

ANALIZA COMPARATIVĂ A PARTICULARITĂȚILOR METABOLIS- MULUI AZOTAT LA COPIII CU SINDROM EPILEPTIC DE DIFERITĂ VÂRSTĂ

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF NITROGEN METABOLISM PECULIARITIES, OF CHILDREN WITH EPILEPTIC SYNDROME OF DIFFERENT AGES

Ghenadie Cărăușu³, Svetlana Garaeva¹, Ana Leorda¹, Vlada Furdui¹, Galina Redcozubova¹, Galina Postolati¹,
Nina Kovarschi¹, Mihail Condrațchi²

¹Laboratorul Interrelații Psihosomatice a Institutului de Fiziologie și Sanocreatologie al AȘM

²IMSP Spitalul Clinic de Psihiatrie

³Catedra Psihiatrie, Narcologie și Psihologie medicală, IP USMF „Nicolae Testemițanu”

Rezumat

A fost efectuată analiza indicilor metabolismului azotat (IMA), în special ai aminoacizilor liberi (AAL), la copii cu epilepsie. Analiza materialului a fost realizată prin metoda cromatografiei lichide la analizorul de aminoacizi AAA 339 M. Datele au demonstrat o stare de hipoaminoacidemie pronunțată, cea mai redusă fiind concentrația aspartatului, treoninei, asparaginei, glutamatului, glutaminei, fenilalaninei, triptofanului, lizinei, argininei și a histidinei. Creșterea nivelului sumar al aminoacizilor cu conținut de sulf a fost însoțită de un dezechilibru al concentrațiilor lor individuale, printr-un nivel crescut de acid cistic și al cisteinei, și redus al metioninei și al taurinei. A fost depistată și o creștere constantă a conținutului de etanolamină și de amoniac liber în sânge, dar și o reducere a aminoacizilor liberi: esențiali, neesențiali, imunoactivi și cetogeni. A fost studiat profilul aminoacizilor în serul sanguin și urină ca indicatori ai metabolismului azotat la copiii diagnosticați cu epilepsie. Datele au demonstrat că în perioada de remisiune se observă creșterea nivelului de AAL de inhibiție, sporirea indicelui AAL de *inhibiție/excitație* și scăderea indicelui *serină/etanolamină*. Cel mai semnificativ s-au redus indicii *glutamină/amoniac* și *uree/amoniac*. Profilul de aminoacizi a fost însoțit de un dezechilibru pronunțat al aminoacizilor cu conținut de sulf și de scăderea indicelui aminoacizilor *esențiali/neesențiali*, ceea ce permite utilizarea lor în calitate de marker nespecific al nivelului de sănătate.

Summary

There was performed the analysis of nitrogen metabolism indices (MI), particularly of free amino acids (ALA) in children with epilepsy. Analysis of the material was performed by liquid chromatography with Amino Acid Analyzer AAA 339 M. The data showed a marked hypoaminoacidemia state, the lowest being the concentration of aspartate, threonine, asparagine, glutamate, glutamine, phenylalanine, tryptophan, lysine, arginine and histidine. Increased summary level of sulphur-containing amino acids was accompanied by an imbalance of their individual concentrations, through high levels of cysteic acid and cysteine, and reduced methionine and taurine. It was found an increase of ethanolamine and free ammonia content in the blood, and a reduction of some free amino acids: essential, nonessential, immunoactive and ketogenic. It was researched the amino acid profile in serum and urine, as indicators of nitrogen metabolism, in children with epilepsy. The data showed that during remission there was observed an increase of inhibition ALA, increase of ALA *inhibition/excitation* index and decrease of *serine/ethanolamine* index. Most significantly were decreased *glutamine/ammonia* and *urea/ammonia* indexes. Amino acid profile was accompanied by a marked imbalance of sulphur-containing amino acids and a decrease of *essential/nonessential* amino acid index that allows their usage as a nonspecific marker of the health level.

Actualitatea

Sănătatea psihică, ca o stare complexă relativ stabilă a activității nervoase superioare este realizată de substratul morfologic, de sistema neurofiziologică și neurochimică a creierului, determinată de programul genetic de dezvoltare a organismului expus la factorii mediului ambiant [24]. Cu alte cuvinte, formarea și dezvoltarea sănătății mentale depinde de interacțiunea organismului cu mediul, gradul și durata expunerii, de factorii ecologici și sociali, de perioada de vârstă în care aceștia au acționat [24].

Ca model al impactului factorilor exogeni asupra substratului morfologic, sistemelor neurofiziologic și neurochimic ale creierului, poate servi epilepsia. Aceasta este o maladie polietologică, la apariția căreia contribuie o varietate de factori nocivi care acționează atât intrauterin, cât și în timpul travaliului, așa și postnatal, în special în primii ani de viață (traumatisme,

infecții, intoxicații) [18]. La etapa actuală de dezvoltare a medicinei, epilepsia deseori este definită ca o boală cronică a creierului, caracterizată prin accese recurente de dereglări ale funcțiilor motorii, senzoriale, vegetative, cognitive sau mentale, rezultate din descărcările neuronale excesive, la combinarea predisunerii ereditare cu factorii exogeni morbigeni [17]. Crizele de epilepsie apar la orice vârstă, atât la femei, cât și la bărbați. Incidența epilepsiei este de 20-70 la 100 mii de oameni pe an, și până în prezent încă mai duce la o creștere semnificativă a invalidității și a riscului sporit de mortalitate [32]. Aproximativ 5% din oameni pe plan mondial, au pe durata vieții cel puțin o criză epileptică și aproximativ 10% sunt implicați în probleme de epilepsie. Liga Internațională antiepileptică indică la faptul că numărul de pacienți cu epilepsie este de 0,6-0,7% din populația din țările dezvoltate, și acest procentaj crește invers proporțional cu nivelul de dezvoltare economică al țărilor [16].

Epilepsia ocupă al treilea loc printre bolile sistemului nervos la copii și adolescenți, în 70% de cazuri debutează în copilărie, datorită faptului că creierul imatur se caracterizează printr-o predispoziție convulsivă înaltă [19]. Pe de altă parte, plasticitatea proceselor mentale la copii condiționează posibilitatea compensatorie a dereglărilor odată cu corecția direcționată [9]. Particularitatea epilepsiei la copii o constituie impactul crizelor epileptice asupra dezvoltării structurilor sistemului nervos central (SNC) și asupra formării funcțiilor mentale superioare, care asigură adaptarea organismului copilului la condițiile de mediu [3]. Acest lucru se reflectă în modificări mai accentuate în sfera personală și a funcțiilor, care stau la baza performanțelor cognitive (atenția, memoria, gândirea). Anamneza îndelungată a maladiei, leziunea structurilor cerebrale difuze sau locale și alți factori ar putea duce la tulburări intelectual-mnestice, precum și la tulburări mentale severe [12, 13]. La adolescenții cu epilepsie, există o diferență semnificativă în ceea ce privește nivelul de agresivitate, depresie și anxietate, comparativ cu semenii lor sănătoși, în funcție de localizarea focarului epileptic [17]. Recent, este examinat pe larg conceptul encefalopatiilor epileptice [1, 12, 31].

