

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Klinik für Allgemeine Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Freiburg im Breisgau

**Defizienz der lysosomalen sauren Lipase (LAL-D) bei Kindern und
Erwachsenen mit Steatosis hepatis oder Leberzirrhose unklarer
Genese: eine retrospektive Suche anhand histologischer Schnitte
aus Leberbiopsaten**



Inaugural- Dissertation

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2018
von Theresia Weissgerber
geboren in Mannheim

Dekan
Erstgutachter
Zweitgutachter
Jahr der Promotion

Prof. Dr. Norbert Südkamp
Prof. Dr. Patrick Gerner
PD Dr. Gian Kayser
2019

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Einleitung	2
2.1 Definition.....	3
2.2 Klinische Phänotypen (Wolman-Krankheit und CESD)	4
2.3 Pathogenese	6
2.4 Genetik	7
2.5 Epidemiologie.....	9
2.6 Diagnose	11
2.6.1 Laborparameter.....	12
2.6.2 Leberpathologie	13
2.6.3 Bildgebung	16
2.6.4 LAL-Enzymaktivitätsmessung	18
2.6.5 Gensequenzierung.....	19
2.7 Therapie	20
2.7.1 Statine.....	20
2.7.2 Lebertransplantation	21
2.7.3 Stammzelltransplantation	22
2.7.4 Enzymersatztherapie	23
2.8 Prognose.....	28
3. Ziel der Arbeit	31
4. Material und Methoden	32
4.1 Material.....	32
4.1.1 Patientenkollektiv	32
4.2 Methodik	33
4.2.1 Pathologische Befundung	34
4.2.2 Mikroskopie.....	34
4.2.2.1 Färbung.....	35
4.2.2.2 Vergrößerung.....	36
4.2.3 Klinische Daten	37
4.2.3.1 Laborparameter	37

4.2.3.2 Body-Mass-Index (BMI)	39
4.2.3.3 Alter.....	40
4.2.4 Einschlusskriterien	41
5. Ergebnisse	42
5.1 Studienverlauf	43
5.2 Patientenkollektiv	45
5.2.1 Geschlecht	45
5.2.2 Alter.....	48
5.2.3 BMI.....	50
5.2.4 Laborwerte	54
5.3 Pathologische Befunde	56
5.4 Befunde der Mikroskopie	57
5.4.1 Differentialdiagnosen	58
5.4.2 Patienten des letzten Studienschrittes	61
5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	73
6. Diskussion	75
6.1 Herausforderungen der Studie.....	75
6.2 Einschlusskriterien	76
6.3 Prävalenz	79
6.4 Optimierung der Diagnosestellung	81
7. Zusammenfassung.....	83
8. Referenzen	84
9. Anhang	92
9.1 Abbildungsverzeichnis	92
9.2 Tabellenverzeichnis	95
9.3 Eidesstattliche Versicherung	96
9.4 Danksagung.....	97

1. Abkürzungsverzeichnis

LAL-D	Lysosomale saure Lipase Defizienz
LAL	Lysosomale saure Lipase
CESD (engl.)	Cholesterol ester storage disease, Cholesterinester-Speicherkrankheit
WD (engl.)	Wolman disease, Wolman-Erkrankung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BMI	Body-Mass-Index
LDL-C	Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin
HDL-C	High-Density- Lipoprotein-Cholesterin
NAFLD (engl.)	Non-alcoholic fatty liver disease, nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
HeFH	Heterozygote familiäre Hypercholesterinämie
SREBP2 (engl.)	Sterol-regulatory-element-binding-protein-2, Sterol-regulatorisches Element-bindendes Protein 2,
ABCA1 (engl.)	ATP-binding-cassettes A1, ATP-Bindungsstelle A1
LAMP (engl.)	Lysosome associated membrane protein, Lysosom-assoziiertes Membranprotein
LIMP (engl.)	Lysosomal integral membrane protein, Integrales Lysosommembranprotein
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
PAS- Färbung (engl.)	Periodic Acid Schiff reaction, Periodsäure-Schiff-Reaktion

2. Einleitung

Die lysosomale saure Lipase Defizienz (LAL-D) ist eine seltene angeborene Störung des Cholesterinmetabolismus. Dabei ist die Enzymaktivität der lysosomalen sauren Lipase (LAL) stark verringert oder gänzlich nicht vorhanden. Je nach restlicher Enzymaktivität zeigen sich zwei Phänotypen der Erkrankung: bei Fehlen der LAL kommt es zur Wolman-Krankheit, die unbehandelt bei über 90 % zum Versterben im Säuglingsalter führt. Der Erstbeschreiber dieser Erkrankung ist Moshe Wolman, ein israelischer Pathologe, der die Erkrankung im Jahr 1956 beschrieb (Abramov et al., 1956).

Ist eine Restaktivität des Enzyms vorhanden, spricht man von LAL-D, die früher als Cholesterinester-Speicherkrankheit (CESD) bezeichnet wurde. Betroffene können an verfrühter Atherosklerose leiden. Obligatorisch ist eine mikrovesikuläre Leberverfettung, die zur Leberfibrose und im fortgeschrittenen Stadium zur Leberzirrhose mit folglich portaler Hypertension und Leberversagen führt. Die Lebenserwartung ist daher bei vielen Patienten stark reduziert.

Aufgrund der Seltenheit dieser Erkrankung ist sie nicht oder nur wenig bekannt. Zusätzlich dazu zeigen Patienten mit LAL-Mangel ein ähnliches Symptombild wie Betroffene anderer Erkrankungen, wie z.B. NASH oder NAFLD, die weitaus häufiger auftreten. Dies hat zur Folge, dass viele Erkrankte falsch oder gar nicht diagnostiziert werden und daher eine inadäquate Therapie erhalten, welche zum vorzeitigen Versterben der Patienten führt (Burton et al., 2015b; Freudenberg et al., 2013; Meikle et al., 1999; Muntoni et al., 2007; Reynolds, 2013, 2013).

Positiv ist die Tatsache, dass seit Kurzem eine Enzymersatztherapie mit Sebelipase alfa existiert. Mit dieser kann die Erkrankung kausal therapiert werden. Die Neuheit des Medikamentes lässt noch keine Langzeitstudien und somit keine aussagekräftigen Prognosen zu. Bisherige Studien zeigten aber eine gute Wirksamkeit des Medikamentes (Paton, 2016; Su et al., 2016).

Es ist daher wichtig, auf diese seltene Erkrankung aufmerksam zu machen und sie bei Patienten mit erhöhten Leberwerten und einer unklaren Leberverfettung in Betracht zu ziehen. Bei frühzeitiger Diagnose können die richtigen Therapieschritte eingeleitet und den Patienten geholfen werden. Diese Arbeit soll dazu beitragen, bei Ärzten und anderen behandelnden Berufsgruppen eine höhere Sensibilität gegenüber der Erkrankung und dem Potential der neuen Therapie zu schaffen.

2.1 Definition

Die lysosomale saure Lipase Defizienz (LAL-D) ist eine seltene autosomal-rezessive, lysosomale Speichererkrankung (Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Paton, 2016; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Su et al., 2016). Ursächlich dafür sind verschiedene Mutationen im LIPA-Gen, welches für die lysosomale saure Lipase (LAL) kodiert (Bernstein et al., 2013; Paton, 2016; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013). Diese Mutationen führen entweder zu einem kompletten Fehlen oder einer verringerten Aktivität des Enzyms. Die LAL-D ist durch die Anhäufung von Cholesterinestern und Triglyzeriden in vielen Geweben, besonders in der Leber, Milz und den Lymphknoten, gekennzeichnet. Es handelt sich um eine progressive Erkrankung, die zu den klinischen Manifestationen, wie zum Beispiel mikrovesikulärer Lebersteatose, Hepatosplenomegalie, Leberzirrhose, Dyslipidämie und Atherosklerose, führt (Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Desai and Md, 2000; Elleder et al., 1990; Fredrickson, 1963; Freudenberg et al., 2013; Paton, 2016; Reiner, 2013; Reynolds, 2013).



Abbildung 1 Organe, die bei einer LAL-D von einer Verfettung betroffen sind.

2.2 Klinische Phänotypen (Wolman-Krankheit und CESD)

Der LAL-Mangel äußert sich klinisch in zwei verschiedenen Phänotypen, die sich in ihrer Ausprägung unterscheiden. Beim vollständigen Fehlen des Enzyms handelt es sich um die Wolman-Krankheit (Desai et al., 1987; Freudenberg et al., 2013; Hoeg et al., 1984; Maciejko et al., 2017; Pisciotta et al., 2017; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Valayannopoulos et al., 2017; Wolman et al., 1961). Ist die lysosomale saure Lipase noch zu einem Teil vorhanden und aktiv, tritt die später einsetzende und meist milder verlaufende CESD ein (A-Kader, 2017; Aslanidis et al., 1996; Baratta et al., 2015; Beaudet et al., 1977; Bernstein et al., 2013; Boldrini et al., 2004; Burton et al., 2017; D'Agostino et al., 1988).

Wolman beschrieb 1956 erstmals die sehr seltene angeborene Wolman-Krankheit. (Abramov et al., 1956). Dabei beträgt die LAL-Enzymaktivität weniger als 1 % oder fehlt vollständig. Die Erkrankung manifestiert sich meist in den ersten Lebenswochen und ist schnell progredient, sodass erkrankte Kinder ohne eine entsprechende Therapie in der Regel im Alter von sechs Monaten bis einem Jahr versterben (Ben-Haroush et al., 2003; Bernstein et al., 2013; Boldrini et al., 2004; Burton et al., 2015b, 2017; Castro et al., 1999; Reiner et al., 2014). Die Säuglinge zeigen eine Gedeihstörung, Wachstumsretardierung, Hepatosplenomegalie, Malabsorption, Aszites, Diarrhoe, Erbrechen, progressive Anämie und schwere Leberfunktionsstörungen, welche letztendlich zu Multiorganversagen führen (A-Kader, 2017; Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Castro et al., 1999; Milan Elleder et al., 2000; Nchimi et al., 2003; Pisciotta et al., 2017; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013). Typisch für die Wolman-Krankheit ist die Verkalkung der Nebennieren, welche jedoch nur bei circa 50 % der Kinder auftritt (Freudenberg et al., 2013).

Die CESD wurde 1963 von Fredrickson beschrieben (Fredrickson, 1963). Dabei handelt es sich um eine Erkrankung mit einem sehr variablen Symptomspektrum. Die LAL-Aktivität ist auf 1 % bis ungefähr 12 % reduziert (Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Desai and Md, 2000; Elleder et al., 1990; Fredrickson, 1963; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013). Das Manifestationsalter erster Symptome reicht von einem bis 44 Jahren, häufig treten diese jedoch in den ersten zwei Lebensdekaden auf (Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Reiner et al., 2014).

Das mittlere Alter für den Beginn der Erkrankung liegt sowohl bei Männern als auch bei Frauen bei fünf Jahren (Bernstein et al., 2013). Oftmals bleiben die Symptome lange Zeit unerkant oder werden aufgrund von überschneidender und ähnlicher Differentialdiagnosen fehldiagnostiziert. Zu den gängigen Differentialdiagnosen der CESD zählen die NAFLD, NASH, HeFH (A-Kader, 2017; Chora et al., 2017; Reiner et al., 2014). Typische Symptome sind unter anderem eine Steatosis hepatis, eine Hepatomegalie, Leberzirrhose, Dyslipidämie, erhöhte Aminotransferaselevel (Alanin-Aminotransferase und/oder Aspartat-Aminotransferase), erhöhte Cholesterol-, Triglyzerid- und LDL-Werte. Zusätzlich ist das HDL erniedrigt (Aqul et al., 2014; Baratta et al., 2015; Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Decarlis et al., 2009; Pisciotta et al., 2017). Die Patienten leiden schließlich gehäuft an verfrühtem Leberversagen, beschleunigter Atherosklerose und chronischer Hyperlipidämie. (Ambler et al., 2013; Aslanidis et al., 1996; Burton et al., 2017; Chatrath et al., 2009; D'Agostino et al., 1988; Decarlis et al., 2009; M. Elleder et al., 2000; Milan Elleder et al., 2000; Riva et al., 2008). Anders als bei NASH-Patienten, ist der BMI der CESD-Patienten normwertig oder gar erniedrigt, da sie sich meistens durch niedriges Wachstum und geringes Gewicht auszeichnen (Bernstein et al., 2013; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013).

2.3 Pathogenese

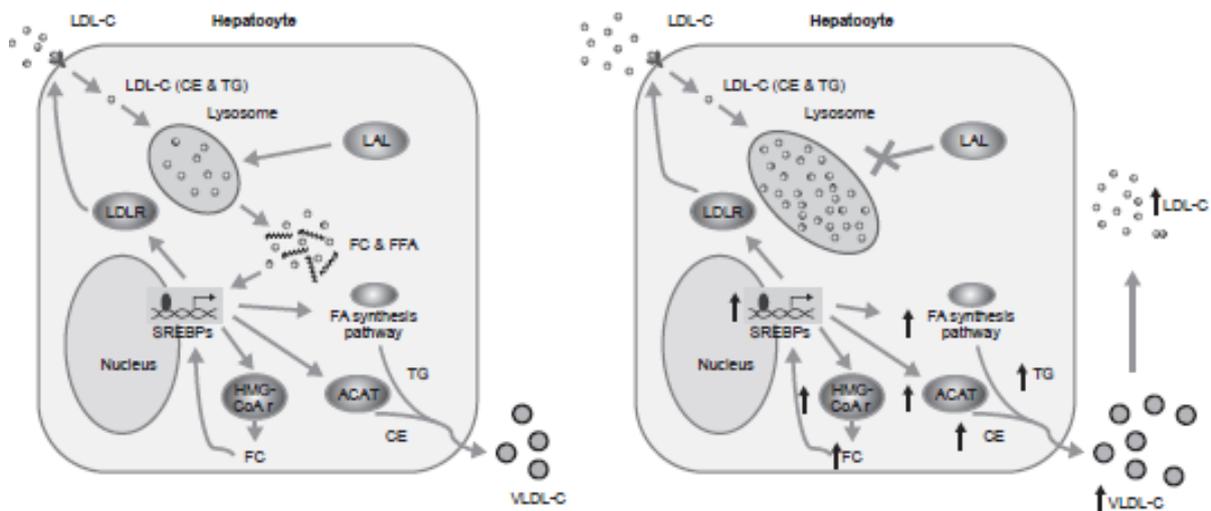


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Cholesterin-Regulierung beim Gesunden (links) und bei Patienten mit LAL-D (rechts). CE, Cholesterinester; FA, Fettsäuren; FC, freies Cholesterin; FFA, freie Fettsäuren.

Die lysosomale saure Lipase spielt eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel. Sie katalysiert die Hydrolyse von Cholesterinestern und Triglyceriden in den Lysosomen (Reynolds, 2013). Diese werden mittels Endozytose als LDL in die Zelle aufgenommen und in die Lysosome transportiert, wo sie schließlich abgebaut werden (Reiner et al., 2014). Bei der Hydrolyse entstehen freies Cholesterin und freie Fettsäuren, welche als Mediatoren für das Cholesteringleichgewicht in den Zellen dienen (Reiner et al., 2014). Das freie Cholesterin gelangt aus den Lysosomen in das Zytoplasma und dann in das endoplasmatische Retikulum. Dort reguliert es die Cholesterinsynthese, indem es durch negatives Feedback die HMG-CoA-Reduktase hemmt (Reiner et al., 2014; Weiskirchen, 2017). Zusätzlich führt es zu einer verminderten SREBP-2-vermittelten Expression der LDL-Rezeptoren auf den Zellen (Reiner et al., 2014). Dadurch wird in der Folge weniger LDL in die Zelle aufgenommen.

Ist durch eine Mutation im LIPA-Gen nun die LAL-Enzymaktivität vermindert oder gar nicht mehr vorhanden, kann der oben beschriebene Regelkreis nicht mehr stattfinden.

Dies hat zur Folge, dass Cholesterinester und Triglyceride in den Lysosomen akkumulieren und weder freies Cholesterin noch freie Fettsäuren in das Zytoplasma der Zellen gelangen. Aufgrund der Akkumulation der Cholesterinester und Triglyceride schwellen die Lysosomen an (Reynolds, 2013).

Durch die Abnahme von freiem Cholesterin im Zytoplasma kann das Membranprotein ABCA1 (ATP-binding cassettes A1) kein Cholesterin an der Zelloberfläche präsentieren, sodass es folglich nicht vom Apolipoprotein A1 gebunden werden kann und somit kein HDL gebildet wird (Bernstein et al., 2013; Reynolds, 2013).

