze asupra implicării unui defect mitocondrial. Ulterior, asocierea semnelor de afectare a altor organe și sisteme impune efectuarea unor examene paraclinice ale căror rezultate pot documenta posibila disfuncție mitocondrială. Testul decisiv de diagnostic îl constituie însă analiza moleculară a ADNmt [4, 7, 11].

Sindromul MELAS (encefalopatia mitocondrială, lactat-acidoză, episoade stroke-like) ocupă unul din locurile de frunte în rândul cauzelor accidentelor vasculare acute la copii și tineri, inclusiv. S-a demonstrat, că în 17% cazuri anume ictusurile sunt cele ce apar drept manifestări aparente ale sindromului MELAS. Ulterior acestea înregistrându-se cu o frecvență de 99%, referindu-se la simptomele cardinale stadiului avansat al bolii, de rând cu simptome-complexul miopatic, fenomenul fibrelor roșii „sfâșiate” și lactacidoza. [3] Sindromul descris ca miopatie mitocondrială este moștenit strict pe linie maternă. [2, 3]

Insuficiența acută de substrate energetice, de rând cu concentrația crescută de produse ale schimbului patologic al lanțului respirator și ciclului acizilor tricarbonici stau la baza AVC-urilor la astfel de pacienți. Pe tablourile imagistice focarele sunt depistate în zona emisferelor mari (până la 80%), mai puțin în cerebel și ganglionii bazali.

În caz de suspectare a sindromului MELAS pacienților li se prelevă biopsie musculară, se evaluează nivelul de acidoză și lactat în sânge și LCR (lichid cefalo-rahidian), este indicat examenul molecular-genetic pentru evidențierea celei mai frecvente mutații punctiforme a ANDmt A3243G a genei tARNmitocondrial [tRNA(Leu)(UUR), întâlnită în peste 80% cazuri.

*Aspecte clinice:*

- debutul bolii în jurul vârstei de 15 ani cu manifestări de tip encefalopatie (cefalee migrenoasă, vărsături, episoade de tip atac vascular cerebral cu sincopă, hemiplegie, pierderea auzului);

- miopatie în decada a 5-a de viață, astenie și intoleranță la efort;

- polineuropatie senzitivă distală cu parestezii și hiporeflexie;

- cardiomiopatie în 15 % din cazuri.

*Diagnostic de laborator:* acidoză lactică, creșterea nivelului seric al CK, scăderea activității complexelor CI și CIV, leziuni multifocale corticale la RMN, EMG normal sau prezența miopatiei.

*Evoluție și prognostic:* evoluția clinică a bolii este foarte variabilă, de la cazuri asimptomatice cu dezvoltare precoce normală până la astenie musculară progresivă, acidoză lactică, disfuncție cognitivă, crize epileptice, episoade stroke-like, encefalopatie și moarte prematură.

*Tratament:* opțiunile terapeutice curente al acestui sindrom sunt reprezentate de administrarea antioxidantilor, a substraturilor și a cofactorilor lanțului respirator sub forma vitaminelor, cu toate că până în prezent nu s-au observat beneficii semnificative cu ajutorul acestor metode.

Particularitățile parcursului AVC-urilor la copii dovedește faptul că aceasta este o problemă interdisciplinară și că e necesar de a concentra eforturile multor specialiști - neurologi, neurochirurghi, geneticieni, hematologi, reumatologi etc. E nevoie de a se constitui grupe de risc în dezvoltarea ictusurilor la copii, în baza datelor anamnestice, examenului minuțios și manifestărilor subclinice ale pacienților.

Depistarea markerilor biochimici și genetici ai bolii metabolice și stările trombofile legate de acestea, permit sporirea substanțială a posibilității unui tratament patogenetic adecvat, unei profilaxii primare și secundare disfuncțiilor acute ale circulației cerebrale. [24]

Alte manifestări clinice, cum ar fi crizele epileptice, diabetul zaharat, pierderea părului, statura mică, deficitul motor, fac parte din tabloul clinic. Sindromul este asociat cu un număr de mutații punctiforme în materialul genetic mitocondrial, mai mult de 80% a mutațiilor fiind prezent la nivelul buclei dihidro-uridinice a genei de ARNt mitocondrial [ARNt (Leu) (UUR)]. La pacienții tineri cu multiple episoade de accident vascular cerebral, în teritorii vasculare diferite, precum și modificări radioimagistice caracteristice, crize convulsive,

deficit motor, hipostatura, afecțiuni gastrointestinale, cardiace, oftalmologice, trebuie inițiate testele de laborator în vederea unui sindrom MELAS. [2, 3, 7, 9]

Prezența fibrelor roșii în mușchiul scheletic și determinările biochimice caracteristice defectelor mitocondriale susțin diagnosticul. Testele genetice moleculare privind modificările ADN-ului mitocondrial vor confirma diagnosticul. Trebuie acordat sfatul genetic atunci când există certitudinea unor mutații în ADN-ul mitocondrial. [1, 3, 7, 9]

**Sindromul Leigh**

*Aspecte genetice:* sindrom determinat de mutația punctiformă a ADNmt asociat cu deficiențe multiple (ale CI, CII, CIII), cu scăderea drastică a producției mitocondriale de ATP.

*Aspecte clinice:*

- debutul bolii este cel mai frecvent în primul an de viață cu episoade de ataxie, vărsături și sindrom de hiperventilație;

- manifestări de encefalopatie cu deficite verbale și motorii (spasticitate, tulburări respiratorii), distonie, pierderea auzului și sau vederii;

- neuropatie periferică cu reducerea vitezei de conducere nervoasă secundar demielinizării axonale.