Sunt evidențiate trei tipuri de predispoziție la epilepsie: ereditară, congenitală și dobândită [6]. Predispoziția ereditară este legată aparent cu modul poligenic de moștenire, în acest caz se moștenește nu maladia, ci anumite caracteristici ale ratei metabolice (dereglări ale echilibrului mineral-hidric, echilibrului acido-bazic, metabolismului glucidelor, grăsimilor, proteinelor).

Predispoziția înăscută include diferite efecte nocive asupra fătului în timpul sarcinii și la naștere, ceea ce duce la leziuni focale sau difuze severe ale creierului care se manifestă clinic prin forme grave de epilepsie la copiii de vârstă fragedă. Aceste focare sporesc excitabilitatea celulelor nervoase alăturate și la îndepărtarea chirurgicală a unor astfel de focare, epilepsia uneori complet este eliminată sau mersul ei se îmbunătățește în timp [9]. Leziunile prenatale, perinatale, postnatale sunt cele mai frecvente cauze de epilepsie la sugari și la copii mici. Predispoziția dobândită, în general, este o consecință a bolilor cerebrale precedente, suportate în ontogeneză, care sunt urmate de formarea focarului epileptogen. În mecanismele fiziopatologice ale crizelor epileptice un rol major îl joacă creșterea ratei de excitație a neuronilor și hipersincronizării, precum și hiperexcitabilității lor [7], care la rândul său este cauzată de schimbări în metabolismul celular, tulburări metabolice și enzimatice [9].

Numeroase studii au evidențiat modificări în metabolismul proteic, lipidic, al carbohidraților, echilibrului mineral-hidric, acido-bazic (înainte de criză – alcaloză, iar după ea – acidoză), în legătură cu ce s-au propus o serie de teorii – autointoxicația, perturbarea funcției glandelor endocrine, în mod special al cortexului suprarenal [2, 5, 7, 21]. Cu toate acestea, rezultatele cercetărilor contradictorii, iar uneori și lipsa modificărilor evidente ale metabolismului la o parte din pacienții cu epilepsie, pune la îndoială această teorie [29]. A fost perspectiv de a studia metabolismul direct în țesutul cerebral [30]. Datele obținute mărturisesc despre modificările în metabolismul creierului la pacienții cu epilepsie, care determină în primul rând dereglări în transmiterea impulsurilor nervoase. A fost depistată o creștere a permeabilității membranei celulare, care duce la perturbarea echilibrului ionic și, în consecință, la depolarizarea relativă a celulelor nervoase [1]. Această depolarizare, cel mai

probabil, este o cauză nemijlocită a descărcării epileptice [9]. Se indică în special la pierderea de potasiu de către celule și la retenția de sodiu și apă în celule. O importanță deosebită în epilepsie o are, de asemenea, dereglarea metabolismului unor substanțe, cum ar fi acetilcolina și acidul γ -aminobutiric (GABA) [7]. Într-adevăr, numeroase date sugerează, ca aminoacizii neuromediatori și receptorii lor sunt implicați în formarea unor procese fundamentale ale activității nervoase, așa ca: plasticitatea sinaptică, potența pe termen lung, care stă la baza reglementării memoriei neuronale, reglarea sistemelor senzoriale multimodale ale creierului, menținerea pragului convulsivant; reglarea tonusului muscular, mecanismele fiziologice ale somnului, anxietatea și agresivitatea; sensibilitatea SNC la hipoxie și hipoglicemie [5, 6, 20, 21].

Actualitatea problemei epilepsiei la copii a determinat oportunitatea investigării profilului aminoacizilor în serul sanguin și urină, ca indicatori ai metabolismului azotat la copiii diagnosticați cu epilepsie.

Materiale și metode

Au fost analizați indicii metabolismului azotului (IMA), în special ai aminoacizilor liberi (AAL) în serul sanguin și în urina colectată dimineața la copiii diagnosticați cu epilepsie în perioada de remisie. Copiii au fost împărțiți în două grupe: grupa I – copii de până la 2 ani și grupa II – copiii de la 3 la 8 ani. Indicatorii IMA ai copiilor sănătoși de aceeași vârstă practic nu se deosebeau, ceea ce a permis combinarea lor într-un grup – de control. Analiza materialului a fost realizată prin metoda cromatografiei lichide la analizorul de aminoacizi AAA 339 M. Datele obținute au fost prelucrate cu ajutorul criteriului Student.

Rezultate și discuții

Rezultatele obținute la analiza probelor de ser sanguin al copiilor din grupa de control și a celor cu epilepsie sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Conținutul comparativ al indicilor metabolismului azotat în serul sanguin al copiilor din grupa de control și a celor cu sindrom epileptic (mkmol/100ml)

Indicii metabolismului azotat	Grupa de control	Copii cu vârsta până la 2 ani	Copii cu vârsta 3-8 ani
Acid cistic	0,79±0,22	2,14±0,43*	4,39±0,65*
Taurină	11,81±1,69	12,66±3,05	7,48±1,69*
Acid aspartic	4,52±1,20	2,18±0,52*	2,40±0,62*
Treonină	12,63±1,39	4,82±1,06*	7,86±1,40*
Serină	11,57±2,90	7,76±1,21*	14,78±3,82*
Asparagină	11,10±1,63	5,75±0,85*	6,86±1,31*
Acid glutamic	19,53±5,25	12,62±2,39*	11,10±2,64*
Glutamină	44,49±4,57	37,63±8,10*	16,29±3,88*
Acid α -aminoadipic	0,37±0,09	0,49±0,11*	0,41±0,10
Prolină	18,01±3,49	14,20±3,63*	14,64±2,78*
Glicină	18,48±5,06	15,19±3,01	25,88±5,18*
Alanină	28,35±7,05	24,50±5,44	30,14±7,46
Citrulină	2,12±0,43	1,60±0,30*	3,04±0,64*
Acid α -aminobutiric	1,11±0,32	1,11±0,27	2,84±0,67*
Valină	17,50±3,19	11,57±2,11*	20,58±4,42*
Cisteină	2,54±0,62	7,28±1,63*	6,45±1,60*