Als weitere Konsequenz kommt es zum Ausbleiben der Hemmung der Cholesterinsynthese und zur fortlaufenden Expression von LDL-Rezeptoren. Das führt einerseits zu einer vermehrten Synthese von Cholesterin und Apolipoprotein B (Bernstein et al., 2013). Zusätzlich dazu wird durch die erhöhte LDL-Rezeptoranzahl immer mehr LDL in die Zelle aufgenommen, was zur weiteren Anhäufung von Triglyzeriden und Cholesterinestern führt (Bernstein et al., 2013; Reynolds, 2013).

2.4 Genetik

Das LIPA-Gen, welches für die lysosomale saure Lipase kodiert, befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 10 an Genlocus q23.2-q23.3 und besteht aus zehn Exons und neun Introns, die sich über eine Länge von 36,5 kb DNA erstrecken (Anderson et al., 1993; Rajamohan et al., 2015; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Su et al., 2016). Die entsprechende mRNA ist 2,6 kb lang und enthält 1200 Nukleotide (Anderson et al., 1993; Aslanidis et al., 1996; Lohse et al., 2000; Maslen et al., 1995; Pagani et al., 1998; Reiner et al., 2014). Das daraus resultierende LAL-Enzym besteht aus 378 Aminosäuren und hat ein molekulares Gewicht von 45,4 kDa (Hoeg et al., 1984; Rajamohan et al., 2015; Reynolds, 2013). Die LAL-Defizienz ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, sodass bei

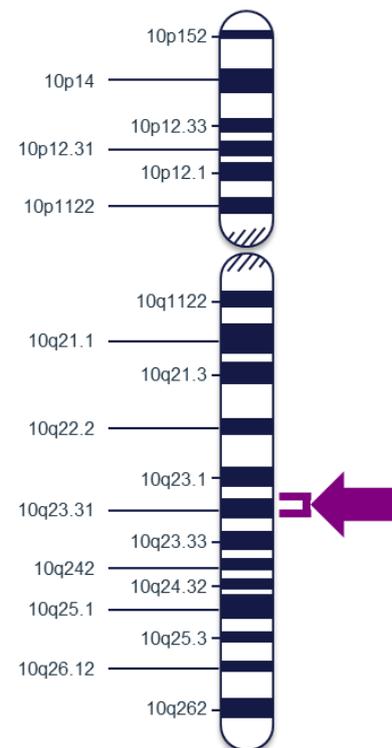


Abbildung 3 Genlocus des LIPA-Gens auf Chromosom 10, q23.-2-q23.3.

Betroffenen meist eine homozygote oder kombinierte heterozygote Ausprägung vorliegt (Aslanidis et al., 1996; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Ries et al., 1996; Seedorf et al., 1995; Su et al., 2016).

Es sind momentan über 40 Mutationen des LIPA-Gens bekannt, die zu der Wolman-Krankheit oder der CESD führen (Ameis et al., 1995; Bernstein et al., 2013; Hoeg et al., 1984; Jones et al., 2014; Maslen et al., 1995; Pagani et al., 1998; Rajamohan et al., 2015; Su et al., 2016).

Bei der Wolman-Erkrankung gibt es 19 bekannte Mutationen, davon stellen Deletions- und Insertionsmutationen die Mehrzahl dar (Aslanidis et al., 1996; Bernstein et al., 2013; Rajamohan et al., 2015; Reiner et al., 2014). Daneben gibt es noch die Nonsense-, Spleiß- und Missense-Mutationen (Aslanidis et al., 1996; Bernstein et al., 2013; Gasche et al., 1997; Pisciotta et al., 2009; Rajamohan et al., 2015; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Seedorf et al., 1995).

Es gibt 32 bekannte Mutationen, die zum Auftreten der CESD führen (Bernstein et al., 2013; Gasche et al., 1997; Pisciotta et al., 2009; Rajamohan et al., 2015; Zhang and Porto, 2013). Die Mehrheit sind Missense-Mutationen, gefolgt von Deletions- und Insertionsmutationen, Nonsense-Mutationen und Spleiß-Mutationen (Bernstein et al., 2013; Lohse et al., 2000; Pagani et al., 1998). Die vorherrschende Mutation bei CESD-Patienten ist die exon-8-splice-site-Mutation (E8SJM-Mutation) (Bernstein et al., 2013; Rajamohan et al., 2015; Reynolds, 2013). Diese macht 50 % - 60 % aller CESD-Mutationen aus (Aslanidis et al., 1996; Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Rajamohan et al., 2015). Dabei handelt es sich um eine Spleiß-Mutation in Exon 8, bei der das Nukleotid Guanin gegen Adenin an der Spleißstelle ausgetauscht ist (Rajamohan et al., 2015). Durch die mutierte Spleißstelle kommt es zu einem fehlerhaften Spleißen, wodurch 24 Aminosäuren in dem fertigen Protein verloren gehen (Bernstein et al., 2013; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013). Da jedoch ein geringer Teil, circa 2 % - 4 %, der mRNA korrekt gespleißt wird, bleibt bei der E8SJM-Mutation eine Restaktivität von ungefähr 3 % - 8 % der normalen lysosomalen sauren Lipase vorhanden (Bernstein et al., 2013; Rajamohan et al., 2015; Reiner et al., 2014).

2.5 Epidemiologie

Eine genaue Angabe zur Prävalenz lässt sich sehr schwer machen, da viele Patienten dieser Erkrankung fehldiagnostiziert werden (Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Chatrath et al., 2009; Elleder et al., 1990; Fasano et al., 2012; Maciejko et al., 2017; Pericleous et al., 2017; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Su et al., 2016). Es bleibt nur, die ungefähre Prävalenz zu berechnen.

Der aktuellen Studienlage nach haben ungefähr 50 % bis 60 % der CESD-Patienten die oben erwähnte E8SJM-Mutation im LIPA-Gen (Bernstein et al., 2013). In einem Populationsscreening, das im Rahmen einer Studie von Muntoni et al. (Muntoni et al., 2007) durchgeführt wurde, wurde unter gesunden Westdeutschen eine Heterozygotenfrequenz von eins in 200 Personen festgestellt. Demnach ist die Heterozygotenfrequenz für alle LIPA-Genmutationen eins in circa 100. Unter Verwendung der Hardy-Weinberg-Gleichung kann man dementsprechend eine ungefähre Prävalenz von eins zu 40.000 berechnen (A-Kader, 2017; Bernstein et al., 2013; Muntoni et al., 2007; Pericleous et al., 2017; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013).

Diese Berechnung der Prävalenz galt für die untersuchte Kohortengruppe von Mitteleuropäern. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich die Häufigkeit der LIPA-Genmutationen unter ethnischen Gruppen unterscheidet. Eine Studie im Raum Los Angeles ergab, dass die iranisch-jüdische Bevölkerung eine solche Heterozygotenfrequenz für eine LIPA-Genmutation aufweist, das ungefähr eins von 4.200 lebendgeborenen Säuglingen mit der Wolman-Krankheit zur Welt kamen (Reynolds, 2013). Eine andere Untersuchung ergab eine Prävalenz von unter eins in 700.000 Menschen in Australien (Meikle et al., 1999).

In der afrikanischen und asiatischen Bevölkerung gibt es nur vereinzelte Fälle eines LAL-Mangels, sodass es keine validen Angaben oder Berechnungen für eine Prävalenz gibt (Bernstein et al., 2013).

Table 1 Estimated E8SJM allele frequency and CESD prevalence among different populations

Population	E8SJM allele frequency	CESD population prevalence (per million)
Germany ¹⁵	1 in 200	25
USA ¹⁹		
Caucasian	1 in 300	8
Hispanic	1 in 300	8
Ashkenazi Jewish	1 in 500	3
Asian	1 in 1,000	1

Abbreviations: CESD, cholesterol ester storage disease; E8SJM, exon 8 splice junction mutation.

Abbildung 4 E8SJM-Mutationsfrequenz und Prävalenz der CESD in verschiedenen Populationen.

Diese Zahlen für die errechnete Prävalenz der Erkrankung zeigen einen Widerspruch mit der Anzahl der dokumentierten Fälle. Dies beweist die Vermutung, dass es sich bei dieser Erkrankung um eine häufig fehl- oder nichtdiagnostizierte Krankheit handelt.

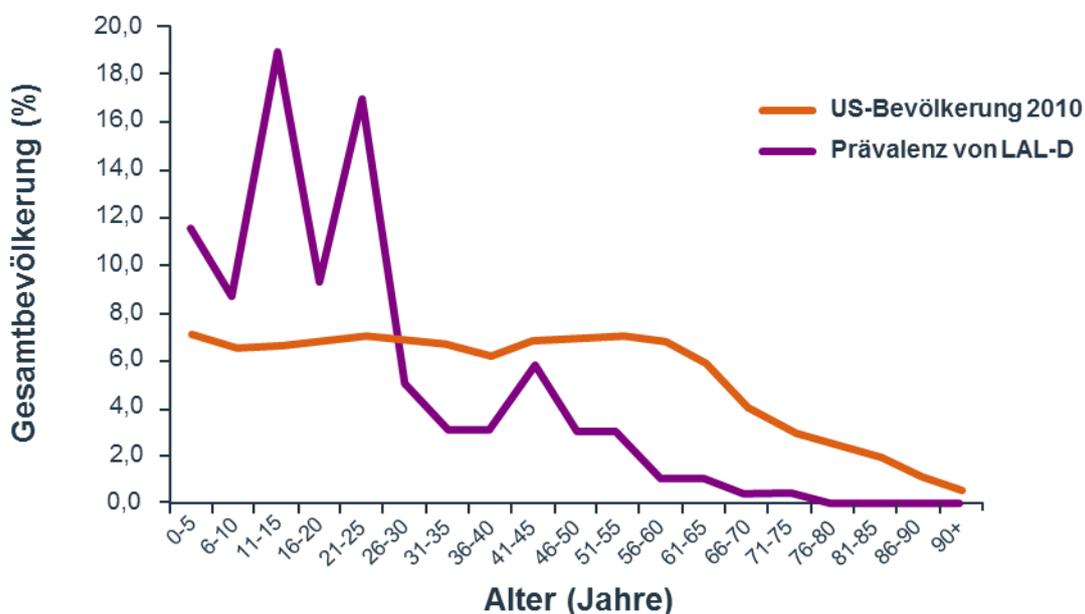


Abbildung 5 Altersverteilung der US-Bevölkerung (rot) und aller bekannten LAL-D-Patienten (violett) im Jahr 2010.

Das Diagramm zeigt drei Altersspitzen in der Prävalenz der LAL-D. Die höchste Prävalenz von LAL-D Patienten liegt in einer Altersgruppe von 10 bis 20 Jahren und beträgt nahezu 20 %. Die zweite Altersspitze liegt in der Altersgruppe von 21 bis 25 Jahren und beträgt 17 %. Ab einem Alter von 30 Jahren sinkt die Prävalenz stetig mit einer einmaligen starken Erhöhung im Alter von 40 bis 50 Jahren. Patienten mit einer LAL-D über 76 Jahren sind nicht bekannt, sodass die Prävalenz für diese Altersgruppe 0 % ergibt. Dieses Bild zeigt die typische Verteilung des Diagnosealters der Patienten. Die meisten LAL-D Patienten werden in ihren ersten zwei Lebensdekaden diagnostiziert. Jedoch gibt es in der milder verlaufenden Krankheitsform noch eine zweite Diagnosespitze im Alter von 40 bis 50 Jahren.

2.6 Diagnose

Um die Diagnose einer LAL-Defizienz zu stellen, bedarf es einer gründlichen Untersuchung der Patienten. Eine Kombination von verschiedenen Pfeilern stützt die Diagnosestellung. Dabei versucht man in erster Linie minimal-invasive Methoden zu verwenden, da diese schonender für die Patienten und meistens auch kostengünstiger sind. Falls diese Methoden jedoch zu keiner ausreichend sicheren Diagnose führen können, erweitert man das Repertoire auf die invasive Diagnostik. Bei der LAL-Defizienz reicht es häufig nicht aus, lediglich einen Diagnoseschritt durchzuführen, da dies dazu führen könnte, dass man die Erkrankung aufgrund der Seltenheit und Ähnlichkeit zu anderen Erkrankungen fehldiagnostiziert.

Ein wichtiges Merkmal in der Diagnostik der Erkrankung ist die oben beschriebene klinische Präsentation der Patienten. Sie liefert wichtige Informationen zum Gesundheitsstatus, ist jedoch für die Erkrankung nicht spezifisch, sodass Patienten anhand einer alleinigen klinischen Diagnose oft fehldiagnostiziert werden.

Mithilfe ergänzender Diagnostik wie der Blutentnahme, der Sonographie und der radiologischen Bildgebung kann die Diagnose weiter eingegrenzt werden.

Seit einigen Jahren gibt es die Möglichkeit der Aktivitätsmessung der lysosomalen sauren Lipase, die als sehr zuverlässige Methode gilt. Die Enzymaktivitätsmessung wird daher schon jetzt für das Screening von Menschenpopulationen in Rahmen von Studien genutzt.

In einzelnen Fällen wird mittels der invasiven Leberbiopsie die Leberpathologie nach histologischen Merkmalen des LAL-Mangels inspiziert. Dies hilft in der Diagnosestellung, gestaltet sich aber häufig als ungenau, da die gängigen Differentialdiagnosen oftmals ein ähnliches histologisches Bild zeigen.

Als häufig letzte Möglichkeit bedient man sich der Gensequenzierung. Damit lassen sich genaue Angaben zu genetischen Mutationen im LIPA-Gen machen. Für ein Screening greift man dennoch lieber auf die kostengünstigere Variante der Aktivitätsmessung zurück.

2.6.1 Laborparameter

Patienten mit einem LAL-Mangel zeigen oftmals ein typisches Muster der Blutfette und der Serumtransaminasen. Bei nahezu allen Patienten mit CESD sind die Triglyzeride und das Gesamt-Cholesterin erhöht (Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Chatrath et al., 2009; Cummings and Watts, 1995; Decarlis et al., 2009; Goldstein et al., 1975; Todoroki et al., 2000). Darüber hinaus liegt häufig eine Erhöhung des LDL-Cholesterin und eine Erniedrigung des HDL-Cholesterin vor (Baratta et al., 2015; Beaudet et al., 1977; Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Cummings and Watts, 1995; D'Agostino et al., 1988; Decarlis et al., 2009; Elleder et al., 1990; Pisciotta et al., 2017; Todoroki et al., 2000).

Bei Kindern mit der Wolman-Krankheit können das Plasmatriglyzeridlevel und das Cholesterinlevel jedoch auch im Normwert liegen (Quinn et al., 2014; Reiner et al., 2014).

Sowohl bei CESD-Patienten als auch bei Wolman-Patienten sind die Serumtransferasen Alanin-Aminotransferase und Aspartat-Aminotransferase oft schon sehr früh erhöht. Sie dienen in der Diagnostik als erste Indikatoren einer Leberschädigung (Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013).

2.6.2 Leberpathologie

Die lysosomale Anhäufung von Cholesterinestern und Triglyzeriden zeigt sich im Leberparenchym in Gestalt von diffuser mikrovesikulärer Steatose, welche man unter dem Lichtmikroskop sieht. Diese betrifft über die Leber hinaus auch die Kupferzellen und die Makrophagen im gesamten Körper, die dadurch mikroskopisch schaumzellig erscheinen (Chatrath et al., 2009; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Tandra et al., 2011; Thelwall et al., 2013; Todoroki et al., 2000; Weiskirchen, 2017).

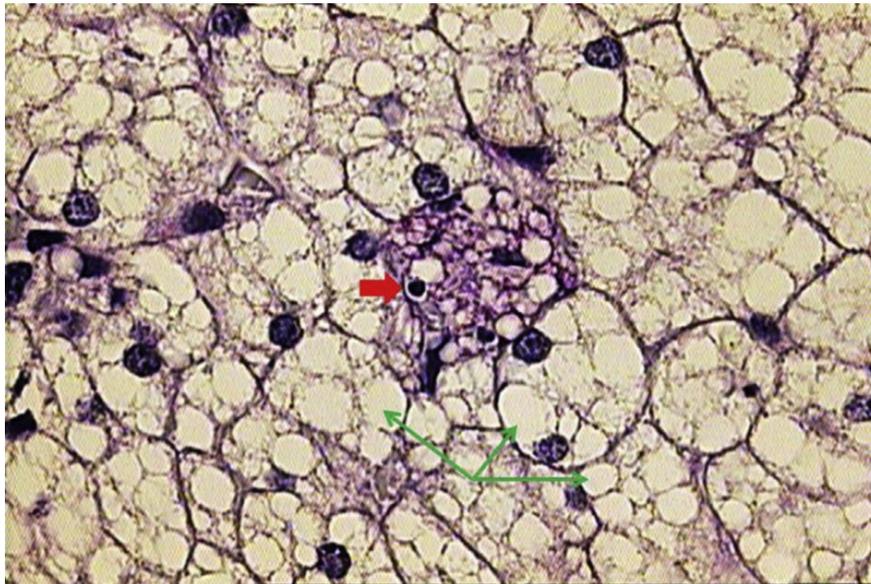


Abbildung 6 Histologisches Bild einer CESD. Mikrovesikuläre Steatose (grüne Pfeile) und Kupferzellen/Schaumzellen (roter Pfeil) in der PAS-Färbung.