*Diagnosticul de laborator:* acidoză lactică predominantă la nivelul LCR (comparativ cu sângele), deficit de citocrom oxidază la biopsia musculară, leziuni spongiforme, focale bilaterale, simetrice la RMN.

Boala Leigh apare datorită incapacității mitocondriilor de a funcționa normal. Celulele importante din creier conțin ADN mitocondrial mutant care duce la o funcționare inefficientă a mitocondriilor. Aceasta cauzează o lipsă de energie în celule, care drept rezultat, afectează SNC și inhibă funcțiile motorii ale unei persoane, persoana respectivă neputându-și controla mișcările. Alte simptome includ pierderea apetitului, vomă, iritabilitate, crize, slăbiciune generală, probleme cardiace. Nu există încă un tratament pentru această boală, în prezent fiind administrată vitamina B1.

*Evoluție și prognostic:* boala evoluează cu regresie progresivă intelectuală și motorie, decesul survenind în cca. 2 ani de la debutul bolii. [2, 3, 7, 9]

**Sindromul LHON (Neuropatia optică ereditară Leber)**

*Aspecte genetice:* sindrom caracterizat prin prezența mai multor mutații punctiforme a ADNmt, toate interesând genele complexului Ia ale lanțului respirator, cele mai frecvente fiind: G11778A, G3460A și T14484C.



*Aspecte clinice:*

- debutul bolii, care este mai frecventă la bărbați, este în jurul vârstei de 30 de ani cu pierderea vederii (frecvent singura manifestare a bolii);

- pierderea vederii este nedureroasă, progresivă, cu evoluție variabilă în funcție de severitatea mutațiilor, fie cu recuperarea deficitului vizual, fie cu cecitate prin atrofia nervului optic;

- manifestări asociate: cardiomiopatie cu sindrom de preexcitație, distonie sau parapareză spastică. [2, 3, 7, 9]

**Sindromul MERRF (epilepsia mioclonică progresivă cu ragged-red fibers)**

*Aspecte genetice:* În 80-90% din cazuri există o mutație heteroplasmică 8344 (tranziție A->G) la nivelul genei codante pentru un ARN de transfer (ARNt-lizina). Această mutație se asociază cu o mare variabilitate a simptomelor. Transmisiunea este de origine maternă.

*Aspecte clinice:* poate debuta în cursul copilăriei sau la vârsta adultă. Acest sindrom asociază: epilepsia mioclonică progresivă, ataxie și miopatie. Degradarea intelectuală este mai mult sau mai puțin severă și rapidă. În câteva observații lipoamele sunt regăsite la nivelul regiunii cervicale. Biopsia musculară evidențiază aspectul RRF și frecvent un deficit al complexelor I și IV. În unele observații evoluția se face cu hemiparalizare, evocând o semiologie de tip MELAS. [2, 3, 7, 9]

**Sindromul NARP (neuropatie, ataxie, retinită pigmentară)**

*Aspecte genetice:* Este datorată unei mutații heteroplasmice de origine maternă situate în poziția 893 la nivelul genei ATPaze 6.

*Aspecte clinice:* Simptomele debutează la vârste variabile, în mod obișnuit după 5 ani și cuprind: deficit motor datorat unei neuropatii senzitivo-motorii axonale, ataxie, retinită pigmentară și frecvent sindrom piramidal și extrapiramidal, demență progresivă și crize epileptice. În mod obișnuit nu există acidoză lactică nici deficit al complexelor lanțului respirator.

Tulburările neurologice și neuromusculare care sunt cauzate de disfuncții la nivelul lanțului respirator mitocondrial, au fost recunoscute în ultimii 30 ani odată cu creșterea frecvenței. Mutațiile fie în mitocondrii sau în genomul nuclear, produc o eroare în sinteza, esențială pentru producerea de energie și a metabolismului, ceea ce duce la o mare varietate de probleme în plan clinico-funcțional și diagnostic [3, 4, 6, 9, 11].

Diagnosticul bolilor mitocondriale este complicat de prezentările lor eterogene și de lipsa unor proceduri de screening sau biomarkerilor de diagnostic care sunt atât sensibile cât și specifice. Diagnosticul este adesea un proces de lungă durată începe cu o evaluare clinică generală, urmată de screening-ul metabolic și imaginistic și, în final, prin teste genetice și analize mai invazive biochimice și histologice. [5, 7]

**CONCLUZII**

1. BM sunt rare la copii și reprezintă unele dintre cele mai complexe probleme cu care trebuie să se confrunte medicul neuropediatru. Complexitatea derivă din sindroamele clinice variate (retardul neuropsihic, ataxie, surditate și hipoacuzie senzorială, hipostatură, convulsii, retinită pigmentară, cardiopatie hipertrofică), manifestările fenotipice prezente și multitudinea crescândă a defectelor biochimice identificate. Defectele specifice pot conduce la un spectru larg de manifestări clinice cu debut la vârste diferite. În multe cazuri sunt necesare teste biochimice și moleculare sofisticate pentru stabilirea unui diagnostic precis.

2. Luarea în discuție a datelor anamnestice, antecedentelor familiale cu arborele geneologic, patologia legată de sex și de familie, noțiunea de moarte subită a sugarului, prezența de decese neonatale neexplicate, retardul psiho-motor și alte semne neurologice sunt sugestive pentru presupunerea diagnosticului.

3. Deseori, sindromul epileptic caracterizează BM și acestea trebuie suspectate atunci când epilepsia este rezistentă la tratamentul antiepileptic și este asociată cu astfel de simptome ca: retardul mintal și dereglările motorii.

4. Metodele de diagnostic se utilizează în funcție de vârsta copilului. Examinările de bază includ: analiza nivelului glucozei din plasmă și LCR, nivelul lactatului, amoniului, aminoacizilor din plasmă și LCR, aprecierea nivelului acidului uric etc.