Homocisteină	0,59±0,14	0,39±0,05*	0,90±0,13*
Metionină	1,86±0,37	1,33±0,32*	1,25±0,23*
Izoleucină	8,50±1,35	3,24±0,70*	5,06±1,02*
Leucină	17,50±2,32	5,56±1,35*	10,46±2,51*
Tirozină	6,02±1,40	5,83±1,49	6,86±1,25
Fenilalanină	6,25±1,39	3,73±0,61*	3,81±0,85*
Acid γ-aminobutiric (GABA)	0,28±0,06	0,23±0,05*	0,58±0,13*
Etanolamină	1,83±0,36	2,59±0,60*	3,47±0,81*
Triptofan	3,19±0,58	2,84±0,69	1,78±0,39*
Ornitină	6,60±1,13	4,09±0,60*	5,05±0,90*
Lizină	20,55±3,63	6,96±1,62*	11,97±1,83*
Histidină	18,24±1,24	4,89±1,19*	6,82±1,54*
Arginină	11,37±1,31	5,63±0,98*	6,33±1,53*
Uree	455,28±54,16	117,47±24,97*	121,02±29,39*
Amoniac	20,51±4,43	48,64±10,79*	49,94±11,85*
ΣAAL	307,66±41,38	208,78±23,69*	238,69±24,90*
ΣIMA	783,45±107,66	368,90±34,65*	409,65±44,52*

* P ≤ 0,05

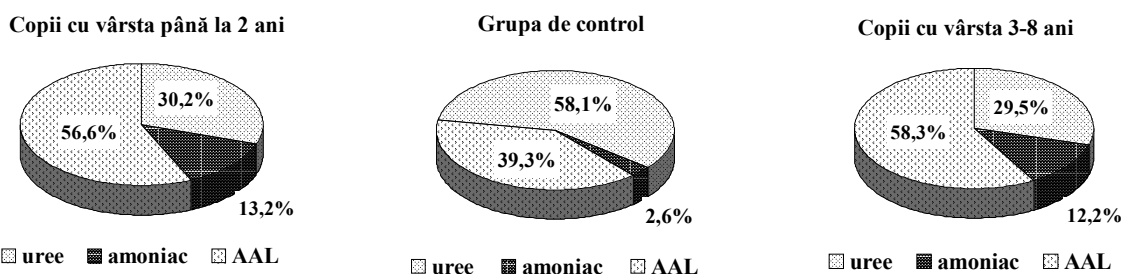


Fig. 1: Raportul procentual al produselor metabolismului azotat în volumul total al IMA.

Prezintă interes analiza raportului uree/amoniac: dacă în grupa de control el constituie $22,20 \pm 3,54$, atunci la copiii bolnavi din ambele grupe de vârstă a scăzut, în medie de 2,5 ori, ceea ce indică la o scădere a capacității hepatocitelor de a sintetiza uree, precum și la o creștere semnificativă a conținutului de amoniac liber în sânge (de 2,4 ori în ambele grupe). Acest lucru are efecte nocive asupra celulelor creierului și poate provoca convulsii la copii [14, 33]. Mai mult decât atât, un astfel de conținut sporit de amoniac poate iniția dezvoltarea encefalopatiei, ceea ce confirmă conceptul encefalopatiilor epileptice [11, 12, 31].

În continuare a fost determinat conținutul sumar al IMA al diferitor grupe funcționale în serul sanguin al copiilor sănătoși și al celor cu sindrom epileptic (tabelul 2).

Tabelul 2

Conținutul sumar al IMA al diferitor grupe funcționale în serul sanguin al copiilor sănătoși și al celor cu sindrom epileptic (mmol/100ml).

Grupele funcționale de aminoacizi	Grupa de control	Copii cu vârsta până la 2 ani	Copii cu vârsta 3-8 ani
Neesențiali	164,60±24,68	133,93±15,81*	135,41±17,30*
Esențiali	117,58±11,20	50,56±5,68*	75,92±10,0*
Imunoactivi	111,21±19,45	79,52±9,39*	102,53±13,61*
Glicogeni	93,05±25,21	66,01±9,88*	101,65±15,55
Cetogeni	62,01±10,62	28,16±3,55*	39,94±5,15*
Aminoacizi cu conținut de sulf	17,57±4,67	23,79±4,07*	19,68±2,37

* P ≤ 0,05

Analiza rezultatelor obținute a arătat, că la copiii cu epilepsie se observă starea de hipoaminoacidemie exprimată – conținutul total de AAL în serul sanguin al copiilor din ambele grupe de vârstă a scăzut de 1,5 și respectiv 1,3 ori. Conținutul total de IMA este de asemenea redus în comparație cu controlul de 2,1 și 1,9 ori, respectiv, însoțit de o epuizare generală a produselor metabolismului azotului la copiii cu epilepsie.

Conform datelor tabelului se observă că partea AAL la copiii epileptici cu vârsta până la 2 ani este sporită de 1,4 ori, din contul reducerii conținutului de uree în sânge de 1,9 ori. În sângele copiilor din grupa cu vârsta 3-8 ani procentul de AAL, de asemenea, este sporit – de 1,5 ori, iar al ureei a scăzut de 1,9 ori. Pe fondalul unei hipoaminoacidemii severe aceasta poate indica la prezența proceselor de adaptare a stării de păstrare a statutului AAL în serul sanguin. În același timp, cota parte a amoniacului în IMA a crescut în mod semnificativ în comparație cu grupa de control de 5,0 și 4,7 ori, respectiv. Concentrația ureei este redusă de 4,1 și 3,8 ori, respectiv în grupele de vârstă studiate.

În continuare, a fost efectuată analiza repartizării cotei parte a produselor metabolismului azotat (AAL, amoniac, uree) în volumul total al IMA (Fig. 1).

Reieșind din datele tabelului 2 la copiii cu epilepsie, de asemenea, este redus veridic conținutul aminoacizilor liberi: esențiali (de 2,3 și 1,5 ori, respectiv), neesențiali (de 1,2 ori în ambele grupe de vârstă), imunoactivi (de 1,4 și 1,1 ori), cetogeni (de 2,2 și 1,6 ori).

Analiza profilului de aminoacizi în sânge la copiii cu epilepsie (tabelul 1), indică la faptul, că cel mai redus este concentrația aspartatului (de 2,1 și 1,9 ori, respectiv), treoninei (de 2,6 și 1,6 ori), asparaginei (de 1,9 și 1,6 ori), glutamatului (de 1,5 și 1,8 ori), glutaminei (de 1,2 și 2,7 ori), fenilalaninei (de 1,7 și 1,6 ori), triptofanei (de 1,1 și 1,8 ori) lizinei (de 3,0 și 1,7 ori), argininei (de 2,0 și 1,8 ori), și în special a histidinei (de 3,7 și 2,7 ori). Histidina în organism se transformă în histamină, care are funcția de neuromediator. Creșterea conținutului de histamină în sângele pacienților cu epilepsie și în lichidul cefalorahidian, mai ales în epilepsia de lob temporal [31], poate explica scăderea conținutului de histidină în sângele acestor copii, identificat de noi.