Die mikrovesikuläre Steatose der Leber führt zur Fibrose und schließlich zur mikronodulären Leberzirrhose (Beaudet et al., 1977; D'Agostino et al., 1988; Freudenberg et al., 2013; Tandra et al., 2011, 2011; Thelwall et al., 2013; Todoroki et al., 2000). Im Schnittpräparat von Leberproben zeigt sich je nach Progressionsstadium der Erkrankung ein Mischbild von mikrovesikulärer Verfettung, Fibrose und/oder Leberzirrhose. Bei der Wolman-Krankheit sind zusätzlich Milz, Lymphknoten, Darm und Nebennieren betroffen (Burton et al., 2015b; Hůlková and Elleder, 2012; Reynolds, 2013; Todoroki et al., 2000; Weiskirchen, 2017). Die mikrovesikuläre Steatose ist jedoch nicht beweisend für die CESD, da es auch bei anderen Erkrankungen zu einer feinvesikulären Verfettung kommen kann (Harrison, 2016; Ozmen et al., 1992).

Mithilfe der Immunhistochemie lässt sich der Verdacht auf einen LAL-Mangel diagnostisch weiter konkretisieren: die lysosomalen Marker LAMP1, LAMP2, LIMP2 und Cathepsin D sind sehr spezifisch für CESD und stellen damit einen wichtigen Pfeiler in der Diagnose dieser Erkrankung dar (Hůlková and Elleder, 2012).

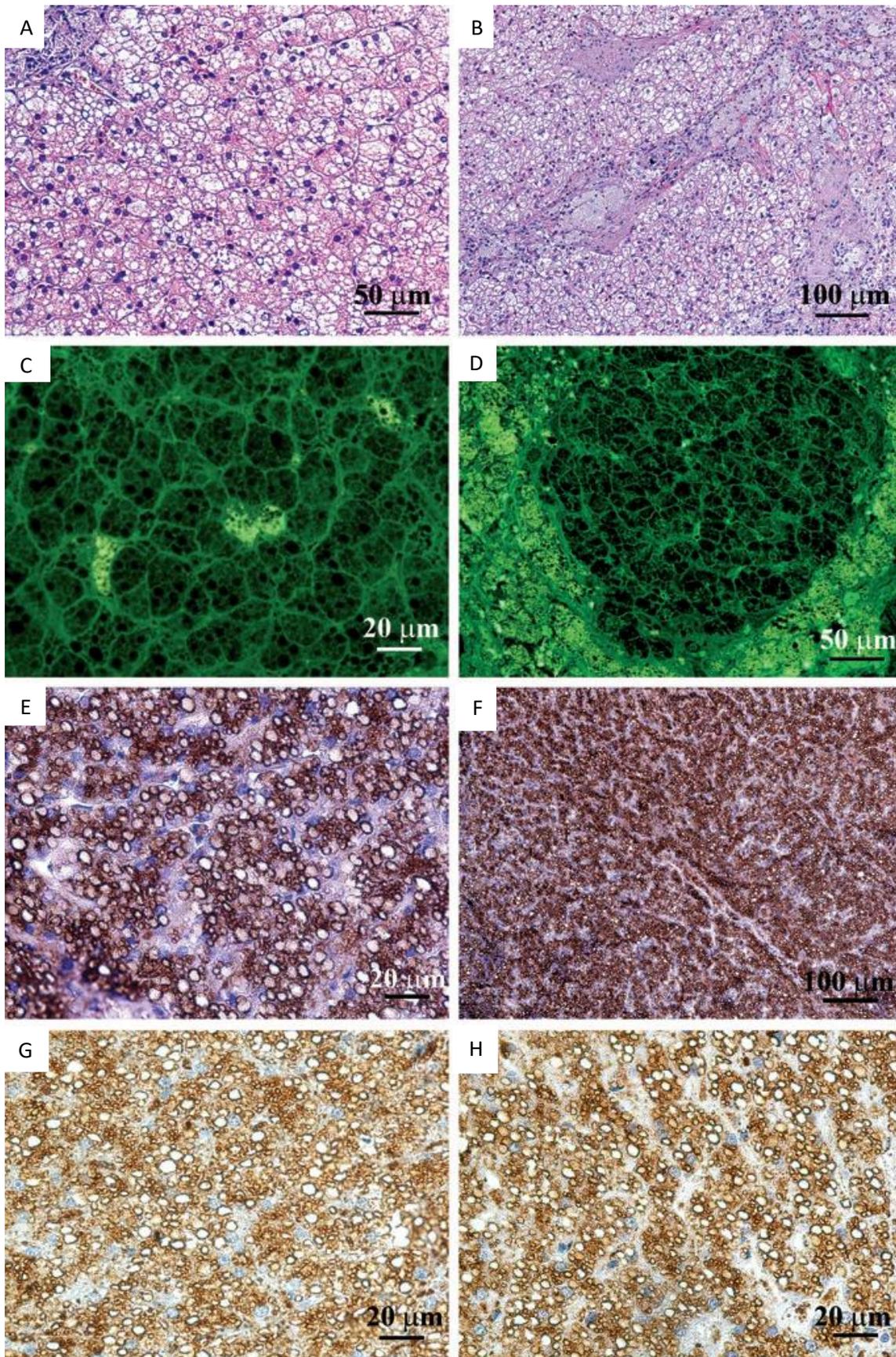


Abbildung 7 Histologisches Bild einer CESD.(A) Mikrovesikuläre Steatose im Frühstadium der Erkrankung;(B) Mikrovesikuläre Steatose mit Fibrose zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung (HE-Färbung);(C),(D) Fluoreszenzfärbung unter ultraviolettem Licht,(C) Frühstadium,(D) Fortgeschrittenes Stadium;(E)-(H) Immunfärbung mit lysosomalen Markern,(E),(F) Cathepsin D als Immunmarker;(G) LAMP2 als Immunmarker,(H) LIMP2 als Immunmarker.

Auch die Untersuchung unter dem Elektronenmikroskop hilft bei der Diagnosestellung. Bei mehr als der Hälfte der Patienten kann man die pathognomischen nadelförmigen Cholesterinesterkristalle in den Hepatozyten und Kupferzellen beobachten (Bernstein et al., 2013; Freudenberg et al., 2013).

Bemerkenswert ist außerdem, dass schon die makroskopische Betrachtung erste Hinweise auf das Vorliegen der Erkrankung liefern kann, da die Leberproben von LAL-Patienten Unterschiede zu gesunden Lebern zeigen. Sie sind aufgrund der massiven Verfettung und Cholesteroleinlagerung häufig orange-gelblich verfärbt (Bernstein et al., 2013). Der Cholesterinspiegel der Leber bei diesen Patienten ist im Vergleich zu gesunden Lebern ungefähr 100 bis 200-mal erhöht (Reynolds, 2013).

Wie in einem Fallbericht des Mount Sinai Hospitals New York berichtet wurde, kann sich die mikrovesikuläre Steatose bereits pränatal manifestieren (Desai et al., 1987). Bei einem 17 Wochen alten Fetus wurden die für LAL-D typischen Leberveränderungen wie die Cholesterinesterakkumulation und die mikrovesikuläre Steatose beschrieben. Zusätzlich zeigte sich eine massive Nekrosebildung der Nebennieren. So konnte durch die zusätzliche Bestimmung der LAL-Aktivität schon pränatal in der 17. Schwangerschaftswoche eine LAL-Defizienz diagnostiziert werden (Desai et al., 1987).

2.6.3 Bildgebung

Die radiologische Bildgebung stellt eine potentielle Alternative zur invasiven Leberbiopsie dar.

Bei Säuglingen mit der Wolman-Krankheit zeigen sich Nebennierenverkalkungen bereits früh in der Sonographie und in Röntgenuntersuchungen (Ozmen et al., 1992; Reynolds, 2013; Saito et al., 2012; Sen et al., 2015). CT- und MRT-Untersuchungen stellen zusätzlich Nebennierennekrosen dar (Fulcher et al., 1998; Thelwall et al., 2013).



Abbildung 8 Leberultraschall mit Hepatomegalie und Verkalkung der Nebenniere (Pfeile).



Abbildung 9 Röntgenbild: Man erkennt hervortretende Dünndarmschlingen und die Verkalkung der Nebenniere (Pfeile).

Sonographisch und computertomographisch können Fettansammlungen im gesamten Darm gefunden werden. Darüber hinaus sieht man in der Sonographie im Dünndarm in vielen Fällen eine Verdickung einzelner Darmwandabschnitte (Boldrini et al., 2004; Castro et al., 1999; Fulcher et al., 1998; Nchimi et al., 2003).

In einer allgemeinen Abdomensonographie zeigt sich meist eine Hepatomegalie, häufig begleitet von einer Splenomegalie (Boldrini et al., 2004; Castro et al., 1999; Ozmen et al., 1992). Diese Befunde führen in Kombination mit erhöhten Lipidwerten im klinischen Alltag nicht selten dazu, dass die CESD im Rahmen einer Routineuntersuchung als Zufallsbefund diagnostiziert wird.

Die Hepatomegalie kann sich selbstverständlich auch bei einer CT-Untersuchung zeigen, bei der man darüber hinaus eine Hypodensität des Leberparenchyms sieht. Diese ist das radiologische Korrelat einer massiven Fetteinlagerung der Leber (Ben-Haroush et al., 2003; Boldrini et al., 2004; Fulcher et al., 1998; Ozmen et al., 1992). Auch wenn das hypodense Parenchym für die LAL-Defizienz charakteristisch ist, ist es für das Krankheitsbild nicht pathognomisch, da auch die gängigen Differentialdiagnosen des LAL-Mangels dieses radiologische Bild aufweisen (Paton, 2016; Su et al., 2016).

Neben all diesen Befunden, lässt sich mittels CT oft auch eine allgemeine, im gesamten Körper verbreitete Lymphadenopathie feststellen (Fulcher et al., 1998; Su et al., 2016).

2.6.4 LAL-Enzymaktivitätsmessung

Eine minimalinvasive Methode in der Diagnostik ist die Bestimmung der LAL-Enzymaktivität in Trockenblut („dried blood spot“, DBS). Früher wurde die Enzymaktivität in Fibroblasten, Leukozyten und Lebergewebe gemessen (Dairaku et al., 2014; Hamilton et al., 2012; Lukacs et al., 2017; Reiner et al., 2014). Da diese Materialien aber unspezifisch für LAL sind, wurde diese Methode von der Messung in Trockenblut, mit welcher man Betroffene sehr gut entdecken kann, verdrängt (Reiner et al., 2014).

Die gesamte Lipasenaktivität wird mittels der fluorometrischen Substanz 4-Methylumbelliferyl-Palmitat gemessen. Im Anschluss daran wird der LAL-Inhibitor Lalistat 2 verwendet, um selektiv die LAL-Aktivität zu hemmen (Dairaku et al., 2014; Hamilton et al., 2012; Lukacs et al., 2017; Reynolds, 2013). Bei einer darauffolgenden, abermaligen Messung der Lipasenaktivität zeigt sich eine Verminderung zu dem davor gemessenen Wert. Aus der Differenz der beiden Werte ergibt sich die Enzymaktivität der lysosomalen sauren Lipase (Dairaku et al., 2014; Hamilton et al., 2012; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013).

Der Nachteil dieser Methode ist, dass Enzymaktivitäten unter 3 % nicht mehr erkannt werden, sodass eine Unterscheidung zwischen der Wolman-Krankheit, bei der die Enzymaktivität bei unter 1 % liegt und der CESD auf diesem Wege nicht möglich ist (Reiner et al., 2014).

Die Trockenblutmessung hat sich aber ansonsten als so effizient und valide erwiesen, dass es für zahlreiche Screeningprogramme genutzt wird. Es wird außerdem diskutiert, ob man die Messung in das Neugeborenen-Screening für Stoffwechsel- und Hormonerkrankungen, welches in der Regel am dritten Lebensstag durchgeführt wird, aufnehmen sollte, um so Säuglinge mit einem angeborenen LAL-Mangel zu detektieren und frühzeitig behandeln zu können (Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013).

2.6.5 Gensequenzierung

Die Gensequenzierung des LIPA-Gens wurde weitgehend von der Messung der LAL-Enzymaktivität in Trockenblut ersetzt, da diese einfacher durchzuführen und kostengünstiger ist (Hamilton et al., 2012; Reiner et al., 2014). In einigen seltenen Fällen kann jedoch keine sichere Diagnose anhand der Bildgebung, der Enzymaktivitätsmessung und der Laborparameter gestellt werden. In solchen Fällen hilft die Gensequenzierung oftmals weiter, da sie eine Darstellung des genetischen Status des Patienten ermöglicht (Anderson et al., 1993; Reiner et al., 2014).

Für ein Routinescreening von Patienten ist die Gensequenzierung dennoch nicht geeignet, da es vermutlich noch viele unbekannte Mutationen gibt, die zu einem LAL-Mangel führen und solche von der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nicht erkannt werden würden (Anderson et al., 1993; Aslanidis et al., 1996; Reiner et al., 2014).

2.7 Therapie

Lange Zeit gab es keine kausale Therapie für die LAL-Defizienz. Im Rahmen der Behandlung wurde ein schrittweises Vorgehen von minimal invasiv zu den invasiveren Methoden angewandt. Man therapierte meist symptomatisch mit Statinen, um die Cholesterinwerte der Patienten zu senken. Bei weit fortgeschrittener Erkrankung und Leberbeteiligung im Sinne einer Leberzirrhose entschied man sich häufig für eine Lebertransplantation, um so das Leben der Patienten zu verlängern. Eine andere Therapieoption stellte die Stammzellspende dar.

Heutzutage gibt es mit dem Medikament Sebelipase alfa eine kausale Therapiemöglichkeit. Als Ersatzenzym übernimmt es die Funktion der menschlichen lysosomalen sauren Lipase. Bisherige Studien zur Wirksamkeit und Sicherheit des Medikamentes verliefen positiv. Es bleibt dennoch abzuwarten, wie sich das Medikament langfristig auf die Lipidwerte und das Fortschreiten von Atherosklerose bei LAL-Patienten auswirkt.

2.7.1 Statine

Viele CESD-Patienten werden mit Statinen therapiert. Statine, auch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren genannt, hemmen die HMG-CoA-Reduktase und damit folglich auch die Cholesterinsynthese (Su et al., 2016). Die Statine werden in der Therapie des LAL-Mangels entweder als Monotherapie verabreicht oder häufiger mit anderen Lipidsenkern, wie zum Beispiel Colestyramin oder Ezetimib, kombiniert (Leone et al., 1991; Pericleous et al., 2017; Reynolds, 2013; Tadiboyina et al., 2005). Die verwendeten Statine sind zumeist Simvastatin oder Lovastatin, wobei sich die Lipidwerte unter Therapie mit Lovastatin im Vergleich zu Simvastatin deutlich besserten (Bernstein et al., 2013; Decarlis et al., 2009; Su et al., 2016). Eine Kombination von Ezetimib und Lovastatin scheint zu einer zusätzlichen Verbesserung der Dyslipidämie zu führen (Su et al., 2016; Tadiboyina et al., 2005). Durch die Therapie mit Statinen und der damit einhergehenden Cholesterinsenkung wird das Voranschreiten der vorzeitigen Atherosklerose bei LAL-Patienten in vielen Fällen verlangsamt oder gänzlich unterbunden (Leone et al., 1991; Pericleous et al., 2017; Reiner, 2013).

Jedoch gibt es auch eine große Anzahl von Berichten, die Patienten beschreiben, bei denen es zu keiner Senkung der Lipidwerte durch Statine kam (Quinn et al., 2014).

Es ist zudem wichtig anzumerken, dass Statine zu keinerlei Verbesserung der Leberhistologie beitragen konnten (Bernstein et al., 2013). Auch unter der Statintherapie schritt die Parenchymverfettung und Leberfibrose fort (Reiner et al., 2014). Es sind sogar Patienten bekannt und beschrieben, die trotz einer Therapie mit Statinen eine Lebertransplantation benötigten oder gar an Leberversagen verstarben (Ameis et al., 1995; Di Bisceglie et al., 1990; M. Elleder et al., 2000; Milan Elleder et al., 2000; Gasche et al., 1997; Gautier et al., 1978; Lageron et al., 1985; Leone et al., 1995; Levy et al., 1992; Ries et al., 1996).

Obwohl die Histologie in keinen bekannten Fällen positiv beeinflusst werden konnte, gibt es dokumentierte Fälle mit Verbesserung der Hepatomegalie entsprechend einer Normalisierung des Lebervolumens (Bernstein et al., 2013; Gasche et al., 1997; Levy et al., 1992; Pericleous et al., 2017; Tarantino et al., 1991).