5. O metodă de elecție în diagnosticarea EM reprezintă RMN cerebrală. În unele cazuri rezultatele obținute în cadrul investigațiilor imagistice sunt patognomice doar unor tulburări metabolice (spre exemplu tabloul MRI caracteristic pentru citopatiile mitocondriale).

6. Testele genetice suplimentare sunt necesare în

cazul prezenței tulburărilor mitocondriale și trebuie să reprezinte componentele indispensabile în cadrul investigațiilor copiilor ce au suportat un ictus ischemic cerebral.

7. Confirmarea diagnosticului ne permite să apreciem prognosticul bolii și măsurile de ameliorare a calității vieții copilului.

\*

\*

\*

## INTRODUCTION

MD is part of the IEM that are rare separately, but together they performed a vast and varied group of diseases. Currently, there are over 6,000 recognized rare inherited metabolic disorders. [12]. Although rare in children, the IEM are the most complex problems that must confront pediatrics and other specialized fields. The complexity derives from the clinical syndromes that are repeated in different metabolic errors. Specific defects can lead to a wide spectrum of clinical manifestations with onset at different ages. [13] In different group of ages there are different diagnostic methods. Basic examinations that define metabolic assessment include: analysis of glucose, lactate, ammonia, amino acids in plasma and cerebrospinal fluid, assessment of uric acid level, IRM (may suggest the presence of mitochondrial disorders). In many cases, biochemical and molecular tests are needed to establish an accurate diagnosis, but their availability is sometimes impossible because of the cost of investigations. This is a problem in our country to put a correct diagnosis and to make this investigation. However, early diagnosis of IEM is indispensable and can prevent the disastrous consequences of irreversible CNS involvement and of other organs.

In developed countries it is possible a prenatal diagnosis of many inborn metabolic diseases by finding of primary enzyme defect in fetal tissue, and emphasizing the accumulation of metabolites or macromolecular storage products in amniotic fluid or fetal cells. Recent research has revealed that the IEM diagnosis is important for the following reasons: some (phenylketonuria) benefit from specific treatment, and children with these disorders have increased chances to survival; late diagnosis involves irreversible neurological changes; for parents and relatives diagnosis is required a genetic counseling; birth of a sick child can be prevented by contraception. Obviously, are required new scientific ways of access, applying modern testing methods. A lot of studies showed that

advanced technologies in fetal DNA (10th week) tend to replace prenatal diagnosis by amniocentesis. A proper diagnosis will allow the selection of the correct treatment when the IEM had irreversible impacts. [14]. Early diagnosis of IEM can prevent progression to severe consequences. Early diagnosis also enlarges the therapeutic window for prenatal diagnosis for future pregnancies. For this reasons, the clinician should know about a possible presence of metabolic diseases as the main cause of a wide spectrum of clinical symptoms. Early postnatal detection of neuro-metabolic diseases, especially MD is important for CNS prophylaxis of serious complications and improve the child's disability. Today the meaning of enzyme replacement therapy is a new direction in medicine and, finally, there is hope in gene therapy. Anyway, some IEM can not be treated at this stage, but may become treatable in the future. [15, 16, 17]

## PURPOSE

The purpose of this paper is to underline the importance of early diagnosis and early treatment of EM. To achieve the goal we made a retrospective of previous studies, including our group of patients, which was evaluated clinically and paraclinically and follow their dynamics on the specific treatments.

## MATERIALS AND METHODS

The study included six children aged between 1 and 10 years, suspected for various forms of MD, hospitalized in Neurology Clinic of Hospital of Mother and Child Health Care. The children were investigated according to a standardized scheme including age of onset of MD, genetic heredity, the common neurological disturbances, the most common forms of epilepsy, neuro-imaging abnormalities, evolution under treatment, the degree of disabilities. In the study group it was observed a prevalence of EM associated with various disorders of the CNS in males, the ratio

*Table 1. Basic syndromes in ME (S. Ilarischin)*

Clinical syndrome	Onset	Symptoms	Date de laborator
MELAS	5-20 years old	pseudoseizures, migrena, vomiting, seizures, ataxia, degenerescence of retina, neurosensoreal hearing lose, short stature, diabet, cardiomyopathy	Lactic acidosis
MERRF	20 years old	Myoclonic epilepsy, ataxia, dementia, myopathy, neurosensoreal hearing loss, retardation in neuromotor developmental	
NARP	Any ages	neuropathy (predominantly senzomotor); ataxia, pigmentary retinal degeneration, dementia, , retardation in neuromotor developmental	Lactic acidosis
Kearns-Sayre	In first 10 yers of life	myopathy, cardiomyopathy, atrioventricular block, ataxia, external ophthalmoplegia, retinal pigment degeneration, neurosensoreal hearing loss, endocrine disorders	CSF protein (> 1 g/l)
Leber	In 20-30 yers of life	acute painless loss of vision (subacute), rare: dystonia, neuropathy, spastic paralysis, deformation of skeleton	Lactic acidosis
Leigh	First year of life	signs of brainstem's damage, cranial nerve palsy, nystagmus, pyramidal syndrome, extrapyramidal progressive disease, respiratory disorders (apnea or polipnee)	Lactic acidosis

of 3: 1 (4 boys - 66.6% and 2 girls - 33.4%). Laboratory tests were performed, including: serum creatinine, creatine kinase, lactate levels, EMG, brain CT, MRI. Brain imaging was performed to confirm the presence of a demyelination process, being presented by a high-intensity signal in both: white matter and subcortical area of the brain. The study was mainly based on distinctive clinical signs, MRI and muscle biopsy.