Conținutul redus de aminoacizi dicarboxilici (tabelul 1), care a fost depistat în rezultatul investigației, corelează cu datele obținute de Starovoitova T.E. (2011). Aspartatul și glutamatul sunt implicați în descompunerea amoniacului [16], facilitând conversia amoniacului în uree netoxică, care este apoi eliminată din organism. Acești aminoacizi fac parte din grupul de neuromedatori excitatori într-un șir de structuri ale creierului și măduvei spinării și împreună cu glucoza servesc ca sursă de hrană pentru creier. Acest lucru se datorează capacității lor de a fi oxidați în mitocondrii, trecând prin etapa formării acidului

cetoglutaric la un randament de energie stocată sub formă de ATP. Necesitatea organismului în acești aminoacizi, într-o astfel de situație, crește considerabil, deoarece în acest caz ei servesc în calitate de adaptogen specific [21].

Astfel, concentrația scăzută de aminoacizi dicarboxilici în serul copiilor bolnavi poate indica, în primul rând, la o lipsă de alimentare cu energie a creierului, iar în al doilea rând, la o prezență posibilă a encefalopatiei, identificată în această patologie de mai mulți autori [11, 12, 31]. Acest lucru este confirmat în studiul nostru, deoarece a fost observată o creștere veridică a conținutului de amoniac în sânge și o scădere a indicelui *glutamină/amoniac* de la valoarea $2,17 \pm 0,41$ la copiii sănătoși, până la $0,85 \pm 0,41$ pentru copii cu vârsta până la 2 ani și $0,34 \pm 0,11$ la copiii de 3-8 ani. În prezent, nu există nici o îndoială, că procesele energetice și mediatoare în țesuturile creierului sunt strâns legate. Astfel, ATP fiind principala sursă de energie, de rând cu aceasta, interacționează cu sistemul glutamic, elemente ale cărui la rândul său sunt glutamatul (mediator de excitare) și GABA (de inhibiție).

Prezintă interes faptul, că odată cu vârsta la copiii cu sindrom epileptic scade nivelul de aminoacizi liberi cu conținut de sulf – dacă în grupul de control conținutul acestora este în medie de $17,57 \pm 4,67$ mkm/100 ml, atunci la copiii de până la 2 ani – $23,79 \pm 4,07$ mkm/100 ml, iar la copii de 3-8 ani – $19,68 \pm 2,37$ mkm/100 ml. Compararea fluctuațiilor grupurilor sulfhidrilice cu modificările structurale în celule a permis să se concluzioneze, că ele sunt întotdeauna precedate de modificări distructive ale celulelor nervoase [8]. În experiența noastră, creșterea conținutului total de aminoacizi cu conținut de sulf este însoțită de un dezechilibru al concentrațiilor lor individuale. Astfel, dacă nivelul de acid cistic a crescut semnificativ (de 2,7 și 5,6 ori) și a cisteinei (de 2,9 și 2,5 ori), atunci a metioninei este redus semnificativ (de 1,4 și 1,5 ori), iar a taurinei este redus de 1,6 ori la copiii din grupa de vârstă mai mare, comparativ cu cea de control. Un astfel de deficit de taurină este destul de esențial, dacă luăm în considerație că taurina are un efect inhibitor asupra activității neuronilor bulbului rahidian [21]. Recent, problema participării taurinei la dezvoltarea epilepsiei este discutată în mod activ. Este remarcat rolul său în menținerea tonului citoplasmei și în posibila mișcare transmembranară a ionilor de Ca^{2+} și a altor cationi. Deficitul de taurină duce la inhibarea activității ATP-azei Na^{+} , K^{+} , Mg^{2+} -dependente, agravând astfel condițiile pentru polarizarea membranei, ceea ce creează oportunități pentru epileptogeneză [26].

Este remarcabil, că concentrația de homocisteină, care este un produs al metabolismului aminoacizilor liberi cu conținut de sulf, la copiii cu vârstă mai mare diagnosticați cu epilepsie, depășește norma de 1,5 ori. Cu vârsta, defectele reacției de remetilare a homocisteinei duc la homocisteinemie și homocisteinurie, ceea ce poate fi exprimată la copii prin prezența convulsiilor și prin dezvoltarea de numeroase dereglări, inclusiv a vederii, sistemului cardiovascular, retardarea în statură și în dezvoltare, etc [25]. În final, nivelul sporit de homocisteină în plasmă este un marker al stresului oxidativ [28]. Într-adevăr, în conformitate cu datele literaturii, stresul oxidativ joacă un rol important în procesele de epileptogeneză [16]. Dezvoltarea stresului oxidativ în epilepsie este argumentat, în primul rând, de faptul că pe fondul hipoxiei tisulare locale în focarul epileptic apare o activare a catabolismului adenozintrifosfat și a altor compuși ai fosforului. Aceasta duce la o acumulare excesivă a formelor active de oxigen, la activarea peroxidării lipidice

și a ionilor NH^{4+} , care amplifică procesele de depolarizare a membranelor. Stresul oxidativ agravează semnificativ supraexcitarea receptorilor glutamatului și poate contribui la deteriorarea acestora [16].

Posibilitatea de a utiliza aminoacizii cu conținut de sulf ca markeri ai nivelului de sănătate a fost demonstrată în investigațiile Ciochină V.K. și coautorii (2011). Conținutul și raportul de aminoacizi cu conținut de sulf joacă un rol crucial în menținerea stării funcționale a tuturor sistemelor de bază a corpului. Putem presupune, că dezechilibrul de aminoacizi cu conținut de sulf identificat de noi, are un efect deteriorant asupra structurilor cerebrale, participând la formarea sindromului epileptic.

Conținutul GABA în sângele pacienților cu epilepsie, de asemenea, a crescut cu vârsta, comparativ cu grupul de control de 2,1 ori (tabelul 1). GABA este considerat cel mai important neuromediator cu acțiune de inhibiție, care se elimină în 50% din celulele nervoase din creier. În prezent, pe scară largă este răspândită "GABA – teoria" epileptogenezei, conform căreia insuficiența acțiunii GABA-ergice contribuie la hiperstimularea neuronilor, precum și la formarea focarului de epilepsie și a sistemelor epileptice. Metabolismul GABA este strâns asociat cu piridoxina și acidul glutamic, din care se formează prin decarboxilarea acestuia [7]. Trebuie remarcat faptul că GABA contribuie în energetica creierului prin punerea în aplicare a șuntului GABA. Deci, în cortexul cerebral, raportul reacțiilor GABA-șunt și a ciclului acizilor tricarboxilici este de aproximativ 1:1. Aceasta este o modalitate de generare a energiei în condițiile deficitului ei în SNC, precum și de protecție împotriva deteriorărilor hipoxice în condiții extreme. Este demonstrat, că dereglarea asigurării cu energie provoacă epileptogeneza [15].