Patienten sprechen unterschiedlich gut auf die Therapie an, weshalb man von keiner sicheren Verbesserung des Gesundheitszustandes der Patienten ausgehen kann. Durch die Statine kommt es in vielen Fällen zu einer Reduktion des kardiovaskulären Risikos (Reiner et al., 2014). Der progressive Charakter der Erkrankung führt jedoch dazu, dass die Pathologien der Leber weiter bestehen bleiben (Bernstein et al., 2013; Reynolds, 2013; Su et al., 2016).

2.7.2 Lebertransplantation

Lebertransplantationen wurden sowohl bei Kindern mit der Wolman-Krankheit als auch bei Erwachsenen mit der CESD durchgeführt (Ambler et al., 2013; Bernstein et al., 2013; Ferry et al., 1991; Leone et al., 1995; Pericleous et al., 2017; Sreekantam et al., 2016). Es gibt jedoch keine befriedigenden und aussagekräftigen Langzeitstudien. Die Aussagen über die Auswirkungen und den potentiellen Nutzen einer Lebertransplantation basieren lediglich auf einzelnen Fallberichten, die veröffentlicht wurden (Ameis et al., 1995; Di Bisceglie et al., 1990; M. Elleder et al., 2000; Milan Elleder et al., 2000; Gasche et al., 1997; Gautier et al., 1978; Lageron et al., 1985; Leone et al., 1995; Levy et al., 1992; Ries et al., 1996).

Wie diese Fallberichte beschreiben, ist eine Lebertransplantation als Therapie eines LAL-Mangels mit sehr vielen Risiken und Komplikationen verbunden (Ferry et al., 1991; Leone et al., 1995; Pericleous et al., 2017; Reiner et al., 2014). Zu den häufigsten Komplikationen zählt die Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat, wodurch Patienten häufig an den Folgen versterben (Ferry et al., 1991; Hoffman et al., 1993; Leone et al., 1995). Bernstein et al. geben in ihrem Artikel eine Übersicht über die Ergebnisse der verschiedenen Falldarstellungen. Dabei zeigt sich, dass von den insgesamt neun beschriebenen Patienten, die eine Lebertransplantation im Rahmen ihrer LAL-Defizienz erhalten haben, lediglich noch zwei Patienten über fünf Jahre nach der Transplantation lebten und eine Nachsorgeuntersuchung erhielten (Bernstein et al., 2013).

Bei einem der beiden Patienten stellten sich hierbei Komplikationen im Sinne eines Nierenversagens dar, sodass sie sieben Jahre nach der Transplantation und im Alter von 21 Jahren hämodialysiert werden musste (Bernstein et al., 2013).

Anhand dieser Daten wird deutlich, dass die Lebertransplantation keine überzeugende Therapieoption mit Nutzen für die Patienten ist. Aus diesem Grund ist sie heutzutage nahezu obsolet und wird nur noch als ultima ratio angewandt.

2.7.3 Stammzelltransplantation

Stammzelltransplantationen zeigen bei der Behandlung des LAL-Mangels partiellen Erfolg. Besonders Säuglinge, die an der Wolman-Krankheit leiden, scheinen von der Therapie zu profitieren (Pericleous et al., 2017; Reynolds, 2013; Stein et al., 2007; Tolar et al., 2008).

Bei der Stammzelltransplantation werden einem gesunden Spender Stammzellen aus dem Knochenmark oder dem Nabelschnurblut entnommen. Diese Stammzellen verfügen über normwertige LAL-Aktivität, weshalb man sich erhoffte, dass die Stammzelltransplantation eine kurative Therapieoption darstellt (Krivit et al., 2000; Pericleous et al., 2017; Stein et al., 2007; Su et al., 2016). Fallstudien verschiedener Patienten zeigten jedoch unterschiedlich gutes Ansprechen auf die hämatopoetische Stammzelltherapie (HSCT) (Krivit et al., 2000; Stein et al., 2007; Tolar et al., 2008).

Einige Fallberichte schildern ein Überleben der Patienten von vier bis zu elf Jahren nach der Transplantation mit Rückgang der Hepatosplenomegalie, verbesserten Lipidwerten und Normalisierung der LAL-Enzymaktivität (Stein et al., 2007; Su et al., 2016). Zusätzlich besserten sich bei vielen Patienten die Symptome wie Diarrhoe und Erbrechen (Krivit et al., 2000; Pericleous et al., 2017; Tolar et al., 2008).

Es gibt jedoch auch Berichte über Patienten, die nach der hämatopoetischen Stammzelltransplantation verstarben (Gramatges et al., 2009; Tolar et al., 2008; Yanir et al., 2013). Häufig verstarben diese Patienten an der Lebervenenverschlusskrankheit (Tolar et al., 2008; Yanir et al., 2013). Bei anderen der beschriebenen Patienten schritt die Erkrankung der LAL-Defizienz fort, obwohl sich die LAL-Werte peripher normalisierten, sodass es schlussendlich zu Leberzirrhose mit darauffolgendem Leberversagen kam (Su et al., 2016; Tolar et al., 2008; Yanir et al., 2013).

2.7.4 Enzymersatztherapie

Die neue Hoffnung in der Therapie der LAL-Defizienz ist die Enzymersatztherapie mit Sebelipase alfa (Burton et al., 2015a; Du et al., 2008; Erwin, 2017; Frampton, 2016; Grabowski, 2013; Paton, 2016; Pericleous et al., 2017; Su et al., 2016). Sebelipase alfa ist ein rekombinantes humanes LAL Protein, welches in genmodifizierten Hühnern produziert und in das Eiweiß der Hühnereier abgegeben wird (Su et al., 2016).

Das Medikament wird unter dem Namen Kanuma™ von Alexion Pharmaceuticals, Inc. hergestellt und hat seit dem Jahr 2015 eine Zulassung für die Therapie der LAL-Defizienz in Europa, den Vereinigten Staaten und Japan (Paton, 2016; Su et al., 2016).

Es kann Patienten in allen Altersstufen verabreicht werden (Su et al., 2016). Die Applikation erfolgt intravenös mit einer empfohlenen Wochendosis von 1 mg/kg für Säuglinge unter sechs Monaten und einer Dosis von 1 mg/kg alle zwei Wochen bei Kindern und Erwachsenen mit CESD (Burton et al., 2015a; Su et al., 2016).

Das rekombinante Enzym enthält Mannose-6-phosphat als Erkennungsmolekül, wodurch es durch M6P-Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Lysosomen aufgenommen wird (Su et al., 2016).

Nachdem präklinische Studien an Rattenmodellen zufriedenstellend verlaufen sind, konnte der nächste Schritt in der Bewertung von Sebelipase alfa gemacht werden (Du et al., 2008; Su et al., 2016).

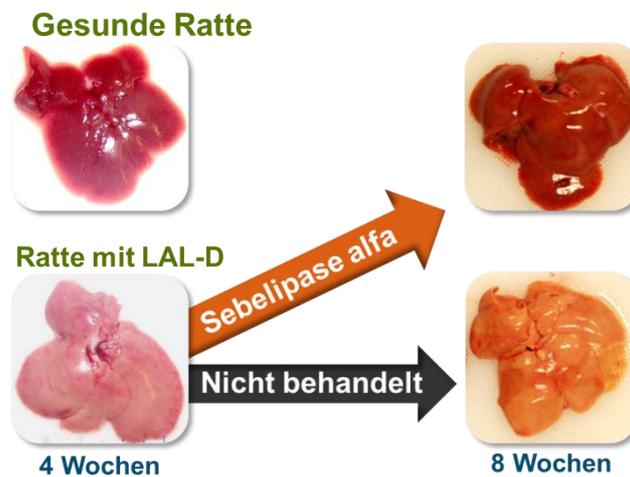


Abbildung 10 Beobachtete In-vivo-Effekte im LAL-D-Rattenmodell.

Es folgte die multizentrale, randomisierte, plazebokontrollierte Doppelblindstudie mit 66 Patienten (Burton et al., 2015a). Nach 20 Wochen wurde das Studiendesign wegen der statistisch signifikanten Wirksamkeit der Enzymersatztherapie in eine für alle Patienten offene Behandlung geändert.

Im Rahmen der dritten Erprobungsphase des Medikamentes wurde es unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet. Dabei konnten signifikante Verbesserungen im Vergleich zur Kontrollgruppe in den folgenden Punkten festgestellt werden. Durch die Medikation mit Sebelipase alfa wurde der ALT-Spiegel signifikant gesenkt (Burton et al., 2015a; Su et al., 2016). Elf der 35 Patienten, die das Medikament erhielten, wiesen am Ende der 20 Wochen normale ALT-Werte auf, wohingegen es in der Placebogruppe nur zwei von 30 Patienten (31 % vs. 7 %; $P=0,03$) waren (Burton et al., 2015a). Auch die Normalisierung der AST-Werte erreichte in der Fallgruppe statistische Signifikanz (42 % vs. 3 %; $P\leq 0,001$) (Burton et al., 2015a).

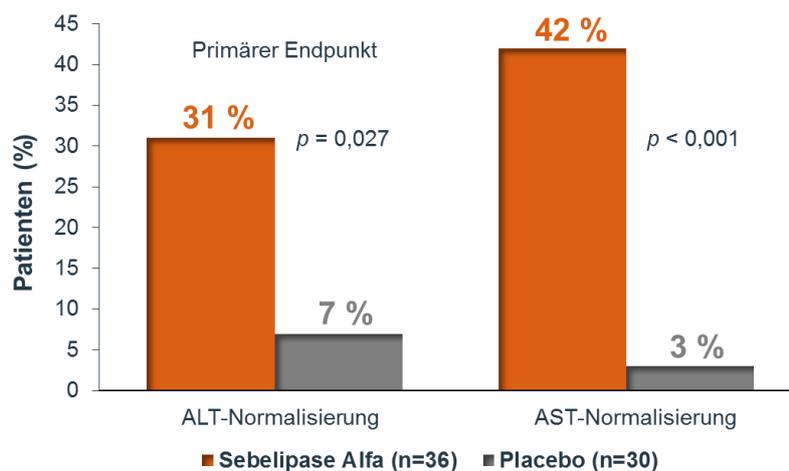


Abbildung 11 Prozentsatz der Patienten mit Normalisierung der ALT/AST-Werte in Woche 20.

Ebenso war die Reduktion der LDL-Cholesterinwerte ($-28,4 \pm 22,3$ vs. $-6,2 \pm 13,0$; $P \leq 0,001$), der nicht HDL-Cholesterinwerte ($-28,0 \pm 18,6$ vs. $-6,9 \pm 10,9$; $P \leq 0,001$) und der Triglyzeridwerte ($-25,5 \pm 29,4$ vs. $-11,1 \pm 28,8$; $P = 0,04$) unter Therapie statistisch signifikant (Burton et al., 2015a). Zusätzlich konnte mit der Therapie eine signifikante Erhöhung des HDL-Cholesterinwertes ($+19,6 \pm 16,8$ vs. $-0,3 \pm 12,4$; $P \leq 0,001$) erreicht werden (Burton et al., 2015a).

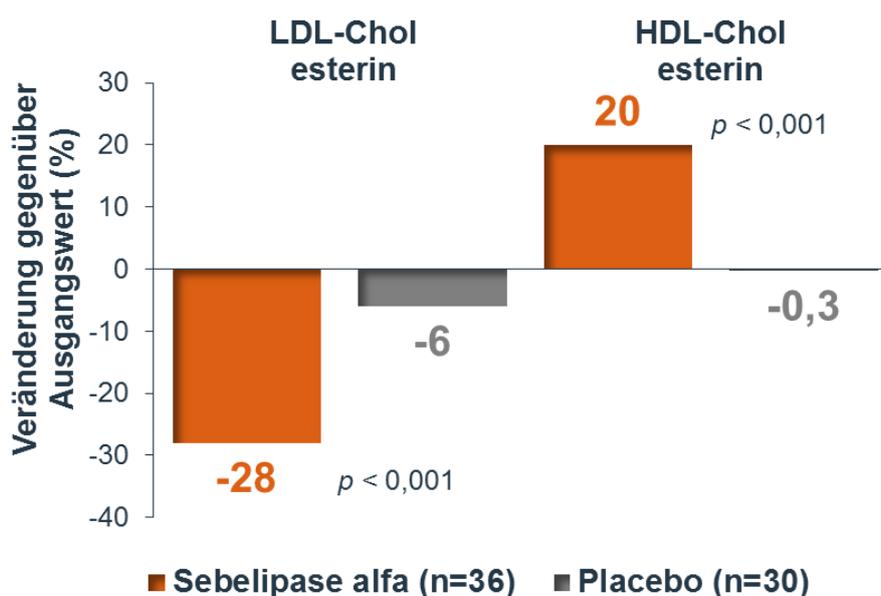


Abbildung 12 Mittlere prozentuale Veränderung des LDL-/HDL-Cholesterins in Woche 20 gegenüber dem Ausgangswert.

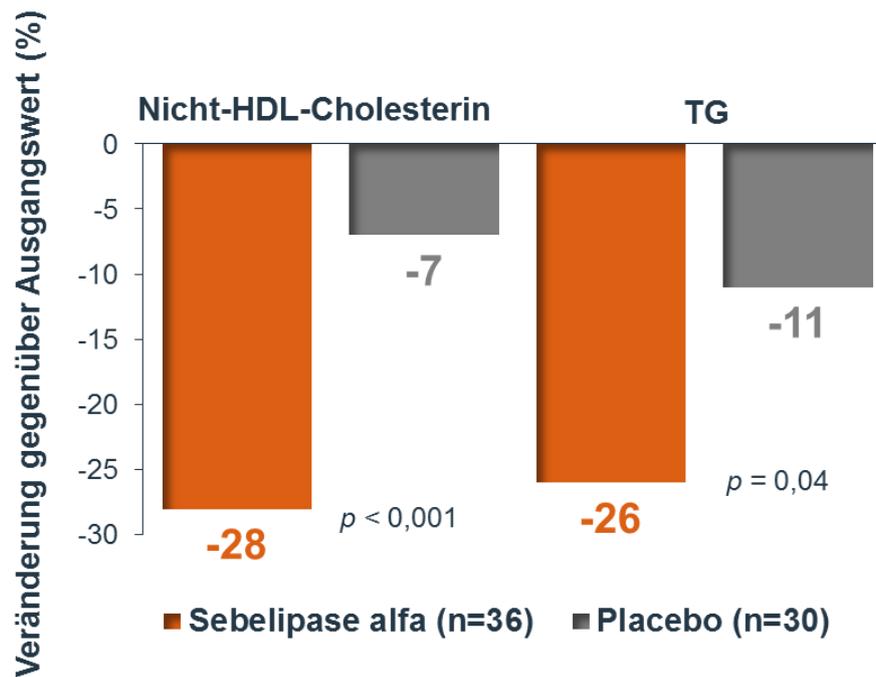


Abbildung 13 Mittlere prozentuale Veränderung des Lipidprofils in Woche 20.

Der Leberfettgehalt konnte signifikant gesenkt werden (-32 % vs. -4 %; $P \leq 0,001$) (Burton et al., 2015a).

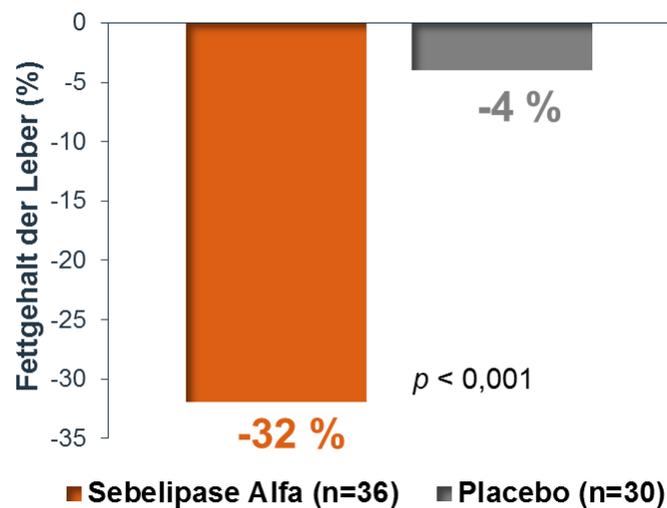


Abbildung 14 Mittlere prozentuale Abnahme des Fettgehalts der Leber in Woche 20.

Das Auftreten von mikrovesikulärer Steatose konnte in den 20 Wochen auch verringert werden, jedoch war die Abnahme des Auftretens in der Fallgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe nicht statistisch signifikant (62 % vs. 40 %; $P=0,42$) (Burton et al., 2015a).

In der Medikamentengruppe konnte zudem noch das Milzvolumen signifikant verkleinert werden (-6,8 % vs. 5,8 %; $P \leq 0,001$).