**RESULTS**

Acute onset of MD in the study group was observed: in the newborn period - 3 children (50%), infancy - 2 children (33.4%), after 3 years - one children. The inherit predisposition was positive in 66.7% (4 children), in rest of children - 33.3% (2 children) it was not found the predisposition was uncertain. According to literature data EM is characterized by following clinical signs (Table 1).

Patients in the study group were classified according to their clinical phenotype as follows: MELAS syndrome - 2 children, NARP syndrome - 1 child, MERRF syndrome - 1 child, Leigh syndrome - 1 child, Kearns-Sayre syndrome - 1 child.

Others neurological manifestations in the study group were : mentally retardation, seizures, other paroxysmal events, headache, vomiting, abnormal muscle tone, auditory and visual disturbances, weakness, gait disorders and behavioral disorders. From extraneurological abnormalities we can notice: low stature, hypertrophic cardiomyopathy, physical retardation, endocrine disorders, anemia, lactic acidosis. Main manifestations of neurological and extraneurological

signs are summarized in Table 2.

In children with epileptic seizures were observed following types of seizures: myoclonic - 1 child, tonic-clonic - 1 child, atonic - 1 child. The other clinical manifestations were hepatosplenomegaly in 2 children, facial dysmorphism- 2 children, digestive

*Table 2: Neurological and extraneurological fetures in the study group*

Semne neurologice:	Case I	Case II	Case III	Case IV	Case V	Case VI
Basic Syndromes	MELAS	NARP	MERRF	Kearns-Sayre	MELAS	Leigh
Mental retardation	+	-	+	-	+	-
Pseudoseizures	+	-	-	-	+	-
Headache, vomiting	-	-	-	-	+	-
Seizures	+	-	+	-	+	-
Impaired brain stem	+	-	-	-	-	+
sensory hearing loss	+	-	+	+	-	-
Cranial nerve palsy	-	-	-	-	-	+
nystagmus	-	-	-	-	-	+
pyramidal syndrome	-	-	-	-	-	+
Extrapyramidal syndrome (dystonia)	-	-	-	-	-	+
Ataxia	-	+	+	+	+	+
retinitis pigmentosa	-	+	-	+	-	-
myoclonic epilepsy	-	-	+	-	-	-
dementia	-	+	+	-	-	-
Extraneurological signs:						
Respiratory disorders (apnea or polipnee)	-	-	-	-	-	+
Short stature	+	-	-	-	+	-
physical retardation	-	+	+	-	-	-
hypertrophic cardiomyopathy	-	-	-	+	+	-
endocrine disorders	+	-	-	-	+	-
anemia		-	-	-	+	-
lactic acidosis	+	+	-	+	+	+

Table 3: Paraclinical investigations in study group

Paraclinical investigations:	Case I (ME-LAS)	Case II (NARP)	Case III (MERRF)	Case IV (Kearns)	Case V (ME-LAS)	Case VI (Leigh)
The muscle biopsy	Red muscle fibers	Intracellular lipid dystrophy	Red muscle fibers	Red muscle fibers	Red muscle fibers flaps	-
EMG	myopathic potential	Signs of peripheral sensorimotor neuropathy	Without significant changes	Without significant changes	myopathic potential	Without significant changes
MRI	ischemic hypodense changes in the right parietal lobe, moderate cortical atrophy with ventricular dilatation	Hyperintense areas on the trunk and basal ganglia	Basal ganglia calcification	Moderate cortical atrophy with ventricular dilatation	ischemic hypodense changes in the right parietal lobe	Symmetrical cystic lesions and gliosis in cortex, basal ganglia and cerebellum with incomplete myelination
Biochemical examination	Lactic acidosis	Lactic acidosis		Lactic acidosis, elevated level of pyruvate	Lactic acidosis	Lactic acidosis (in CSF) elevated level of pyruvate (in CSF) elevated levels of alanine and ammonium

symptoms - 2 children, cardiomyopathy in 2 children, cardiac arrhythmia in one child.

The results show that the most common neurological manifestations in children's study group were: mental retardation, pseudoseizures, ataxia, sensory hearing loss, retinitis pigmentosa, dementia, and among the most common extraneurological were: hypertrophic cardiomyopathy, low stature, lactic acidosis, physical retardation.

In all children were made following investigations: blood count, complete biochemical exam, summary of urine, ECG. All children were checked by neurologist and geneticist. Ophthalmological examination was performed in all children, auditory exam - in 3 children, in 2 children was made cardiological consultation, hematological examination was done in 1 child and consulting of gastroenterologist - in 2 children. Further examinations were performed: abdominal ultrasound, brain MRI, brain CT, skeletal radiography. Three children benefit from EEG sleep induction. In tab. 3 are presented neurological examinations data.

The data presented in Table 3 reports the diagnostic methods that have been used for children in the group of study. In four cases, muscle biopsy revealed the presence of red muscle fibers. On EMG, in two cases, were observed myopathic potential, in one case - signs of peripheral neuropathy. The MRI

exam detect in two cases hypodense foci, in two cases - cortical atrophy, in one case were found hyperintense areas in the basal ganglia and brainstem, in one case - calcifications in the basal ganglia and in one case - symmetrical cystic lesions and gliosis in cortex, basal ganglia and cerebellum with delayed myelination. Laboratory analysis has confirmed lactic acidosis in five cases and elevated pyruvate in blood in two cases. Examination of lactate / pyruvate ratio in CSF is essential in case of suspected MD, as biopsy tissue sampling - to assess tissue-specific changes.

Treatment of children in the group of study was symptomatic - 100%. Only one child showed satisfactory therapeutic response to conventional antiepileptic drugs and in 2 children the reducing of seizures was <50%. All children were supplemented with thiamine cofactor, carnitine and lipoic acid. Brain lesions were common in all MD which limits recovery of normal brain function. Correction of acidosis is indicated, but not all symptoms remitted. Two children showed satisfactory therapeutic response after administration of pyridoxine cofactor and one child - after administration of folic acid, other children did not show a therapeutic response to any of the therapeutic measures taken.