Un interes sporit prezintă posibila implicare a glicinei în epileptogeneză. Ca și GABA, ea inhibă activitatea neuronală la toate nivelurile de SNC, dar maximal – în măduva spinării și trunchiul cerebral. Concentrația glicinei la copiii cu epilepsie crește odată cu vârsta (de la 1,2 ori la copiii din grupa celor mici, la 1,4 ori la copiii din grupa celor mai mari de vârstă). Funcția sa constă în activarea receptorilor glicinei localizați pe membrana postsinaptică. După interacțiunea cu glicina, membrana receptorilor glicinei se hiperpolarizează, ceea ce provoacă efectul de frânare [1]. În plus față de efectele inhibitorii nemijlocite, glicina poate afecta activitatea neuronală printr-o legătură strânsă cu metabolismul de glutamină, deoarece ea inhibă glutaminsintetaza. Posibil, reducerea de glutamină, identificată de către M.Bulak (2005) în timpul paroxismului epileptic, poate fi explicată anume prin acest fapt. Mai mult decât atât, glicina este precursorul multor compuși importanți: triptofan, histidină, carbamoilfosfat, glucozamina-6-fosfat [20, 21].

În continuare, a fost depistată o creștere constantă a conținutului de etanolamină (de 1,4 și 1,9 ori, respectiv), care este un precursor al acetilcolinei și fosfatidelor, care sunt implicate în procesele metabolice ca substraturi ale respirației tisulare, pe fondul schimbărilor alternative ale serinei (în scădere de 1,5 ori la copiii cu vârsta până la 2 ani și în creștere de 1,3 ori la copiii de 3-8 ani). Acumularea în sânge a etanolaminei se poate datora sintezei deficitare de fosfatidiletanolamină ca rezultat al scăderii activității etanolaminkinazei, care realizează această reacție [33]. La tulburările metabolice ale serinei sunt marcate unele manifestări clinice ale leziunilor neurologice, în special,

retardare psihomotorie [33], caracteristică epilepsiei [12, 13, 17]. Acest fapt este în concordanță cu scăderea raportului *serină/etanolamină* de la $6,32 \pm 0,75$ în grupul de control la $3,11 \pm 0,71$ la copiii cu epilepsie în grupul de până la 2 ani și $4,35 \pm 1,13$ în grupul de 3-8 ani.

Este, în general, recunoscut faptul că la baza fenomenelor patologice din creier stau dereglările biochimice, printre care un loc aparte îi aparține metabolismului neuromediatorilor. Interacțiunea dintre neuromediatorii excitatori cu receptorii lor duce la creșterea permeabilității membranei postsinaptice pentru ionii de Na^+ din contul deschiderii canalelor de Na^+ -hemodependente. Se dezvoltă depolarizarea membranei postsinaptice și generarea potențialului postsinaptic de excitare. Neuromediatorii de inhibiție, interacționând cu receptorii lor, provoacă creșterea permeabilității membranei postsinaptice pentru ionii de Cl^- și K^+ , rezultând hiperpolarizarea membranei postsinaptice și generarea potențialului postsinaptic de inhibiție. Odată cu aceasta, formarea focarului epileptic și a activității epileptice generalizate este asociată cu fenomenul de dezinhibiție al neuronilor, care se caracterizează printr-o tendință a acestora de a genera și răspândi potențial postsinaptic excitator. Acest fapt este cauzat de un dezechilibru între neuromediarea de excitare și cea de inhibiție [13]. În experimentele noastre, a fost studiat raportul concentrațiilor a AAL de *inhibiție/excitare* în serul sanguin al copiilor sănătoși și celor cu epilepsie de vârste diferite. În cazul copiilor sănătoși el constituia $1,12 \pm 0,29$, iar la cei cu vârsta de până la 2 ani – $1,61 \pm 0,31$, crescând în mod semnificativ cu vârsta, până la $2,30 \pm 0,68$. La baza acestui fenomen în cazul epilepsiei se pot afla următoarele procese [1]:

- dereglarea sintezei neuromediatorilor – supraproducția de neuromediatorii excitatori sau micșorarea sintezei celor de inhibiție;
- eliberarea necorespunzătoare a neuromediatorilor în fanta sinaptică;
- modificarea sensibilității receptorilor – sensibilitate crescută la mediatorii excitatori și reducerea sensibilității receptorilor la mediatorii de inhibiție;
- deteriorarea receptorilor mediatorilor excitatori și de inhibiție (receptorii glutamatului);
- dereglarea eliminării neuromediatorilor din fanta sinaptică.

În orice caz, formarea focarului epileptogen este asociată cu metabolismul neuromediatorilor AAL, iar raportul aminoacizilor liberi de inhibiție/excitare în serul sanguin poate îndeplini funcția de semnal al formării lui în creier. În lucrările mai multor cercetători [5, 6] se indică la o creștere a conținutului de AAL excitatori în momentul crizei de epilepsie. A fost elucidată o reducere a conținutului de aminoacizi excitatori, care poate fi explicată prin faptul că investigațiile profilului de aminoacizi în serul sanguin, la copii, au fost efectuate în perioada de remisie. Aminoacizii stimulatori sunt necesari pentru toate funcțiile vitale ale creierului, inclusiv menținerea tonului lui, stării de veghe, activității fizice și psihice, în reglementarea comportamentului, învățării, memoriei, de aceea micșorarea constantă a lor în sânge, identificată în investigațiile noastre, poate condiționa prezența depresiei, a tulburărilor cognitive [17].

Variația conținutului lor indică la faptul că există, de fapt, toate aceste afecțiuni, însă proporția fiecăreia dintre ele variază de la caz la caz.

În continuare au fost determinați indicii comparativi care caracterizează starea funcțională a ficatului, pancreasului și a

glandei tiroide (Fig. 2).