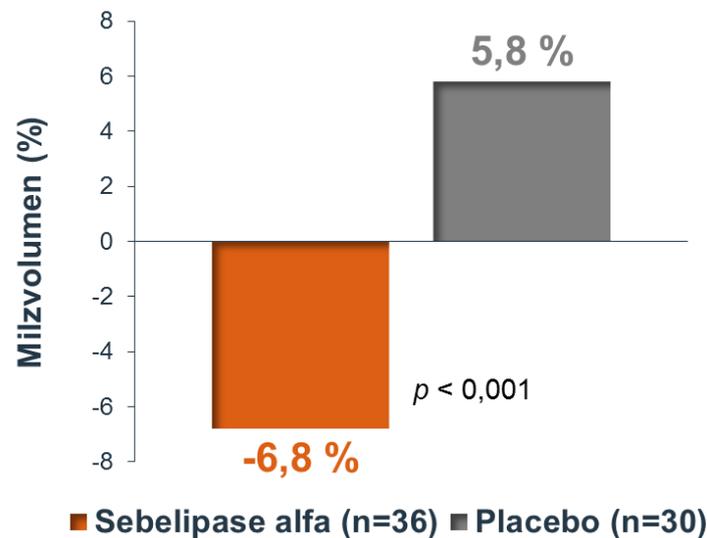


Abbildung 15 Mittlere prozentuale Veränderung des Milzvolumens in Woche 20.

In der Studie zeigte sich weiterhin, dass das Medikament von den meisten Patienten gut vertragen wurde (Burton et al., 2015a; Erwin, 2017; Paton, 2016; Su et al., 2016). Die aufgetretenen unerwünschten Reaktionen waren in den meisten Fällen nicht gravierend (Burton et al., 2015a). Diese waren häufig Kopfschmerzen (28 %), Fieber (19 %), Diarrhoe (17 %), Schmerzen im Oropharynx (17 %) und akute Infektionen der oberen Atemwege (17 %) (Burton et al., 2015a; Paton, 2016). Innerhalb der 20 Wochen zeigte lediglich ein Patient schwerwiegendste unerwünschte Reaktionen, die auf das Medikament zurückgeführt werden konnten. Dazu zählten Symptome einer Anaphylaxie, wie Atemnot, Tachykardie, Tachypnoe, Urtikaria und Rhinorrhoe. Dadurch musste eine Therapiepause eingelegt werden (Burton et al., 2015a). Der Patient konnte jedoch in der offenen Behandlungsperiode mit der Therapie fortfahren. Es traten ferner keine unerwünschten Ereignisse auf, die zum Tod führten (Burton et al., 2015a; Frampton, 2016; Paton, 2016; Su et al., 2016). Außerdem ist anzumerken, dass Säuglinge häufiger schwerwiegende unerwünschte Reaktionen zeigten als Kinder oder Erwachsene (Paton, 2016; Su et al., 2016).

Wie bei vielen anderen Enzyersatztherapien können vom Patienten auch gegen das Sebelipase alfa Antikörper gebildet werden (Burton et al., 2015a; Frampton, 2016; Paton, 2016; Su et al., 2016). Es ist aufgefallen, dass lediglich Säuglinge Antikörper gegen das Medikament produzieren (Su et al., 2016). Meistens wurden diese in den ersten zwei bis drei Monaten der Therapie aufgebaut (Burton et al., 2015a; Frampton, 2016; Paton, 2016; Su et al., 2016). Die Bildung von Antikörpern führte in manchen Fällen sogar zu einer in-vitro Hemmung der Sebelipase alfa (Su et al., 2016). Es scheint jedoch zu keiner Hemmung des Medikamentes in den Patienten mit vorhandenen Antikörpern zu kommen (Burton et al., 2015a; Su et al., 2016). Bei einigen der Patienten sank der Antikörperspiegel im Verlauf der Zeit unter fortgeführter Medikation auf nicht messbare Werte ab (Burton et al., 2015a; Paton, 2016; Su et al., 2016).

Mit der Enzyersatztherapie mit Sebelipase alfa scheint eine wirksame Therapie des LAL-Mangels gefunden worden zu sein, dennoch müssen noch weitere Studien die hepatischen und kardiovaskulären Langzeiteffekte der Therapie belegen (Paton, 2016).

2.8 Prognose

Der LAL-Mangel ist eine progressiv verlaufende Krankheit (Bernstein et al., 2013; Chora et al., 2017; Milan Elleder et al., 2000; Gokce, 2016; Reiner et al., 2014). Man kann aber keine genaue Prognose zur Progredienz geben, da die Erkrankung bei allen Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt ist und unterschiedlich schnell verläuft (Muntoni et al., 2007; Reiner et al., 2014; Su et al., 2016).

Generell lässt sich aber sagen, dass Säuglinge mit der Wolman-Krankheit eine weitaus schlechtere Prognose haben als Kinder und Erwachsene mit der schwächer verlaufenden CESD (Abramov et al., 1956; Aslanidis et al., 1996; Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; D'Agostino et al., 1988).

Nicht therapierte Säuglinge haben eine Lebenserwartung von circa sechs Monaten bis zu einem Jahr (Jones et al., 2016). Es gibt einzelne Fallberichte von Säuglingen, die sogar ihr drittes Lebensjahr erreichten (Bernstein et al., 2013; Jones et al., 2016). Das mittlere Sterbealter beträgt jedoch circa 3,7 Monate (Jones et al., 2016).

Studien zeigten, dass Säuglinge unter Therapie mit Sebelipase alfa eine deutlich erhöhte Lebenserwartung haben (Erwin, 2017). Beim 11. jährlichen World-Symposium in Orlando im Jahr 2015 konnten Zahlen veröffentlicht werden, die zeigten, dass 65 % der Säuglinge, die eine Therapie mit Sebelipase alfa erhielten, ihr erstes Lebensjahr überlebten (Jones et al., 2016).

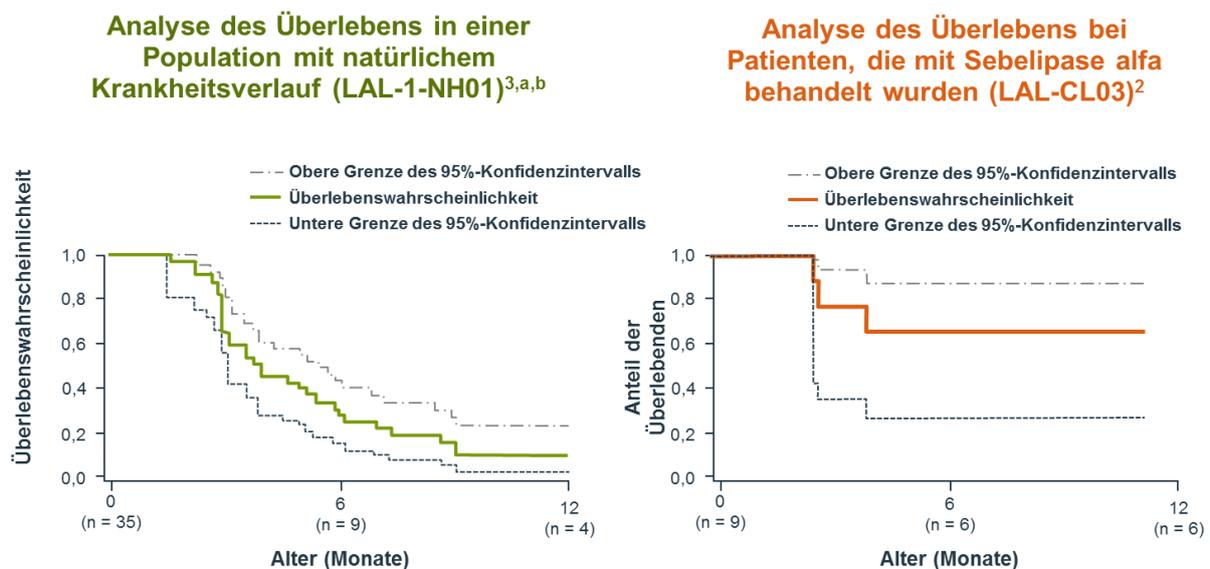
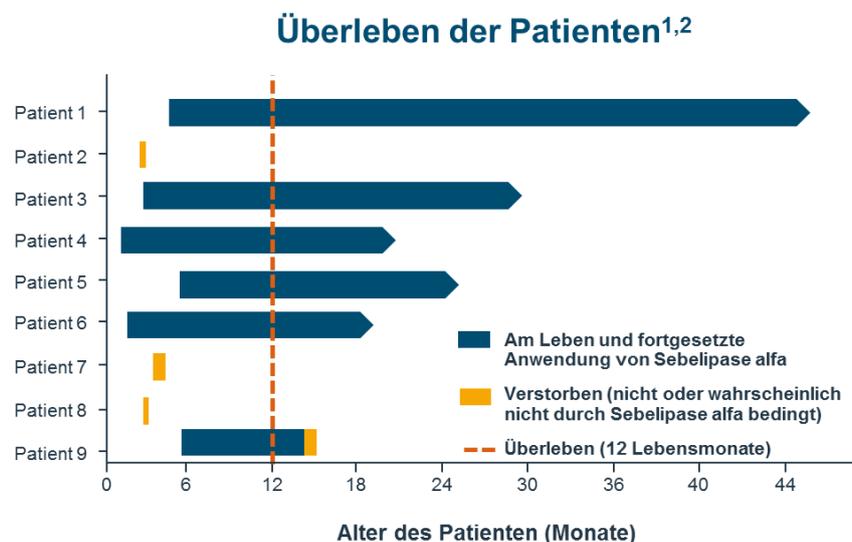


Abbildung 16 Vergleich des Überlebens einer Population mit natürlichem Krankheitsverlauf und einer mit Sebelipase alfa therapierten Population.

Beim 48. jährlichen Treffen der European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) in Amsterdam im Mai 2015 wurden weitere Daten präsentiert, die besagten, dass Säuglinge unter Therapie 44 Monate und älter wurden. (Jones et al., 2016)



Todesfälle (n = 4): Nicht oder wahrscheinlich nicht durch Sebelipase alfa bedingt²

Abbildung 17 Überleben der mit Sebelipase alfa therapierten Patienten.

Auch bei CESD-Patienten ist die Lebenserwartung im Vergleich zu gesunden Menschen reduziert. Häufige Ursachen für das vorzeitige Ableben sind Leberversagen aufgrund von Leberzirrhose und Atherosklerose mit damit einhergehenden kardiovaskulären Ereignissen. Jedoch hat auch bei diesen Patienten die Sebelipase alfa einen positiven Effekt. Durch die Senkung und Normalisierung der Lipidwerte wird das Auftreten von Atherosklerose reduziert und als dessen Folge sinkt das kardiovaskuläre Risiko (Burton et al., 2015a; Erwin, 2017; Paton, 2016; Su et al., 2016).

Die Leberpathologie wird durch die Medikation ebenso verbessert, sodass es schließlich gleichfalls zu weniger Fällen von Leberversagen kommt (Erwin, 2017; Paton, 2016; Su et al., 2016).

Langzeitstudien müssen für weitere Aussagen abgewartet werden, da es sich nicht voraussagen lässt, ob die Patienten unter Therapie eine annähernd gleiche Lebenserwartung wie gesunde Menschen haben. Dazu werden Untersuchungen über einen längeren Zeitraum Aufschluss geben können und die Lebenserwartung unter Sebelipase alfa aufzeigen.

3. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die wenig bekannte LAL-D-Erkrankung näher zu beschreiben und Patienten mit dieser Erkrankung an der Universitätsklinik Freiburg im Zeitraum von 2006 bis 2016 retrospektiv zu detektieren.

Da Patienten mit einer LAL-D häufig fehldiagnostiziert bleiben und die Dunkelziffer der Erkrankung somit unbekannt ist, kann eine genaue Prävalenz nicht angegeben werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher insbesondere, die Prävalenz der LAL-D in einer Kohorte von leberkranken Patienten im Raum Freiburg von 2006 bis 2016 zu ermitteln.

4. Material und Methoden

Dieses Kapitel ist in zwei große Unterthemen unterteilt und widmet sich dem Patientenkollektiv und den verwendeten Methoden. Zunächst wird die Erstellung des Patientenkollektives beschrieben. Nachfolgend werden im Kapitel „Methoden“ die einzelnen Studienschritte wiedergegeben. Am Ende des Kapitels werden abschließend die Einschlusskriterien der Studie zusammengefasst.

4.1 Material

4.1.1 Patientenkollektiv

In das Patientenkollektiv dieser Studie wurden alle Patienten aufgenommen, die sich im Zeitraum von Januar 2006 bis Dezember 2016 einer Leberbiopsie unterzogen und deren Biopsate im Pathologischen Klinischen Institut Freiburg untersucht wurden. Die zur Studie passenden Patientenfälle wurden mit Hilfe des Suchbegriffs „Leber“ in der klinikinternen Datenbank PathoPro gefunden. Es ergab sich eine Studiengruppe von insgesamt 3094 Patienten.

Mit Hilfe der Datenbank wurden Informationen zu den dazugehörigen Proben ermittelt. Zu diesen Informationen gehören das Entnahmedatum der Biopsie, Angaben zu den Patienten wie zum Beispiel Geburtsdatum, Geschlecht und die Medikamentenanamnese, falls vorhanden. Zusätzlich beinhaltet die Datenbank die pathologische Befundung der jeweiligen Biopsien durch einen Facharzt für Pathologie des Pathologischen Institutes Freiburg.

4.2 Methodik

Die Studie umfasste insgesamt fünf Schritte. Im ersten Schritt wurden die bereits gestellten Befunde gelesen. Diese Befundung der einzelnen Fälle wurde im Rahmen der Studie genutzt, um eine Vorauswahl der Patienten zu treffen. Verdächtige Befunde wurden mikroskopiert. Anschließend erfolgte bei Patienten mit fraglichen mikroskopischen Veränderungen eine klinische Beurteilung mittels Arztbriefen und Laborbefunden. Potentielle Patienten wurde folgend nochmal mikroskopisch untersucht. Bei letztendlich 13 Patienten wurde für eine abschließende Bewertung eine CD68-Färbung veranlasst.

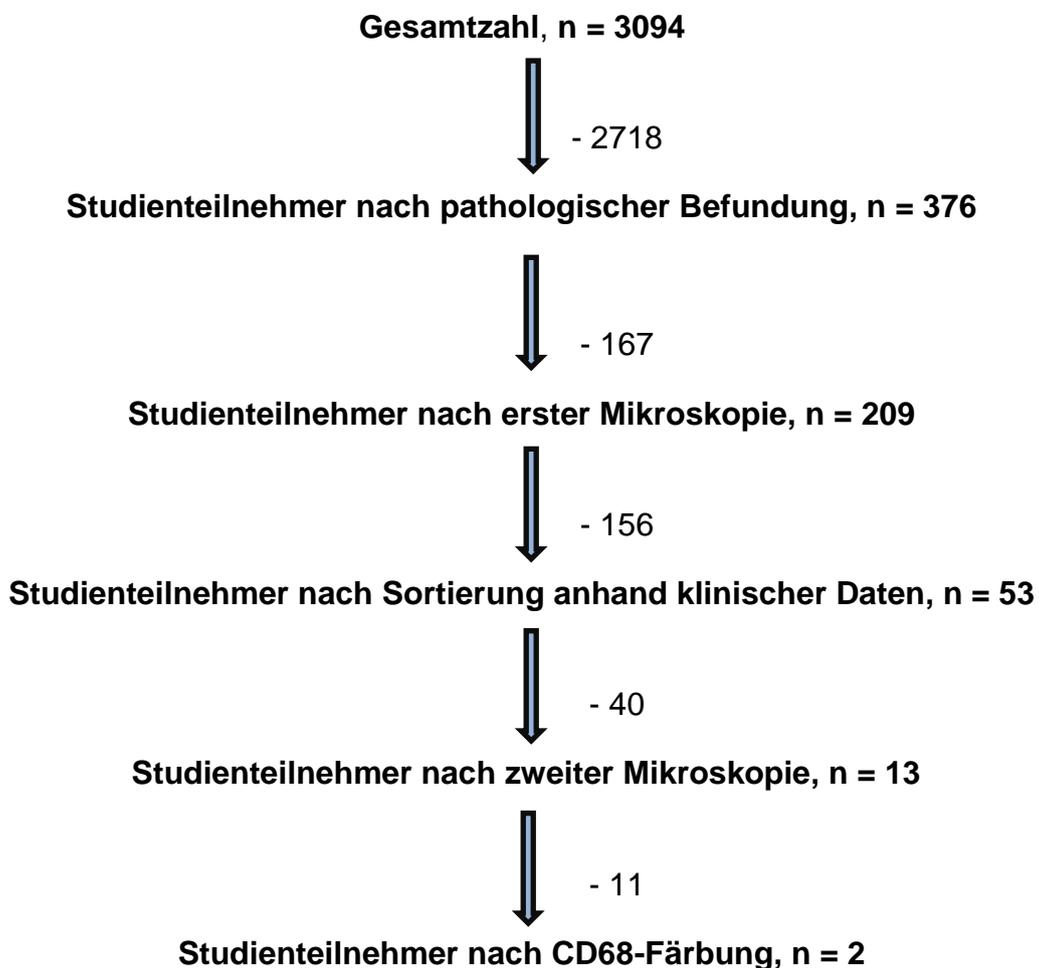


Abbildung 18 Studiendesign.