In all cases outcome was poor in association with mental retardation and regress in psychomotor devel-



opment.

**Discussion.** MD are part of the IEM, associated with multisystem disorder characterized by defective biochemical and genetic changes in mitochondria, with disorder of oxidation/reduction unit from the internal mitochondrial membrane in respiratory chain [1, 3, 9, 10]. EM are rare in medical practice and a symptomatic diagnostic is a major problem.

IEM concept is originally introduced by Archibald Garrod (1902-1908). He defining them as a group of various diseases with consecutive deviations from the normal course of various metabolic: amino acids, hydrocarbon, lipids, pigments, mineral salts, vitamins, mitochondria, etc. [14, 18, 19]

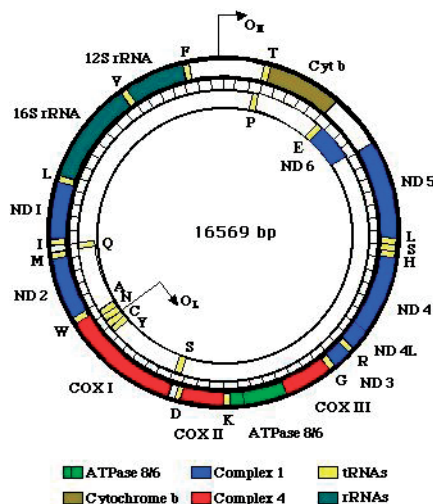
Normal mitochondria involves the integrity of all its structures component and functional balance, with admission with slight variations, without involvement of organellum normality.

Mitochondria are the cell's energy engine, which generates ATP. The number of mitochondria in cell depends on its energy requirements, in muscle cells, for example, the number is very high. These cell's organelles are essential for both :energy intake and for programmed cell death. [20, 21]

Each mitochondria of each cell contains many copies of the circular DNA molecules, double-stranded (mt-DNA) containing genes coding for ribosomal RNA and synthesis of various ARN-mt necessary for the biosynthesis of mitochondrial protein, as well as some of the proteins involved in the transport of electrons mitochondria (Fig. 1). The mitochondrial genome consists of 16,569 pairs of bases, containing 5.523 codons that encode for the 37 gene products. The vast majority of mitochondrial proteins, including the multi-subunit protein, involved in the transport of electrons, are encoded by nuclear genes. Mutations in these genes causes autosomal recessive disease, in which, the phenotype of the disease in different individuals from the same family tend to be very similar.

Each cells mitochondria is derived from cytoplasm of ovule; mitochondria and mt-DNA from the sperm are lost during fertilization. Mutations of mt-DNA are also inherited only from the mother. When several members of a family are affected by a particular disease, in relation to the heritage of mt-DNA mutations, inheritance model has the following character:

- All female can be considered mt-DNA mutation carriers, whether or not clinical signs are present.



**Figure 1.** The human mitochondrial genome. The identity and relative locations of the various mitochondrial genes.

- Phenotypic expression of the disease in different individuals with inherited mt-DNA mutation usually is varied, including severity of illness and different organ systems.

- Hereditary metabolic diseases with mitochondrial inheritance from the male parent is excluded.

Each cell contains at least hundreds of mitochondria, mitochondria and mt-DNA can affect all or only a fraction of mitochondria. The effect of each mutation in the particular phenotype depending on the severity of mt-DNA mutations, the proportion of affected mitochondria and the susceptibility of various tissues from impairment of mitochondrial energy metabolism. Clinical phenotype varies considerably from one individual to another during the same mt-DNA mutations. A clinically healthy woman who possesses a mt-DNA mutation may produce completely healthy descendants, others descendants may die in early childhood, and some can be affected by variations clinical manifestation (with mental retardation, retinitis pigmentosum, ataxia). Thus, the absence of clinical manifestations in one of the proband relatives or insignificant presence of signs and symptoms not exclude the possibility of mutation at first. Rate of mutation in mt-DNA is much higher than that of nuclear DNA. [22, 23]

Mitochondrial damage can be caused by mutations in mitochondrial DNA or nuclear DNA, in which case all cell suffers.

The effects of mitochondrial disease may be quite different, since a poor distribution of DNA can vary from one organ to another. Mutations that in a per-

son can cause liver disease to another person causing a brain disease. In addition, the severity of the defect can be significantly or insignificantly. Minor defects produce only effort intolerance, without causing any serious illnesses or disabilities. Other mitochondrial defects impacting functionality of mitochondria and can have a negative effect on the whole body. As a general rule, the diseases are most serious when defective mitochondria is present in muscles and nerves, because these cells are the biggest energy consumers.

Mutations in the mitochondrial DNA often occur spontaneously. Sometimes enzymes that control the duplication of mitochondrial DNA genes, which are encoded by the nuclear DNA, are defective, resulting an increased rate of mitochondrial DNA mutations. In the mitochondrial division, DNA is randomly divided into new born mitochondria. It may happen that if only a few of the copies of mother's DNA are mutated, many of defective copies can reach only in few molecules. Mitochondrial disease starts to become visible when the number of affected mitochondria tend a certain level, when more than half of copies of mitochondrial DNA is damaged, causing mitochondrial disease. [20, 21]

**Point mutations** of mt-DNA affect:

- the genes required for synthesis of mitochondrial protein, the most common tRNA genes, the consequence being secondary damage to all respiratory chain complexes.

- the genes encoding subunits of respiratory chain protein, with specific effect on isolated subunits.

**Distribution of mutations:** homoplasmic (similar in all tissues) and heteroplasmic (variable presence in mutant DNA and normal DNA from the same tissue).