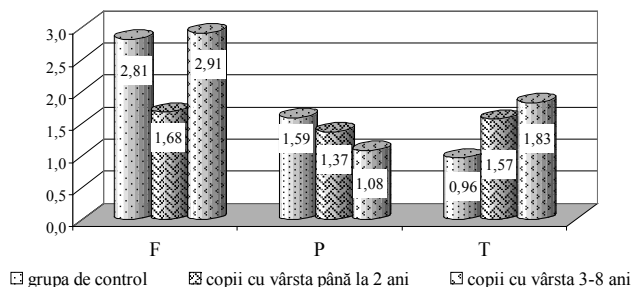


Fig.2: Indicii comparativi care caracterizează starea funcțională a ficatului, pancreasului și a glandei tiroide, la copiii cu epilepsie.

Analiza aprofundată a spectrelor AAL a arătat că în cazul în care indicele Fisher (F), care reflectă activitatea ficatului, este redus în mod veridic numai la copiii cu epilepsie, în vârstă de până la 2 ani (de 1,7 ori), apoi indicele P, care caracterizează activitatea pancreasului, este redus în ambele grupuri de 1,2 și, de 1,5 ori, respectiv, iar indicele T, care indică la activitatea funcțională a glandei tiroide, respectiv, a crescut de 1,6 și de 1,9 ori. Deci, cu vârsta, schimbările indicilor P și T se agravează. În investigațiile proprii anterioare [4], a fost arătat că indicele T în regiunea noastră a crescut semnificativ ($1,20 \pm 0,12$), fiind o particularitate regională în Republica Moldova. Dar chiar și în acest sens, acest indice, la copiii cu epilepsie, este sporit veridic, ceea ce poate indica și la o modificare endocrinologică a nivelului de hormoni tiroidieni și catecolamine.

Prezintă interes faptul că indicele aminoacizi *esențiali/neesențiali* este veridic redus în epilepsie, respectiv de 1,9 și 1,3 ori. A. Gorina (1997), urmărind declinul acestui indice și într-o serie de alte patologii, a sugerat că acest lucru este un indicator nespecific pentru maladiile neurologice.

Astfel, modificările multidirecționale ale profilului de AAL în serul sanguin la epilepsie, identificate în investigațiile noastre, indică la dezechilibrul lor. Rezultatele studiilor noastre anterioare și actuale [4, 27], precum și datele literaturii de specialitate [22], fac probabilă presupunerea că dereglările metabolismului AAL, în special a celor dicarboxilici, cu conținut de sulf, aminoacizilor neuromediatorii, precum și AAL ai ciclului de ornitină, influențează dezvoltarea disfuncțiilor structurilor creierului.

În continuare, a fost efectuată determinarea IMA în urina de dimineață a copiilor de diferite vârste, sănătoși și celor cu epilepsie (tabelul 3).

Tabelul 3

Conținutul comparativ al indicilor metabolismului azotat în urina copiilor de diferite vârste, a grupei de control și celor cu sindrom epileptic (mg/100 ml).

Indicii metabolismului azotat	Grupa de control	Copii cu vârsta până la 2 ani	Copii cu vârsta 3-8 ani
Acid cistic	$2,06 \pm 0,19$	$2,20 \pm 0,54$	$1,48 \pm 0,30^*$
Taurină	$5,25 \pm 0,58$	$3,21 \pm 0,59^*$	$6,97 \pm 1,58^*$
Acid aspartic	$1,15 \pm 0,21$	$0,51 \pm 0,08^*$	$0,89 \pm 0,08^*$
Hidroxiprolină	$2,65 \pm 0,37$	$3,84 \pm 0,49^*$	$1,77 \pm 0,43^*$
Treonină	$1,25 \pm 0,14$	$0,69 \pm 0,10^*$	$0,86 \pm 0,16^*$
Serină	$4,50 \pm 0,41$	$1,70 \pm 0,43^*$	$3,43 \pm 0,84^*$
Asparagină	$0,88 \pm 0,13$	$0,47 \pm 0,09^*$	$1,07 \pm 0,22^*$

Acid glutamic	0,80±0,08	0,26±0,05*	1,17±0,23*
Glutamină	7,50±1,05	3,58±0,52*	6,08±1,48*
Acid α-aminoadipic	0,40±0,05	0,16±0,04*	0,19±0,05*
Prolină	1,60±0,24	1,40±0,26	1,73±0,28
Glicină	8,25±1,40	8,74±1,65	15,86±3,40*
Alanină	3,60±0,40	3,65±0,69	4,07±0,94
Citrulină	0,30±0,05	0,22±0,04*	0,28±0,05
Acid α-aminobutiric	0,28±0,05	0,18±0,04*	0,19±0,02*
Valină	1,90±0,14	0,17±0,03*	0,35±0,08*
Cisteină	4,00±0,52	0,84±0,14*	1,23±0,30*
Homocisteină	0,28±0,02	0,29±0,04	0,39±0,06*
Metionină	0,43±0,06	0,19±0,03*	0,50±0,13*
Cistationină	0,30±0,05	0,48±0,10*	0,55±0,12*
Izoleucină	0,65±0,05	0,22±0,04*	0,53±0,14*
Leucină	1,05±0,14	0,21±0,04*	0,46±0,09*
Tirozină	1,05±0,12	1,10±0,13	2,26±0,56*
Fenilalanină	0,65±0,10	0,45±0,09*	0,93±0,17*
β-alanină	0,55±0,08	0,24±0,06*	0,83±0,19*
Acid β-aminobutiric	0,65±0,09	0,42±0,05*	0,82±0,18*
Acid γ-aminobutiric (GABA)	0,28±0,03	0,08±0,02*	0,14±0,02*
Etanolamină	1,25±0,21	0,88±0,21*	0,46±0,05*
Triptofan	0,80±0,09	0,56±0,12*	0,51±0,03*
Ornitină	0,58±0,05	0,33±0,08*	0,44±0,11*
Lizină	1,70±0,22	0,99±0,21*	2,02±0,46*
Histidină	6,50±0,98	4,23±0,45*	12,77±2,28*
1-metilhistidină	2,00±0,24	0,54±0,13*	4,97±0,80*
3-metilhistidină	1,50±0,24	0,72±0,10*	2,01±0,43*
Arginină	1,25±0,18	0,41±0,08*	0,71±0,14*
Uree	1075,00±96,75	169,40±42,30*	313,81±56,14*
Amoniac	32,50±2,28	14,88±3,26*	8,72±1,97*
ΣAAL	65,04±7,15	43,90±2,87*	78,95±5,37*
ΣIMA	1172,54±152,43	228,19±43,57*	401,47±55,83*
ΣNeesențiali	33,33±5,33	22,25±1,95*	37,80±4,37*
ΣEsențiali	15,18±1,37	8,10±0,59*	19,65±2,39*
ΣImunoactivi	18,15±1,82	8,92±1,05*	13,72±1,79
ΣGlicogeni	19,65±2,75	15,45±1,62*	25,46±4,38
ΣCetogeni	5,90±0,71	3,53±0,39*	6,72±0,71*
ΣAminoacizi cu conținut de sulf	12,04±1,32	6,96±0,88*	11,14±2,06

* P ≤ 0,05

Analiza indicilor metabolismului azotat ai urinei de dimineață a relevat faptul, ca la copiii cu epilepsie are loc hipoaminoaciduria, la cei până la 2 ani (conținutul redus de AAL de 1,5 ori) și o hipoaminoacidurie neînsemnată la cei de 3-8 ani (de 1,2 ori). Nivelul produselor finale ai IMA sunt reduși semnificativ, comparativ cu grupa de control la toți pacienții cu epilepsie: ureea, respectiv, de 3,4 și 6,3 ori, amoniacul de 2,2 și 3,7 ori.