4.2.1 Pathologische Befundung

Die histologischen Befunde aller Patienten wurden zu Beginn der Studie gelesen. Anhand der Befunde wurde eine grobe Auswahl des Patientenkollektives getroffen. Patienten mit Malignomen, Metastasen oder diagnostizierten viralen Hepatitiden wurden aus der Studie ausgeschlossen. Nach diesem ersten Filtrationsschritt beinhaltete das Patientenkollektiv nur noch Patienten mit einer verfetteten und/ oder zirrhotischen Veränderung in der Leberhistologie.

Im nächsten Schritt wurden die Gewebeproben dieser Patienten aus dem Archiv des Instituts für Klinische Pathologie des Universitätsklinikums Freiburgs herausgesucht. Die Präparate wurden vom Pathologischen Klinischen Institut für die Mikroskopie im Rahmen der Studie zur Verfügung gestellt.

4.2.2 Mikroskopie

Die Mikroskopie dient der eigenhändigen Beurteilung der histologischen Präparate der Patienten. Im ersten Schritt wurden jegliche Patienten mit einer mikroskopischen Verfettung detektiert. Zwar ist das typische Bild der LAL-D-Patienten eine mikroversikuläre Verfettung, jedoch sind auch Patientenfälle mit gemischtropfiger oder grobfettiger Steatose beschrieben (Himes et al., 2016). Aus diesem Grund wurden im ersten Vorgang die Einschlusskriterien weit gefasst, um sicher zu stellen, dass keine Patienten übersehen werden.

Im zweiten Schritt der Mikroskopie wurde nach Betrachtung der klinischen Daten der Patienten eine kritischere mikroskopische Untersuchung durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Verfettung diffus und nicht zonal gegliedert ist, wie es für die LAL-D typisch ist. Zusätzlich musste ein ausreichender Anteil der Verfettung im Präparat vorhanden sein. Der Anteil sollte 50 % des Parenchyms einnehmen.

Zudem wurde in den Präparaten auf schaumzellige Kupffer-Zellen in den Sinusoiden als histologischer Hinweis auf eine vorliegende LAL-D geachtet.

4.2.2.1 Färbung

Im Rahmen der mikroskopischen Untersuchung wurden die Präparate in verschiedenen Färbungen betrachtet.

Zuerst wurde die sogenannte Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) untersucht. In dieser Färbung wurden die Art und die Verteilung der Steatose sowie das Vorhandensein einer Fibrose bewertet. In der HE-Färbung stellt sich eine Verfettung der Hepatozyten aufgrund des präparatorischen Entwässerungsprozesses in Form von optisch leeren Vakuolen dar. Das Vorliegen einer Fibrose in den Präparaten ist für die Diagnose der LAL-D nicht zwingend erforderlich, ist jedoch bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Leberverfettung häufig anzutreffen. Zusätzlich werden die Sinusoide auf schaumzellige Makrophagen untersucht. Dabei handelt es sich um Makrophagen, in deren Zytoplasma Lipidtropfen massiv angehäuft sind.

Als nächstes wurden die Präparate in der Versilberung nach Gomorri (Retikulinfärbung) betrachtet. Diese Färbung dient zur Darstellung der Retikulinfasern und zeigt somit eine Leberfibrose und –zirrhose. Die Färbung ist, im Gegensatz zur HE-Färbung, eine spezialisierte Färbung in der Fibrosedarstellung. Das histologische Bild zeigt bei Vorliegen einer Leberfibrose ein dichtes Netzwerk gefärbter Retikulinfaser. Wie oben erwähnt, schließt die Abwesenheit einer Leberfibrose oder –zirrhose eine LAL-D nicht aus. Darum wurde diese Färbung lediglich als zusätzliche Hilfestellung in der Suche nach einem histologischen Bild der LAL-D verwendet.

Falls eine Siriusfärbung vorhanden war, wurde auch diese verwendet, um einen fibrotischen Umbau des Leberparenchyms zu erkennen. Siriusrot ist ein hydrophiler und saurer Farbstoff, mit dem Kollagenfasern rot gefärbt werden. Mithilfe dieser Färbung stellt sich eine Leberfibrose oder –zirrhose in der polarisationsoptischen Mikroskopie als verdichtete rot gefärbte Kollagenfaserbündel dar.

Für den letzten mikroskopischen Schritt erfolgte eine immunhistologische Färbung der Präparate mit CD68-Antikörpern. Hierfür kamen nach Untersuchung der klinischen Daten und zweifacher Mikroskopie der Präparate 13 Patienten in Frage.

Es wurden die Gewebeblöcke der zutreffenden Patienten aus dem Archiv des Pathologischen Institutes ausgeliehen und die immunhistologische Färbung angeordnet. Das CD68-Molekül ist ein 110 kDa großes intrazelluläres Glykoprotein, das hauptsächlich an zytoplasmatische Granula gebunden ist.

Damit ist es ein wichtiger Bestandteil der lysosomalen Membranen und gehört zu der sogenannten Lysosome-associated-membrane-protein-Gruppe (LAMP-Gruppe). Man findet die CD68-Antigene in erster Linie in Makrophagen und besonders in den Kupffer-Zellen. Jedoch sind sie auch in geringerer Menge in Monozyten, basophilen und neutrophilen Granulozyten vorhanden. Die immunhistologische Färbung mit CD68-Antikörpern markiert die Kupffer-Zellen der Leber. Die Kupffer-Zellen sind bei der LAL-D mitbetroffen, da in diesen Zellen viele lysosomale Spaltungsprozesse stattfinden. Somit wurde diese immunhistologische Färbung in der Studie zur Darstellung der Makrophagen und Kupffer-Zellen verwendet. Bei Vorliegen einer lysosomalen sauren Lipase Defizienz zeigen sich durch die Färbung große Gruppen von vergrößerten Makrophagen in den Portalfeldern.

4.2.2.2 Vergrößerung

Das verwendete Mikroskop hat Objektive mit 5-facher, 10-facher, 25-facher und 40-facher Vergrößerung. Mit Hilfe der verschiedenen Vergrößerungseinstellungen konnten die Präparate in Bezug auf Verteilung und Art der Verfettung analysiert werden.

Als Erstes wurden die Präparate in der Übersichtsdarstellung bei 5-facher Vergrößerung untersucht. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der Verfettung beurteilt. Eine vereinzelte Steatose spricht gegen das Vorliegen einer LAL-D. Bei LAL-D Patienten besteht eine massive Steatose im ganzen Präparat.

In der Übersichtsdarstellung wurde zusätzlich die Verteilung der Verfettung begutachtet. Typisch für das Bild einer LAL- Defizienz ist eine diffuse Verteilung. Eine zonale Gliederung der Verfettung spricht hingegen eher für das histologische Korrelat einer NASH.

In der Detailaufnahme bei 40-facher Vergrößerung wurde die Art der Verfettung inspiziert. Die Hepatozyten eines LAL-D Patienten zeigen typischerweise eine mikrovesikuläre Verfettung. Es sind aber auch einzelne Patientenfälle mit grobvesikulärer Steatose bekannt. Neben der Begutachtung der Hepatozyten wurde bei 40-facher Vergrößerung nach schaumzelligen Kupffer-Zellen gesucht, welche typischerweise bei Erkrankten der LAL-Defizienz vorzufinden sind.

4.2.3 Klinische Daten

Nach mikroskopischer Untersuchung der histologischen Schnitte erfolgte als nächster Schritt die Analyse der klinischen Daten der Patienten. Dafür wurde das medizinische Informations- und Dokumentationssystem MeDoc, welches in der Universitätsklinik Freiburg als elektronische Patientenakte genutzt wird, verwendet. In MeDoc werden zahlreiche Informationen der Patienten gesammelt. Es beinhaltet die in der Universitätsklinik Freiburg ausgestellten Arztbriefe. Darüber hinaus werden jedoch auch extern erstellte Arztbriefe im Programm gespeichert. Daneben befinden sich in MeDoc die Labordaten der Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten. Man kann den Verlauf der einzelnen Laborparameter somit nachvollziehen. Zusätzlich enthält das Dokumentationssystem schriftliche Befunde der Radiologie und Pathologie, sofern der Patient ein bildgebendes Verfahren oder eine Biopsie erfuhr. Das Alter der Patienten, welches eine weitere, für die Bewertung der Patientenfälle in der Studie wichtige Information darstellt, wird auch im Informationssystem MeDoc gespeichert.

4.2.3.1 Laborparameter

Die wichtigsten Laborparameter zur Einschätzung für das Vorliegen einer lysosomalen sauren Lipase Defizienz sind die Blutfette und die Serumtransaminasen. Bei den Blutfetten spielen das Gesamt-Cholesterin und die Triglyzeride eine wichtige Rolle. Diese sind bei LAL-D Patienten erhöht. Darüber hinaus ist die typische Konstellation von erhöhtem LDL-Cholesterin und erniedrigtem HDL-Cholesterin zu beachten. Deshalb wurden in MeDoc die Laborbefunde der Patienten aufgerufen. Man betrachtete dabei jegliche in der Klinik stattgefundenen Laboruntersuchungen. So konnte man zwischen einmaligen oder dauerhaften Veränderungen unterscheiden.

Es wurde darauf geachtet, dass die Blutfette zu jeder Zeit der verschiedenen Laboruntersuchungen verändert waren, da eine Besserung der Parameter ohne Therapie untypisch für eine lysosomale saure Lipase Defizienz ist. Die Patienten mit einer für die Erkrankung sprechenden Laborkonstellation wurden vermerkt.

Bei LAL-D Patienten können zusätzlich die Serumtransferasen Alanin-Aminotransferase und Aspartat-Aminotransferase erhöht sein. Sie zeigen eine Leberschädigung an. Mit Hilfe dieser Parameter konnte in Zweifelsfällen oftmals entschieden werden, ob der vorliegende Patient für die Diagnose einer LAL-D in Frage kommt. Da Patienten mit einer LAL-D schon früh eine erhebliche Schädigung der Leber aufweisen, sind erhöhte Serumtransferasen charakteristisch bei diesen Patienten vorzufinden. Bei Patienten, deren Blutfettwerte nicht vollständig derer von LAL-D Patienten entsprachen, wurden die Serumtransferasen zusätzlich berücksichtigt. Falls diese erhöht waren und man von einer Leberschädigung ausgehen konnte, wurden auch diese Patienten in den nächsten Schritt der Studie gefiltert. Jedoch können bei Vorliegen einer LAL-D auch normwertige Serumtransferasen vorgefunden werden. Normwertige Serumtransferasen sprechen nicht gegen eine lysosomale saure Lipase Defizienz, da besonders bei jungen Patienten eine hohe Regenerationsfähigkeit der Leber vorliegt und dadurch besonders im frühen Stadium der Erkrankung eine Leberschädigung gut kompensiert werden kann.

Laborparameter	Normwerte
Gesamt-Cholesterin	110-200 mg/dl
Gesamt-Triglyzeride	150 – 200 mg/dl
LDL-Cholesterin	< 130 mg/dl
HDL-Cholesterin	Mann: >35 mg/dl Frau: >42 mg/dl
Alanin-Aminotransferase	Mann: <50 U/l Frau: <35 U/l
Aspartat-Aminotransferase	Mann: <50 U/l Frau: <35 U/l

Tabelle 1 Normbereiche der für die Studie relevanten Laborparameter.

Es gab jedoch auch Patienten, bei denen nicht alle typischen Veränderungen der Blutfette und Serumtransferasen vorlagen. Bei diesen Patienten wurde individuell in Zusammenschau der weiteren klinischen Daten wie BMI oder Alter, aber auch anderen Informationen aus den Arztbriefen, entschieden, ob sie für eine weitere Untersuchung in der Studie in Betracht kommen.

4.2.3.2 Body-Mass-Index (BMI)

Bei der Analyse der klinischen Daten wurde versucht, für alle Patienten des klinischen Kollektives den BMI zu ermitteln und zu sammeln. Hierfür wurden die Arztbriefe durchgelesen. Dabei wurde darauf geachtet, aktuelle Angaben der Patienten aus den verschiedenen Arztbriefen zu erfassen. Der BMI konnte auf verschiedenen Wegen festgestellt werden. Oftmals wurde er explizit in den Arztbriefen im Rahmen der körperlichen Untersuchung notiert. So konnte man den BMI für die Studie daraus entnehmen.

In der Mehrzahl der Fälle waren jedoch nur die Größe und das aktuelle Gewicht der Patienten angegeben. Dann wurden diese zwei Messgrößen verwendet, um den BMI zu errechnen. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Body-Mass-Index (in kg/m}^2\text{)} = \text{Körpergewicht (in kg)} / \text{Körpergröße (in m)}^2$$

Mittels der alterskorrigierten Tabelle für BMI-Werte wurden die Ergebnisse anschließend bewertet.

Alter (Jahre)	Norm-BMI (kg/m ²)
19-24	18-24
25-34	20-25
35-44	21-26
45-54	22-27
55-64	23-28
≥ 64	24-29

Tabelle 2 Alterskorrigierte Normbereiche des Body-Mass-Index.

In die Studie wurden alle Patienten mit einem BMI $\leq 30,0$ kg/m² eingeschlossen. Patienten mit einer Adipositas (BMI $\geq 30,0$ kg/m²) werden aus der Studie ausgeschlossen, da adipöse Patienten aufgrund des metabolischen Syndrom eine Lebersteatose aufweisen. Patienten mit einer LAL-D haben charakteristischerweise einen zu niedrigen oder niedrig-grenzwertigen BMI.

Da das Patientenkollektiv auch viele pädiatrische Patienten beinhaltet, wurden auch die Arztbriefe der Kinderklinik Freiburg erfasst. Für die Beurteilung des Körpergewichtes wird bei Kindern, anders als bei Erwachsenen, auf Perzentilenkurven zurückgegriffen. Perzentilenkurven beruhen auf Werten großer Vergleichskollektive in gleichen Altersgruppen. Somit wird ein Kind in Bezug auf sein Gewicht oder seiner Körpergröße mit gleichaltrigen Kindern verglichen. Bei Kindern liegt eine Adipositas bei einer BMI-Perzentile von > 97 vor. Für die Studie wurden Kinder mit einer BMI-Perzentile von > 97 ausgeschlossen.

In manchen Fällen konnten weder der BMI noch das Körpergewicht und die Körpergröße in einem Arztbrief gefunden werden. In diesen Fällen war eine Ermittlung des BMI nicht möglich. Diese Patienten wurden anhand der anderen hier besprochenen Kriterien für die Studie untersucht. Bei unsicherer Konstellation wurden Grenzfälle zum nächsten Studienschritt zugelassen, um sicherzugehen, dass kein Patient übersehen wurde.

4.2.3.3 Alter

Auch das Alter der Patienten wurde für die Studie ermittelt. In MeDoc wird das Patientenalter automatisch angegeben. Für die Beurteilung der Diagnose LAL-D ist das Alter wichtig, da Studien zeigten, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit keine LAL-D Patienten im Alter von über 70 Jahren gibt. Es gibt in der Literatur keine beschriebenen Fälle. Deshalb wurden Patienten über 70 Jahren aus der Studie ausgeschlossen.

Zudem wurde das Wissen über die Prävalenz in den verschiedenen Altersgruppen genutzt, um die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der Erkrankung bei den Patienten zu evaluieren. Patienten in den ersten zwei Lebensdekaden mit verdächtigen Veränderungen in den Laborwerten wurden besonders streng weiter untersucht, da häufig erste Symptome der LAL-D bis zum 25. Lebensjahr auftreten.

Einen zweiten Prävalenzgipfel gibt es in der fünften Lebensdekade. Dementsprechend wurden auch Patienten im Alter von 40 bis 50 Jahren besonders genau evaluiert.

4.2.4 Einschlusskriterien

Zum Abschluss des Kapitels werden für eine bessere Übersicht die Einschlusskriterien tabellarisch zusammengefasst.

Einschlusskriterien
Mikroskopische Steatose der Hepatozyten
Labor: Gesamt-Cholesterin, Gesamt-Triglyzeride, LDL-Cholesterin, AST, ALT ↑ HDL-Cholesterin ↓
Body-Mass-Index $\leq 30 \text{ kg/m}^2$
Alter ≤ 70 Jahre
Positive CD68-Färbung

Tabelle 3 Einschlusskriterien der Studie.