**The frequency of mutations:** 6 - 17/100 000

**Clinical syndromes** – general features

- only maternal transmission (because the mitochondria come only from the ovule, not from the sperm) in all descendants;

- presence of limit effect : the percentage of mutant mitochondrial DNA exceed a certain limit in order to produce the clinical syndrome;

- the presence of mitotic segregation: the percentage of mutant mtDNA in cells may change during division, which may change rapidly genotype;

- lactic acidosis is constant;

- the proliferation of mitochondrial mass in the skeletal muscle is responsible for the appearance of

red muscle fibers which are typically negative for cytochrome c oxidase activity. [2, 3, 4, 5]

According to the investigation, some of the peculiarities of MD are:

- are rare;

- the affected person has neurological disorders in early ages of life;

- acute onset of MD with neurological signs mainly occurs in infancy;

- MD diagnosis is established, usually at age of infancy;

The reasons for delay diagnosis are:

- a) delay of early recognition of common phenotypes;

- b) false opinion that MB has particular clinical picture;

- c) the similarity of clinical manifestations to those found in other illnesses with which it is necessary to make a differential diagnosis: sepsis, intrauterine growth retardation, respiratory distress, recurrent vomiting, etc .;

- d) the accumulation of small molecules exert a toxic effect on the nervous system, with specific symptoms and clinical signs.

- in study group it was a prevalence of males with MD associated with neurological symptoms;

- in more than one third of studied patients the family anamnesis turned out to be worse, demonstrating its importance in the diagnosis of MD;

- epilepsies have a frequent occurrence in the MD, is the most common of associated neurological manifestations followed by psychomotor retardation, tone and motility disturbances, sensory organs impairment, personality and behavior disorders;

- in most cases administration of antiepileptic drug (DAE) is ineffective in some MD (hereditary mitochondriopatia );

- delay of appropriate antiepileptic treatment lead to irreversible consequences until death, as a result of organic decompensation and / or adopting wrong therapeutic tactics;

Clinical symptoms appear with growing of child.

- when the child is younger, the symptoms are less varied (acompanying systemic clinical signs);

- during the newborn period, the most common clinical manifestations of MB are: seizures, apnea, recurrent vomiting etc .;

- in infancy are associated: the delay in the developmental process, spasticity or hypotonia, autistic

manifestations, abnormal eye movements, and choreoathetosis;

- during the school period is specific: deterioration of school performance, loss of vision, behavioral disturbances;

- MD have a chronic course and many of them - progressive;

- often the problem remains hidden ("sleep"), another disease or stress can disturb the balance, facilitating the onset of clinical symptoms;

- unfavorable prognosis in chronic forms of MD, but anyway better than in early forms;

- death is a frequent phenomenon among MB with CNS impairment, due to disease severity and delay diagnosis and / or administration of a correct treatment.

To put a correct clinical diagnosis are necessary following steps:

- a detailed medical history - the most important step in suspecting MD. A positive family history is extremely informative;

- the presence of unexplained neurological disorders: mental retardation, cerebral palsy, seizures, psychomotor retardation, abnormal motility;

- loss of previously acquired purchases is suggestive of a progressive degeneration of the CNS;

- if we suspect an IEM is required additional investigation.

Mitochondrial diseases may occur at any age. They have a serious natural course, fatal in early years of life, during childhood or sometimes benign. The clinical phenotype may present important elements to guide the diagnosis [6, 7, 9, 11].

Clinical symptoms are common in MD: brain, muscle, heart and sensory system. These clinical manifestations can be separated into individualized syndromes, as myopathies with external ophthalmoplegia, Kearns-Sayre syndrome, Leigh syndrome, MELAS syndrome and MERRF. Sometimes clinical symptoms does not enclose in any of the syndromes described. The symptomatology can express predominantly in CNS and muscle, but may be present signs of impairment of other organs and systems: osteoarticular system, liver, hematopoietic system, digestive and skin tissue. A mitochondrial origine must be expected in the association inexplicable signs that involves several organs that have no embryological origin [7, 8, 9, 11].

MD may occur in other disorders, and after a

short time are added inevitable signs of neuromuscular impairment.

Often primary clinical manifestation in mitochondrial cytopathic disease is suffering of a single organ. None of the clinical manifestations is not sufficient to focus on the involvement of a mitochondrial defect. Later, the association signs of other organs and systems damage required laboratory tests whose results can document possible mitochondrial dysfunction. However the decisive diagnostic test is molecular analysis of mt-DNA [4, 7, 11].

MELAS syndrome (Mitochondrial Encephalopathy, lactate acidosis, stroke-like episodes) occupies a important places among causes of acute stroke in children and young people including. It is shown that 17% cases of infantile infarcts are those which appear as manifestations of MELAS syndrome. It is reported a frequency of 99% of stroke like episodes as cardinal symptom of disease, associated with myopathic phenomenon, „ red fibers” and lactic acidosis. [3] This syndrom is described as mitochondrial myopathy, maternally inherited. [2, 3]

Acute deficiency of energetic substrates, associated with increased concentration of pathological components of respiratory chain metabolism underlying stroke episodes in such patients. Neuroimagic phenomena are detected in the hemispheres (up to 80%), less the cerebellum and basal ganglia.

In case of suspected MELAS syndrome is important to remove their muscle biopsy, evaluate acidosis and lactate levels in the blood and CSF (cerebrospinal fluid), to improve a molecular-genetic examination for distinguish the most frequent point mutations of the gene A3243G mt-ADN, mitochondrial t-ARN [tRNA (Leu) ((UUR), found in 80% cases.