În urina copiilor până la 2 ani, concentrațiile totale ale aminoacizilor grupelor funcționale de bază sunt reduse: celor neesențiali de 1,5, esențiali de 1,9, imunoactivi de 2,0, ketogeni

și celor cu conținut de sulf – de 1,7 ori. La copiii din grupa de vârstă mai mare este scăzut numai conținutul aminoacizilor imunoactivi de 1,3 ori, în timp ce concentrația de aminoacizi esențiali și glicogeni a crescut de 1,3 ori, celelalte grupe de aminoacizi erau în intervalul de valori ale grupului de control. La copiii din grupul cu cea mai mică vârstă, hipoaminoaciduria este exprimată în mod mai semnificativ, o tendință similară a conținutului total al grupelor funcționale de bază de AAL, poate fi, de asemenea, observată în serul copiilor cu epilepsie, din grupul de până la 2 ani. Analiza literaturii și datele proprii permit de a concluziona următoarele:

Compararea spectrelor de aminoacizi în serul sanguin și urină indică la faptul, că în ambele cazuri, la copiii cu epilepsie, este redus conținutul unor aminoacizi, cum ar fi aspartatul, treonina, glutamina, leucina și izoleucina, triptofanul, ornitina, arginina. De asemenea, este redus nivelul de uree, IMA și concentrației totale de AAL imunoactivi. În același timp, în ambele grupe de vârstă este scăzută excreția acizilor α-aminoadipic și α-aminobutiric, cisteinei, etanolaminei, amoniacului, iar în serul sanguin se produce acumularea lor.

Astfel, în grupul de copii cu vârsta până la 2 ani, modificări caracteristice pentru epilepsie le constituie hipoaminoacidemia, combinată cu hipoaminoaciduria (de 1,5 ori, în fiecare caz). În ambele grupe de vârstă este observat un dezechilibru în sânge al aminoacizilor cu conținut de sulf.

Coefficientul AAL de *inhibiție/excitare*, care crește la epilepsie, precum și coeficienții *serină/etanolamină*, *glutamină/amoniac* și *uree/amoniac*, aminoacizi *esențiali/neesențiali*, care se micșorează – pot servi ca markeri ai acestei patologii (Fig. 3).

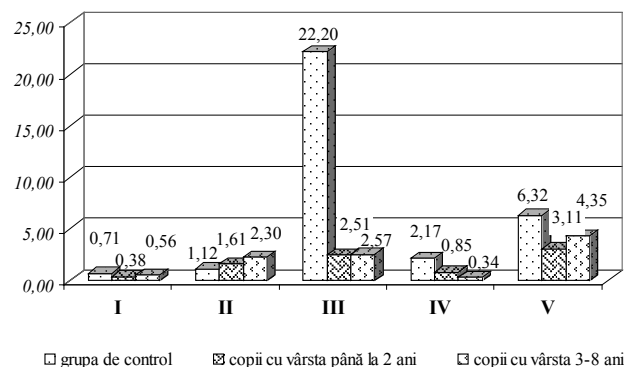


Fig. 3: Indicii comparativi ai raporturilor unor AAL și produși finali, care caracterizează particularitățile metabolismului azotat la copiii cu epilepsie. I – esențiali/neesențiali; II – de inhibiție/excitație; III – uree/amoniac; IV – glutamină/amoniac, V – serină/etanolamină

În final, o analiză comparativă a modificărilor în profilul de AAL în serul sanguin, indică la faptul, că acestea sunt mai semnificative la copiii cu vârsta de 3-8 ani. Acest fapt confirmă acumularea de tulburări metabolice în organismul copiilor din grupa de vârstă mai mare, ceea ce condiționează statistica cunoscută a creșterii procentului de manifestare a simptomelor clinice ale epilepsiei cu vârstă.

Se poate concluziona că descărcările epileptice provocate de hiperpolarizarea neuronilor, ca urmare a dereglării metabolismului lor și puse în aplicare sub formă de crize, duc treptat la schimbări profunde în metabolismul celulelor creierului. Se formează un sistem închis epileptic, cu multe niveluri, care include tulburări metabolice și neuromediatoare, a proceselor de microcirculație în creier, dezvoltarea stresului

oxidativ în celulele nervoase. Dereglările bioenergetice și ale homeostaziei ionice duc la schimbări semnificative ale metabolismului neuromediator, la sporirea nivelului de neuromedii excitatori, care au efect excitotoxic ce stă la baza formării generatorilor excitației patologice sporite și formării sistemelor cerebrale patologice stabile [16]. Astfel, la baza acestor dereglări stau modificări patologice asociate ale diverselor mecanisme biochimice – electrolitice, energetice, mediatore [9, 10]. Este confirmat conceptul academicianului T.Furdui (2012), conform căruia sănătatea mentală este realizată de sistemele neurofiziologic integrat și neurochimic al creierului, determinate de programul genetic de dezvoltare a organismului, precum și de sistemele psihofuncționale și de evaluare-executare, care se formează în ontogeneză, sub influența factorilor mediului înconjurător.

Concluzii

1. Formarea focarului epileptic și a activității epileptice generalizate este asociată cu fenomenul de dezinhibiție al

neuronilor, care se caracterizează prin tendința acestor neuroni spre generarea și răspândirea potențialului postsinaptic excitator. Dereglările bioenergetice și ale homeostaziei ionice duc la schimbări semnificative în metabolismul neuromediator, precum și la dezvoltarea stresului oxidativ al celulelor.

2. În perioada de remisie se observă creșterea nivelului de AAL de inhibiție, sporirea indicelui AAL de *inhibiție/excitație*, scăderea indicelui *serină/etanolamină*. Cel mai semnificativ sunt reduși indicii *glutamină/amoniac* și *uree/amoniac*. Modificările acestor indici se agravează cu vârsta, iar ei pot fi utilizați în diagnosticul acestei patologii.