Diese Kriterien wurden im Verlauf der Studie schrittweise untersucht, ermittelt und bewertet. Sie stellen die typische Konstellation von Patienten mit einer lysosomalen sauren Lipase dar. Es muss dennoch angemerkt werden, dass auch bei Nichterfüllen aller Kriterien eine LAL-D vorliegen kann. Im kritischen Entscheidungsfall wurde die Beurteilung immer unter Berücksichtigung aller gegebenen Informationen und bei jedem Patienten individuell gestellt.

5. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse gliedert sich in vier Bereiche. Zunächst wird im Thema „Studienverlauf“ auf die Ergebnisse der einzelnen Studienschritte eingegangen.

Darauf folgt das Thema „Patientenkollektiv“, welches abermals in vier Unterthemen unterteilt ist. In diesen vier Unterthemen („Alter“, „Geschlecht“, „BMI“, Laborwerte“) werden verschiedene Eigenschaften des Studienkollektives, die zur Entscheidungshilfe herangezogen wurden, näher betrachtet.

Anschließend werden die Diagnosen aus den pathologischen Befunden ausgewertet und einander gegenübergestellt.

Im letzten Thema wird auf die verschiedenen Differentialdiagnosen der LAL-D eingegangen und diese zueinander in Zusammenhang gebracht. Hierbei werden besonders die Ergebnisse der Mikroskopie und der CD68-Färbung in Gestalt von Photographien dargestellt.

5.1 Studienverlauf

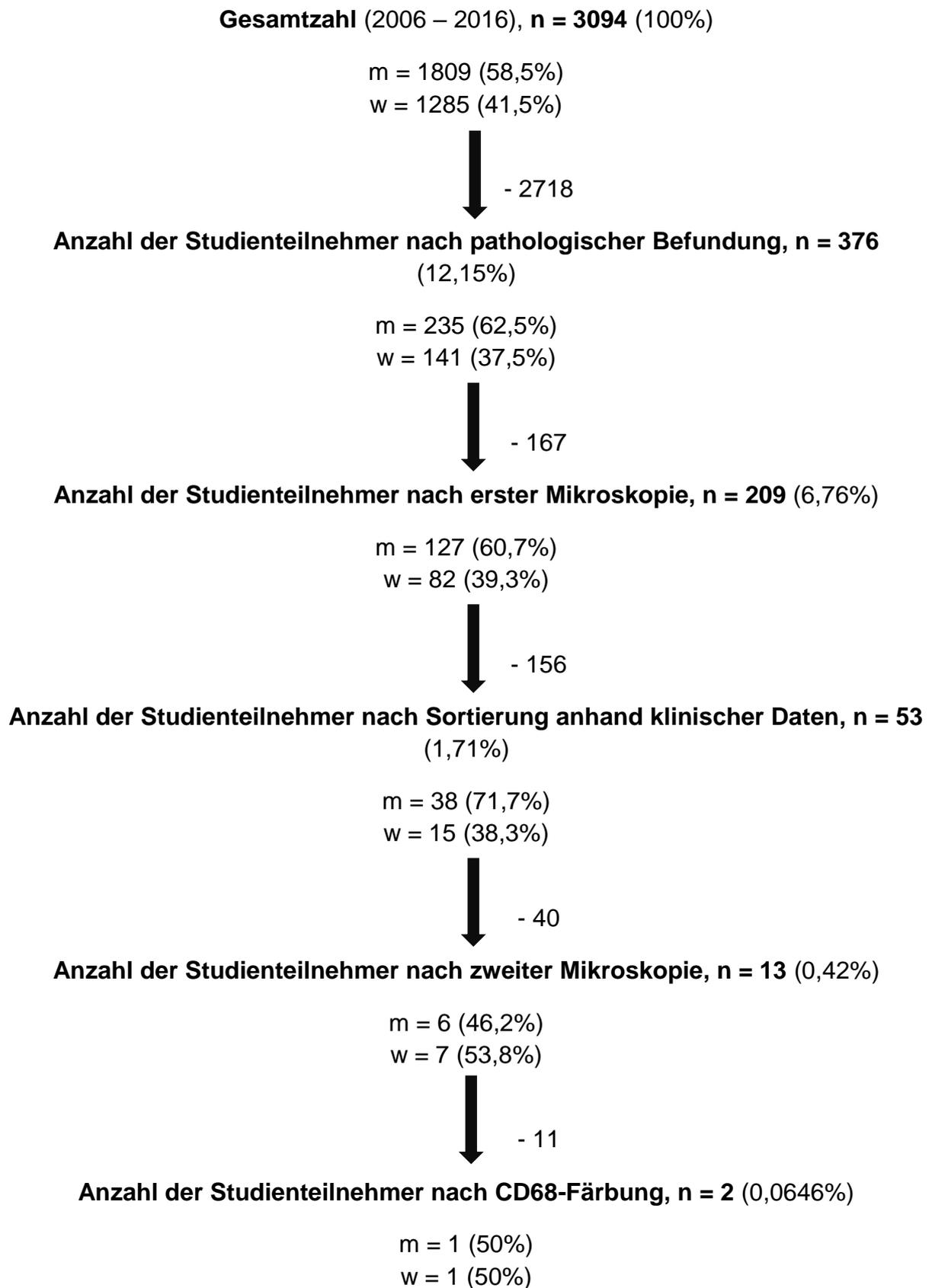


Abbildung 19 Studienverlauf.

Das Patientenkollektiv besteht aus einer Gesamtzahl von 3094 Patienten, die im Zeitraum von 2006 bis 2016 eine Leberbiopsie erfuhren.

Nach Untersuchung der einzelnen pathologischen Befunde der jeweiligen Patienten konnten 2718 Patientenfälle aus der Studie ausgeschlossen werden, da bei ihnen histologisch andere Diagnosen gestellt werden konnten (z.B. neoplastische Veränderungen, Hepatitiden oder Metastasen). Es verblieben 379 Patienten, welches 12,5 % des Gesamtkollektives entspricht.

Nachfolgend wurden die histologischen Schnitte dieser Patienten mikroskopiert. In diesem Schritt wurden 167 Patienten ausgegliedert, da sie die histologischen Kriterien einer LAL-D-Erkrankung, wie die diffuse mikrovesikuläre Verfettung und/oder Leberzirrhose nicht erfüllen. Es verblieben 6,76 % der Ausgangsgruppe, also 209 Patienten, in der Studie.

Im nächsten Schritt wurden die klinischen Daten dieser 209 Patienten beurteilt und anhand des Alters, des BMIs und der Laborwerte entschieden, ob es sich bei den jeweiligen Patienten um potentielle LAL-D-Erkrankte handelte. Sechs Patienten der verbliebenen 209 Patienten waren in der Zwischenzeit verstorben. Diese wurden aus der Studie ausgeschlossen. Bei weiteren zehn Patienten konnten keine klinischen Angaben in MeDoc gefunden werden. Sie verblieben für die genauere zweite Mikroskopie in der Studie. Nach Evaluation der Daten konnte man bei 156 Patienten sicher davon ausgehen, dass sie für die Studie nicht in Frage kamen. Für den nächsten Schritt der Studie blieben somit 53 Patienten (1,71 % des Gesamtkollektives) übrig.

Mit Hilfe der zweiten Mikroskopie und dem Wissen um die klinischen Daten der Patienten konnten weitere 40 Patienten aussortiert werden. Bei den verbliebenen 13 Patienten und somit 0,42 % der Ausgangspopulation wurde die CD68-Färbung durchgeführt.

Bei zwei der 13 Patienten zeigte die CD68-Färbung ein positives Ergebnis. Dies entspricht 0,0646 % des Gesamtkollektives der Studie.

5.2 Patientenkollektiv

In diesem Thema wird auf die Eigenschaften der Patienten der Studie eingegangen. Im Unterthema „Geschlecht“ wird das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten in den einzelnen Studienschritten dargestellt.

Darüber hinaus wird im folgenden Kapitel besonders auf die Informationen des klinischen Untersuchungsschrittes zurückgegriffen. Diese Informationen schließen das Patientenalter, die persönlichen BMIs und Laborwerte der Patienten ein. Anhand dieser Parameter wurden die Patienten entsprechend der Einschlusskriterien der Studie für die weiteren Schritte selektiert.

5.2.1 Geschlecht

Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten wurde für jeden Studienschritt bestimmt und wird nachfolgend präsentiert.

Im ersten Schritt wird die Gesamtpopulation der Studie analysiert. Es folgt die Darstellung der Ergebnisse in einem Kreisdiagramm.

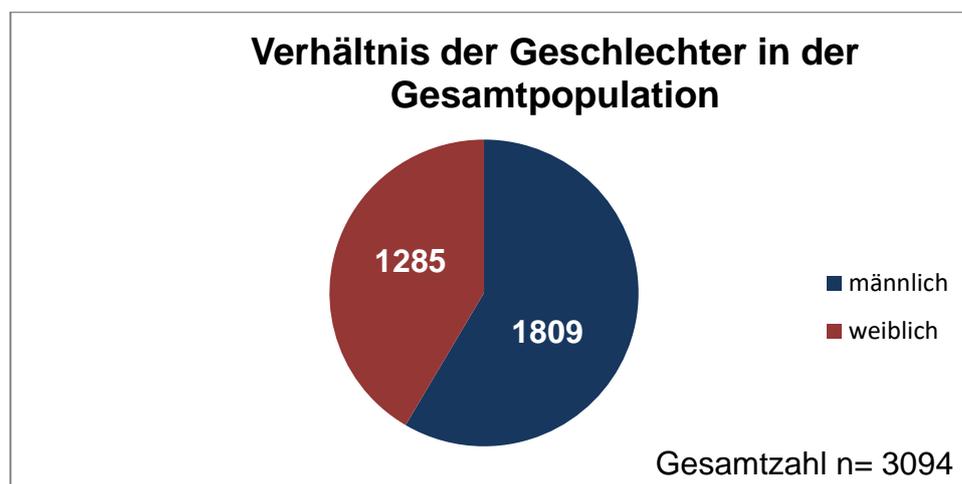


Abbildung 20 Verhältnis der Geschlechter in der Gesamtpopulation.

Bei einer Gesamtzahl von 3094 Patienten sind 1809 Patienten männlich. Das entspricht 58,5 %. Der weibliche Anteil an der Gesamtpopulation ist 41,5 %. Das sind 1285 Patientinnen.

Nach Bearbeitung der pathologischen Befunde sind noch 376 Patienten in der Studie übrig. Nachfolgend wird das Verhältnis der Geschlechter für diese Patientengruppe in einem Säulendiagramm angegeben.

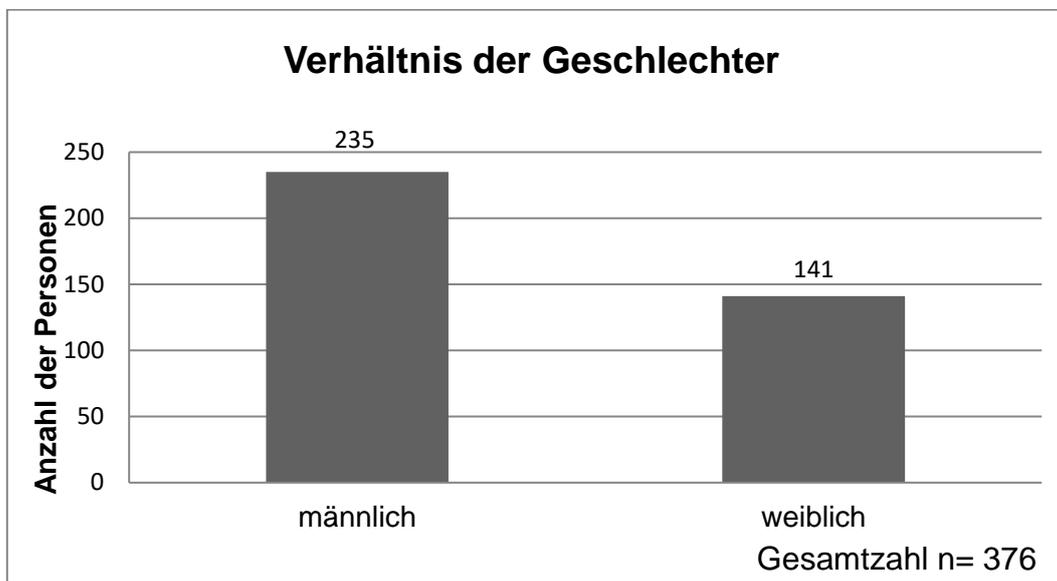


Abbildung 21 Verhältnis der Geschlechter nach Bearbeitung der pathologischen Befunde.

Bei einem Gesamtkollektiv von 376 Patienten sind 62,5 % männlich. Das sind 235 Patienten. In der Gruppe gibt es 141 weibliche Patientinnen, also 37,5 %.

Nach der ersten Mikroskopie sind noch 209 Patienten in der Studie. Für diese Gruppe wird entsprechend des vorangegangenen Musters das Verhältnis der Geschlechter angezeigt.

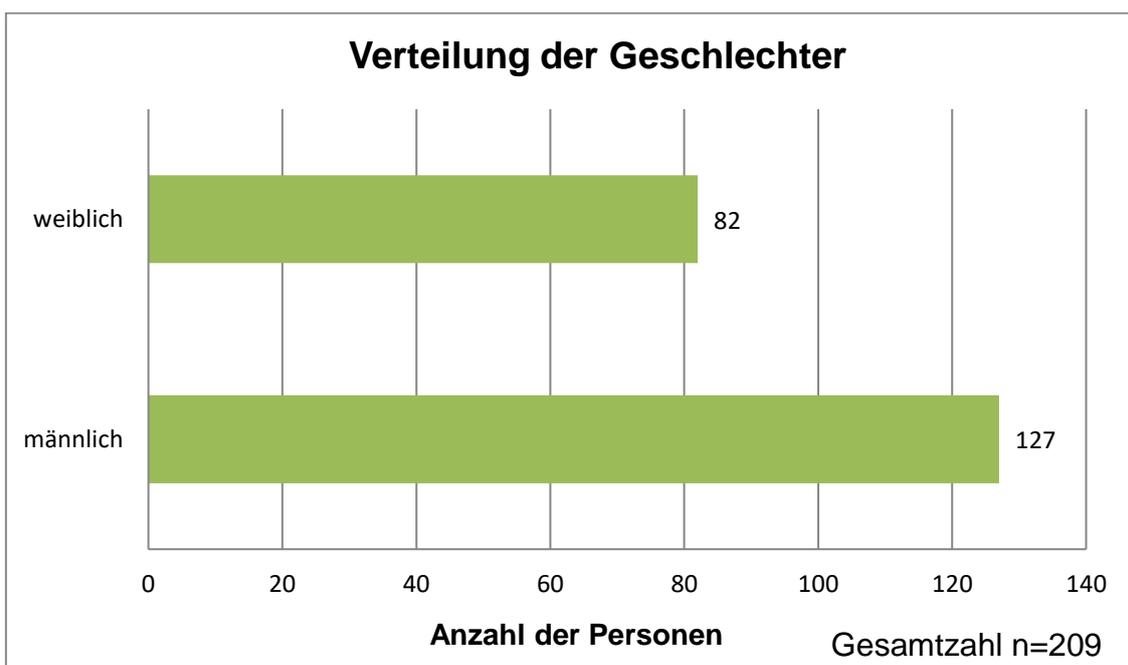


Abbildung 22 Verteilung der Geschlechter nach der ersten Mikroskopie.

Bei einer Population von 209 Patienten sind 39,3 % weiblich. Das sind 82 Patientinnen. Die restlichen 60,7 %, welches einer Anzahl von 127 Patienten entspricht, sind männlich.

Das nachfolgende Diagramm bildet die Verteilung der Geschlechter im nächsten Schritt der Studie ab. In diesem Schritt wurden die jeweiligen klinischen Daten analysiert. Hierbei werden das Patientenalter, die Laborwerte und der BMI einbezogen.