Clinical aspects:

- onset around 15 years of age, with encephalopathy (migraine headaches, vomiting, stroke-like episodes, syncope, hemiplegia, loss of hearing);

- myopathy in the 5th decade of life, fatigue and effort intolerance ;

- distal sensory polyneuropathy with paresthesia and hyporeflexia;

- cardiomyopathy in 15% of cases.

Laboratory diagnosis: lactic acidosis, increased serum CK, multifocal cortical lesions on MRI, normal EMG or presence of myopathy.

Evolution and prognosis: clinical course of the disease is variable, ranging from asymptomatic with



normal development to progressive muscle weakness, lactic acidosis, cognitive dysfunction, seizures, stroke-like episodes, encephalopathy and premature death.

**Treatment:** The current therapeutic options for this syndrome is based on the use of antioxidants and cofactors of respiratory chain substrates like vitamins, but no significant benefit was seen with these methods.

Peculiarities of stroke in children shows that it is necessary to focus the efforts of many specialists - neurologists, neurosurgeons, geneticists, hematologists, rheumatologists etc. It is necessary to follow risk groups (stroke like episodes in children). Detection of biochemical and genetic markers of metabolic disease and related conditions increasing the possibility of pathogenetic treatment, appropriate primary and secondary prophylaxis of acute cerebral stroke. [24]

Other clinical manifestations, such as seizures, diabetes, hair loss, short stature, motor deficit are part of the clinical picture. The syndrome is associated with a number of point mutations in the mitochondrial DNA, more than 80% of the mutations occurring in the loop of dihydrouridine mitochondrial tRNA, gene [tRNA (Leu) (UUR), A → G]. In young patients with multiple episodes of stroke in different vascular territories and neuroimaging abnormalities, seizures, motor deficit, short stature, gastrointestinal, cardiac, ophthalmic disorders, should be initiated laboratory tests to evaluate MELAS syndrome. [2, 3, 7, 9]

The presence of red fibers in skeletal muscle and characteristic biochemical determinations supporting the diagnosis. Molecular genetic tests on mitochondrial DNA modifications will confirm the diagnosis. Genetic counseling should be given when there is a mutations in mitochondrial DNA. [1, 3, 7, 9]

### **Leigh syndrome**

**Genetic features:** syndrome caused by a point mutation mt-DNA, associated with multiple deficiencies (of CI, CII, CIII) and the decrease in mitochondrial production of ATP

#### *Clinical features:*

- Onset is most common in the first year of life with episodes of ataxia, vomiting and hyperventilation syndrome;
- Manifestations of encephalopathy with verbal and motor deficits (spasticity, respiratory disorders), dystonia, vision and hearing loss;
- Peripheral neuropathy with reduced nerve conduction, secondary axonal demyelination.

**Laboratory diagnosis:** lactic acidosis, especially in CSF (compared to blood), cytochrome oxidase deficiency in muscle biopsy, symmetrical focal, bilateral lesions on MRI.

Leigh disease is due to failure of mitochondria to function normally. Brain's cells contain mutant mitochondrial DNA, leading to inefficient functioning of mitochondria. This causes a lack of energy in cells that result in inhibition of CNS and motor functions, the persons not being able to control their movements. Other symptoms include: loss of appetite, vomiting, irritability, seizures, generalized weakness, heart problems. There is still no cure for this disease, currently being administered vitamin B1.

**Evolution and prognosis:** the disease evolves with progressive mental and motor regression, death occurring in about 2 years of disease onset. [2, 3, 7, 9]

**Syndrome LHON** (Leber's optic hereditary neuropathy)

**Genetic features:** syndrome is characterized by the presence of several point mutations of mt-DNA in genes of respiratory chain complex Ia, the most common being: G11778A, G3460A; T14484C.

#### *Clinical aspects:*

- Onset is in men, around 30 years of age with loss of vision (often the only manifestation of disease);
- Painless vision loss is progressive, evolving variable depending on the severity of mutations or by optic nerve atrophy with blindness;
- Associated manifestations: cardiomyopathy, dystonia and spastic paraparesis. [2, 3, 7, 9]

**MERRF syndrome** (progressive myoclonic epilepsy with ragged red fibers)

**Genetic features:** In 80-90% of cases there is a heteroplasmic mutation 8344 (transition A → G) in the gene coding transfer RNA (tRNA-lysine). This mutation is associated with a wide variability of symptoms. The transmission is based on maternal origin.

**Clinical aspects:** onset during childhood or adulthood. This syndrome associates: progressive myoclonic epilepsy, ataxia, and myopathy. Intellectual degradation is more or less severe and rapid. In a few observations are found lipomas in the cervical region. Muscle biopsy shows RRF appearance and frequently reflects a deficiency of complexes I and IV [2, 3, 7, 9].

**NARP syndrome** (neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa)

**Genetic features:** It is due to a heteroplasmic mutation located in position 893 in the gene of ATPases.



*Clinical features:* starts usually after 5 years and include: motor deficit due to a sensomotor axonal neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa, pyramidal and extrapyramidal syndrome, progressive dementia and seizures. Typically there is no deficiency of lactic acidosis respiratory chain complexes.

Neurological and neuromuscular disorders which are caused by disorders in the mitochondrial respiratory chain, have been recognized with increasing frequency in the past 30 years. Mutations in mitochondrial or nuclear genome producing an error in synthesis of essential energy product, leading to a variety of problems in the clinical and functional diagnosis [3, 4, 6, 9, 11].

The diagnosis of mitochondrial diseases is heterogeneous and complicated. Diagnosis is often a long process, with a general clinical assessment, followed by metabolic screening and neuroimaging, and finally, genetic tests and more invasive biochemical and histological analyzes. [5, 7]

## CONCLUSIONS:

1. MD in children are rare and represent one of the most complex problems in neurology. The complexity arising from various clinical syndromes (mental retardation, ataxia, deafness, short stature, seizures, retinitis pigmentosa, cardiomyopathy), present of phenotypic manifestations and multiple biochemical

defects identified. Specific defects can lead to a wide spectrum of clinical manifestations with onset at different ages. In many cases, biochemical and molecular tests are needed to establish an accurate diagnosis.