3. Profilul de aminoacizi al copiilor diagnosticați cu epilepsie este însoțit de un dezechilibru pronunțat al aminiacizilor cu conținut de sulf și de scăderea indicelui aminoacizilor esențiali/neesențiali, ceea ce permite utilizarea lor în calitate de marker nespecific al nivelului de sănătate.

4. La copiii diagnosticați cu epilepsie, odată cu vârsta, are loc o acumulare de tulburări metabolice ai aminoacizilor liberi.

Bibliografie

1. Булак М. Эпилепсия, ионные каналы и гены. // Невролог. и психиат. 2005; 105:12: 59-61.
2. Буланов Ю.Б. Анаболические средства. М.: Советский спорт, 2007. – 240 с.
3. Воронкова К.В. Фокальные формы эпилепсии у детей: интеллектуальное развитие и варианты нарушений высших психических функций: Автореф. дис. канд. мед. наук. М. 2002. – 27 с.
4. Гараева С.Н., Редкозубова Г.В., Постолати Г.В. Аминокислоты в живом организме. Кишинев, 2009. – 550 с.
5. Горина А.С. Аминокислоты и их метаболиты при неврологических заболеваниях у детей Дисс. канд. биол. наук, Иркутск, 1997.
6. Горина А.С., Колесниченко Л.С., Осокин В.В. Особенности обмена аминокислот у детей, страдающих эпилепсией. // Тезисы докладов международного симпозиума "Восстановительная неврология - 3". Иркутск, 1995. – С. 23 – 24.
7. Дроздов В.А., Дроздова М.В. Справочник психотерапевта. М., 2005.
8. Дудина Ю.В. Структурная реорганизация слуховой коры при височной эпилепсии. Дисс. докт. мед. наук. Владивосток, 2008.
9. Зенков Л. Р. Клиническая эпилептология (с элементами нейрофизиологии). М.: ООО Медицинское Информационное Агентство, 2002. – 415 с.
10. Зенков Л.Р. Бессудорожные эпилептические энцефалопатии с психиатрическими, коммуникативным и поведенческими расстройствами. // Вестник эпилептологии. М., 2004. – 1(02). – С. 7–11.
11. Калинин В.В и др. Психические расстройства при эпилепсии. Пособие для врачей. М.: ООО «Печатный город», 2006. – 27 с.
12. Калинин В.В. Психиатрические проблемы эпилептологии и нейропсихиатрии. // Соц. и клин. психиат. М., 2003. – 3. – С. 5–11.
13. Королева Н.Ю., Воронкова К.В., Тарабрин П.А. Нарушения когнитивных функций у больных с эпилепсией, влияние антиэпилептической терапии и коррекция нарушений. // Consilium Medicum., 2010. - №4 - С. 12-18.
14. Косенко Е.А. Внутриклеточные механизмы токсичности аммиака. Дисс. док. биол. наук. Пушино, 1999. – 217 с.
15. Лелевич В.В., Виницкая А.Г., Лелевич С.В. Современные представления об обмене гамма-аминомасляной кислоты в головном мозге // Нейрохимия, 2009. - N4. - С.275-281.
16. Литовченко Т.А. Эпилепсия: терминология, эпидемиология, классификация, этиология, патогенез // Нейро News, 2010. - № 2. - С. 27-33.
17. Машилов К.В., Жигарева Е.Б., Коган Б.М. Психологические особенности подростков, страдающих эпилепсией // Системная психология и социология, 2011. - №4. - С. 9-13.
18. Петрухин А.С. Эпилептология детского возраста. М.: Медицина, 2000. – 624 с.
19. Прусаков В.Ф. Клинико-эпидемиологическая характеристика детской эпилепсии в г. Казани // Казанский медицинский журнал, 2006. – Т.87. - №2. – С. 111-114.
20. Раевский К.С., Георгиев В.П. Медиаторные аминокислоты. М., 1986. – 184 с.
21. Раевский К.С. Возбуждающие аминокислоты, патология ЦНС и пути ее фармакологической коррекции. В: Итоги науки и техники. Сер. физиология чел-ка и ж-х. Т.36. «Возбуждающие аминокислоты как нейромедиаторы». М., 1989, - С. 148-176.
22. Старовойтова Т.Е. Закономерности изменения пула свободных аминокислот в биологических жидкостях у детей с аутизмом. Дисс. канд. мед. наук, Иркутск, 2011.
23. Чокинэ В.К., Гараева С.Н., Невоя А.В. и др. Серосодержащие аминокислоты в диагностике, целенаправленном поддержании и формировании здоровья. В: Известия Академии Наук Молдовы. Науки о жизни, 2011. - №3(315). - С.15-35.
24. Фурдуй Ф.И. Чокинэ В.К. Психосанокреатологическая концепция. Генетически и онтогенетически обусловленные системы, участвующие в формировании и поддержании психического здоровья. В: Известия Академии Наук Молдовы. Науки о жизни, 2012. - №3(318) - С.4-23.
25. Шевченко О.П. Гомоцистеин. М.: Реафарм, 2005. – 87 с.
26. Шомахова М.М., Лебедева А.В., Ершов А.В. и др. Предикторы нарушений когнитивных функций при эпилепсии // Журн. неврол. психиат., 2011. - Т.111. - № 5, вып. 2. - С. 65-71.
27. Leorda A., Garaeva S., Furdui V., Redcozubova G., Postolati G. Particularitățile metabolismului azotat la persoanele cu excluziune socială ca factor morbidogen asupra sănătății psihice // Studia Universitatis. Științe reale. 2013. - Nr. 1(61). – P. 38-42.
28. Aukrust P., Berge R., Muller F. a.oth. Elevated plasma levels of reduced homocysteine in common variable immunodeficiency – a marker of enhanced oxidative stress // Eur.J.Clin.Invest., 1997. - 27, - №9. – P. 723-730.
29. Bourgeois V.F. Antiepileptic drugs, learning and behavior in childhood epilepsy. *Epilepsia*, 1998. - 39(9). – P. 913–922.
30. Bromfield E.B. Cerebral metabolism and depression in patients with complex partial seizures // *Epilepsia*, 1990. – 31. – P. 625–626.
31. Coulter D.L. Epilepsy and mental retardation: an overview // *Am. J. Ment. Retard.*, 1993. – 98. – P. 1–11.
32. Fisher R.S., van Emde Boas W., Elger W. C. et al. Epileptic seizures and epilepsy definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) // *Epilepsia*, 2005. – V.46. – P. 470–472.
33. Zschocke J., Hoffmann G. *Vademecum Metabolicum Manual of Metabolic Paediatrics*. Germany, Milupa GmbH, 2004.