2. History of disease, heredity history, linked to sex and family, the notion of sudden death in infancy, unexplained presence of neonatal deaths, psychomotor retardation and other neurological signs are suggestive for diagnosis.

3. Often MD is characterized by epileptic syndrome and it should be suspected when epilepsy is resistant to antiepileptic treatment and is associated with symptoms such as: mental retardation and motor disorders.

4. Diagnostic methods depend on the age of the child. Basic examinations include: analysis of plasma and CSF glucose, lactate levels, ammonium, amino acids in plasma and CSF assessment of serum uric acid etc.

5. A method of choice in diagnosing EM is brain MRI. In some cases results are pathognomonic in metabolic disorders (eg MRI picture characteristic for mitochondrial cytopathy).

6. Genetic tests are important for detection of mitochondrial disorders and should be performed in children who have suffered an ischemic stroke.

7. The correct diagnosis helps us to appreciate the prognosis of disease and improve quality of life in children.

## BIBLIOGRAFIE / REFERENCES:

- Borner GV, Zeviani M, Tiranti V, et al. **Decreased aminoacylation of mutant tRNAs in MELAS but not in MERRF patients.** *Hum Mol Genet*, 2000, 9(4): 467-475.
- Ștefănescu D. **Bolile mitocondriale.** În Covic M., Ștefănescu D., Sandovici I, *Genetică medicală, Ed Polirom, București*. 2004; 387-396
- Hirano M, Pavlakis SG. **Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): current concepts.** *J Child Neurol*, 1994, 9(1): 4-13.
- Ilarischiu SH, Ivanova-Smolenscaia IA, Marcova ED. **ADN-diagnostică i medico-geneticăscoc consultirovanie v nevrologii.** M.: MHA, 2002, 4-591.
- Iliescu C, Măgureanu S. **Miopatii mitocondriale.** În Măgureanu S. (sub red), *Afecțiuni neuromusculare la sugar, copil și adolescent, Ed Medicală Amaltea, București*, 2004, 881-914.
- Pașcanu I. **Genomul mitocondrial, în elemente de genetică medicală.** Ed University Press, Târgu-Mureș, 2007, 64-69.
- Muntean D, Ștefănescu D. **Boli mitocondriale.** În Puiu M. și colab, *Esențialul în 101 boli genetice rare. Ed Orizonturi Universitare, Timișoara*, 2007, 293-297.
- Scaglia F, Northrop JL. **The mitochondrial myopathy encephalopathy, lactic acidosis with stroke-like episodes (MELAS) syndrome: a review of treatment options.** *CNS Drugs*, 2006, 20(6): 443-464.
- Ștefănescu DT. **Patologia mitocondrială.** În Ștefănescu DT, Călin AG, *Genetică medicală – progrese recente, Ed. Tehnică București*, 1998, 151-167.
- Menkes J, Sarnat H. **Mitochondrial Encephalomyopathies.** In Menkes. *Child Neurology*, 2005, 151-167.
- Morava E, JAM Smeitin. **Neurology.** 2006, 151-167.
- Popescu V. **Neurologie pediatrică, București, Teora** 2001, 1614-1627.
- Sanderson S, Green A, Preece MA, Burton H. **The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK.** *Arch Dis Child*, 2006, 91(11): 896-9.
- Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH. **Inborn Metabolic Diseases and Treatment, (4th ed.), Springer**, 2006, 4-40.
- Hadjiu S, Prepețea E, Hadjiu E. **Manifestări neurologice în un-**

- ele maladii metabolice ereditare la copii.** Rev de Neurologie și Psihiatrie a Copilului și Adolescentului din România, 2013, 16 (1): 55-73.
16. Bernard LM. **Current Management in Child Neurology.** Third Edition, 2005, 311-312.
  17. Biswas J, Nandi K, Sridharan S, Ranjan P. **Ocular manifestation of storage diseases.** *Curr Opin Ophthalmol*, 2008, 19(6): 507-11.
  18. Sinclair HM. **Historical aspects of inborn errors of metabolism.** Magdalen College, Oxford, Department of Biochemistry, University of Oxford. 1962, 5.
  19. Saudubray JM, Chappentier C. **Clinical phenotypes: Diagnosis/ algorithms.** In: *Metabolic and molecular bases of inherited disease*, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds), McGraw-Hill, New York 2001, 12-1327.
  20. Georg F Hoffmann, Johannes Z, William L. Nyhan. **Inherited Metabolic Diseases.** 2010, 5-146.
  21. [http://www.viata-medicala.ro/Medicina-mitochondrial%C4%83.html\\*articleID\\_5103-dArt.html](http://www.viata-medicala.ro/Medicina-mitochondrial%C4%83.html*articleID_5103-dArt.html)
  22. [http://ro.wikipedia.org/wiki/ADN\\_mitochondrial](http://ro.wikipedia.org/wiki/ADN_mitochondrial)
  23. Saudubray JM, Chappentier C. **Clinical phenotypes: Diagnosis/ algorithms.** In: *Metabolic and molecular bases of inherited disease*, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds), McGraw-Hill, New York, 2001, 4-1327.
  24. <http://emedicine.medscape.com/article/1183253-overview>
  25. Wolf NI, Bast Thomas, Surtees Robert. **Epileptic Disorders.** Department of paediatric Neurology, University Children's Hospital Heidelberg, Germany, Neurosciences Unit, Institute of Child Health, University College London, UK, 2006, 7, 67-81.