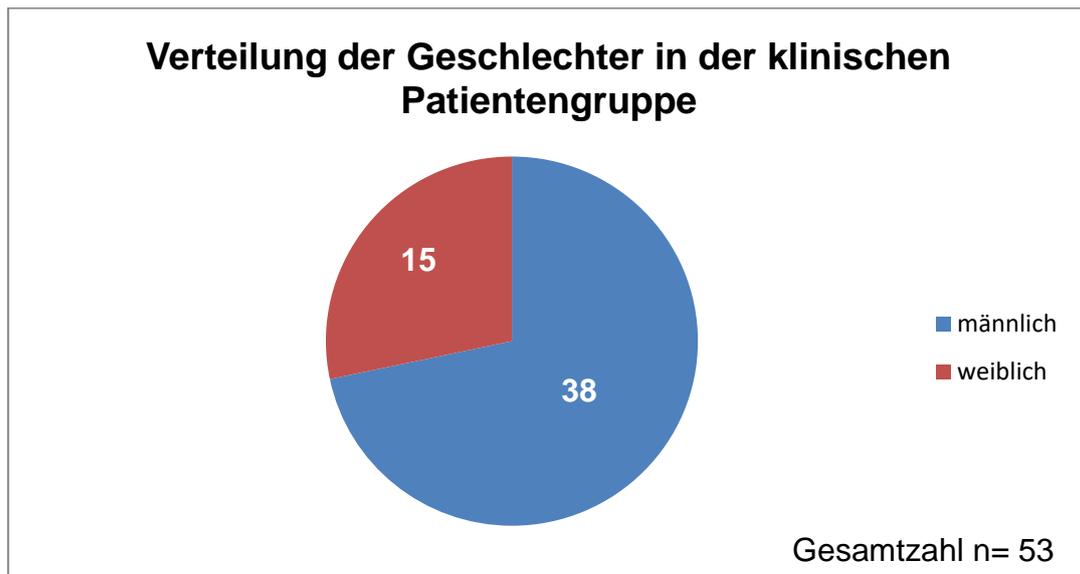


Abbildung 23 Verteilung der Geschlechter in der klinischen Patientengruppe.

Insgesamt gibt es 53 Patienten in dieser Gruppe. Davon sind 71,7 %, sprich 38 Patienten, männlich. 28,3 %, also 15 Patientinnen, sind weiblich.

Es folgt die Darstellung der Verteilung nach der zweiten Mikroskopie in einem Balkendiagramm.

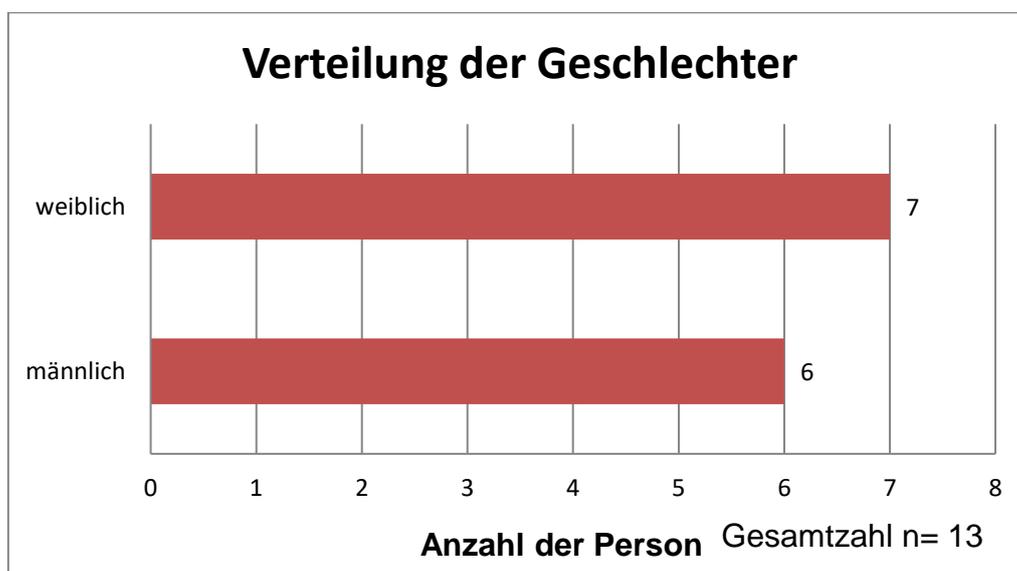


Abbildung 24 Verteilung der Geschlechter nach der zweiten Mikroskopie.

Nach diesem Schritt verbleiben 13 Patienten. Davon sind sechs männlich (46,2 %). Sieben Patientinnen, also 53,8 %, sind weiblich.

In letzten Schritt sind noch zwei Patienten vorhanden. Davon war ein Patient männlich und eine Patientin weiblich.

5.2.2 Alter

Das Alter wurde bei der klinischen Patientengruppe, einer Gruppe von 209 Patienten, ermittelt. Das folgende Säulendiagramm zeigt die Altersverteilung in dieser Gruppe.

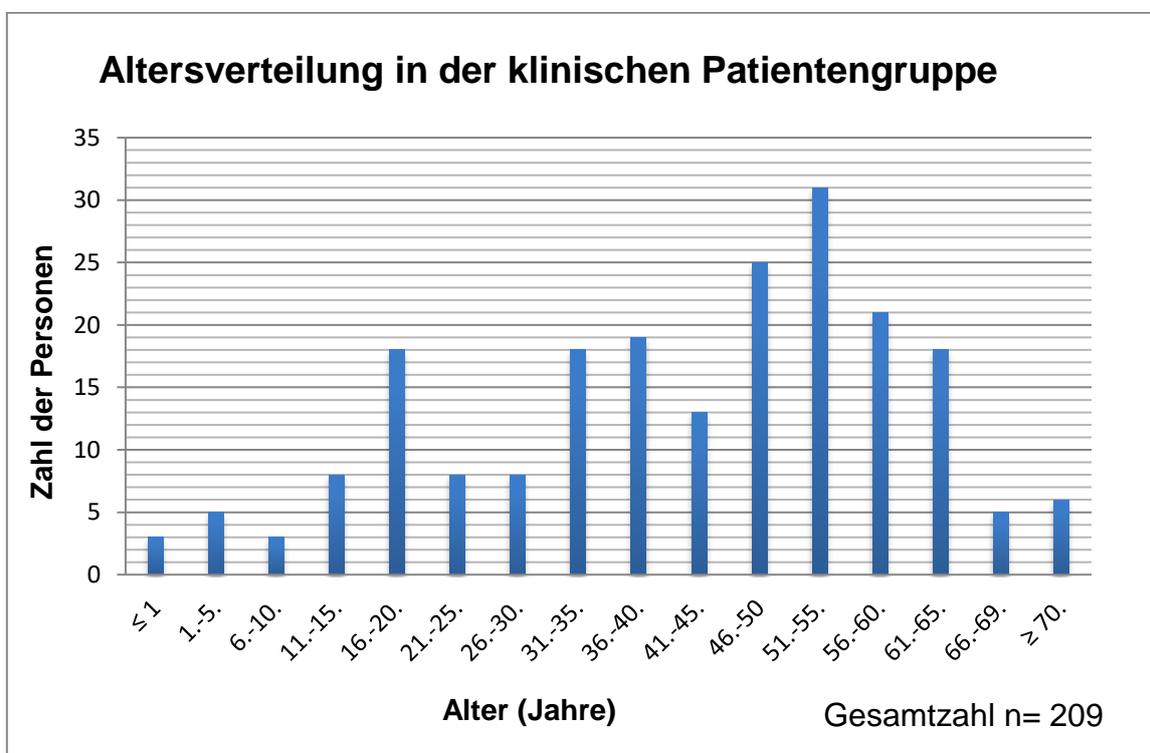


Abbildung 25 Altersverteilung in der klinischen Patientengruppe (n=209).

Der jüngste Patient des klinischen Patientenkollektives ist ein Monat und 27 Tage alt. Der älteste Patient ist 72 Jahre, vier Monate und vier Tage alt. Das Durchschnittsalter der Patientenpopulation beträgt 42,4 Jahre.

Die größte Altersgruppe ist mit 31 Patienten die der 51- bis 56- Jährigen. Sie nehmen einen Anteil von 14,8 % an der Gesamtgruppe ein. Die zweitgrößte Gruppe ist die Altersgruppe „46 – 50 Jahre“. Mit 25 Patienten haben sie einen Anteil von 12,0 %.

Die Gruppe der unter Einjährigen und die der Sechs- bis Zehnjährigen stellen die Gruppen mit den geringsten Patienten dar. Die Fraktionen bestehen jeweils aus drei Patienten, welches einen jeweiligen Anteil von 1,4 % der Gesamtpopulation ergibt.

Die Gruppe der 16- bis 20-Jährigen sticht mit 18 Patienten, sprich 8,6 %, aufgrund der deutlich geringeren Anzahl an Patienten der Nebengruppen heraus.

Gleiches gilt für die Patienten in der dritten Lebensdekade, welche in der Gruppe der „30 – 35 Jahre“ und der „36 – 40 Jahre“ repräsentiert sind. Erstere enthält 18 Patienten und ergibt somit einen Anteil von 8,6 %. Die Gruppe „36 – 40 Jahre“ besteht aus 19 Patienten. Dies entspricht einem Anteil von 9,1 %.

Die Patientengruppe der über 70- Jährigen enthält sechs Patienten, welches einem Anteil von 2,9 % entspricht. Die Patienten dieser Altersgruppe wurden aufgrund der Einschlusskriterien aus der Studie ausgeschlossen.

Nach der Selektion der Patienten aufgrund ihrer klinischen Daten verblieben noch 53 Patienten in der Studie. Auch diese Patienten wurden unter dem Aspekt ihres Alters analysiert. Das nachfolgende Liniendiagramm zeigt die Ergebnisse.

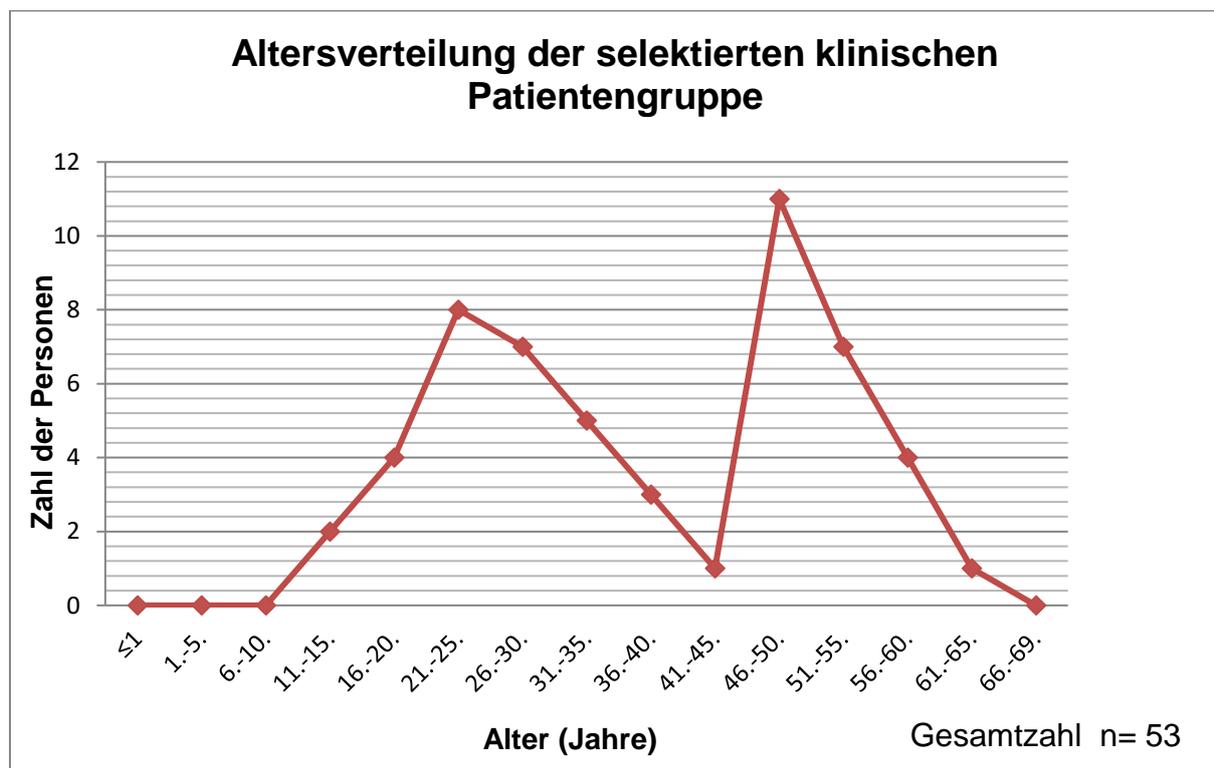


Abbildung 26 Altersverteilung der selektierten klinischen Patientengruppe (n=53).

Nach der Aussortierung gibt es keine Patienten in den Gruppen „unter einem Jahr“, „1 – 5 Jahre“ und „6 – 10 Jahre“. Auch die Altersgruppe „66 – 69 Jahre“ enthält keine Patienten mehr.

Es sind zwei Verteilungsspitzen zu erkennen. In der Gruppe der 21- bis 25- Jährigen befinden sich acht Patienten. Das sind 15,1 % der selektierten Patientengruppe. Die größte Kohorte ist die Gruppe „46 – 50 Jahre“ mit elf Patienten. Dies entspricht 20,8 %.

Besonders gering ist die Anzahl der 41- bis 45- Jährigen und der 61- bis 65- Jährigen. Sie beträgt bei beiden Gruppen jeweils nur einen Patienten. Das ist ein jeweiliger Anteil von 1,7 %.

Der jüngste Patient in der selektierten klinischen Patientenpopulation ist zwölf Jahre, drei Monate und 21 Tage alt. Der älteste Patient ist 64 Jahre, zwei Monate und 29 Tage alt. Das Durchschnittsalter der Gruppe beträgt 38 Jahre.

5.2.3 BMI

Der Body-Mass-Index (BMI) wurde bei den Patienten des klinischen Kollektives zur Einschätzung für das Vorliegen einer LAL-D Erkrankung bestimmt. Zusätzlich diente der BMI als Einschlusskriterium der Studie. Patienten mit einem BMI $\geq 30,0$ kg/m² wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Das nachfolgende Säulendiagramm zeigt den Anteil der Patienten, bei denen der BMI aufgrund der klinischen Angaben ermittelt werden konnte.

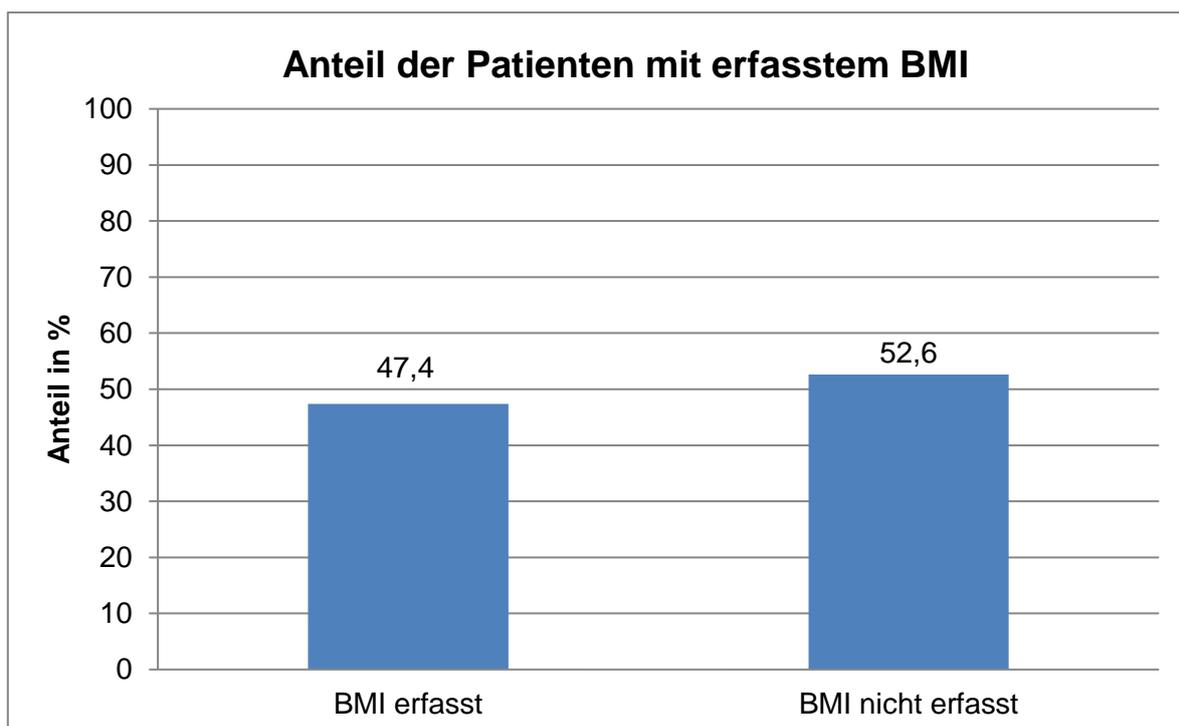


Abbildung 27 Anteil der Patienten mit erfasstem BMI.

Der Body-Mass-Index konnte bei 47,4 % der 209 Patienten ermittelt werden. Das sind 99 Patienten. Bei 110 Patienten, also 52,6 %, konnte der BMI nicht errechnet werden.

Anhand der errechneten BMI- Werte wurden die Patienten in vier Gruppen geteilt. Diese sind: „Untergewicht“, „Normalgewicht“, „Präadipositas“ und „Adipositas“. Das nachfolgende Balkendiagramm stellt die Resultate dar.

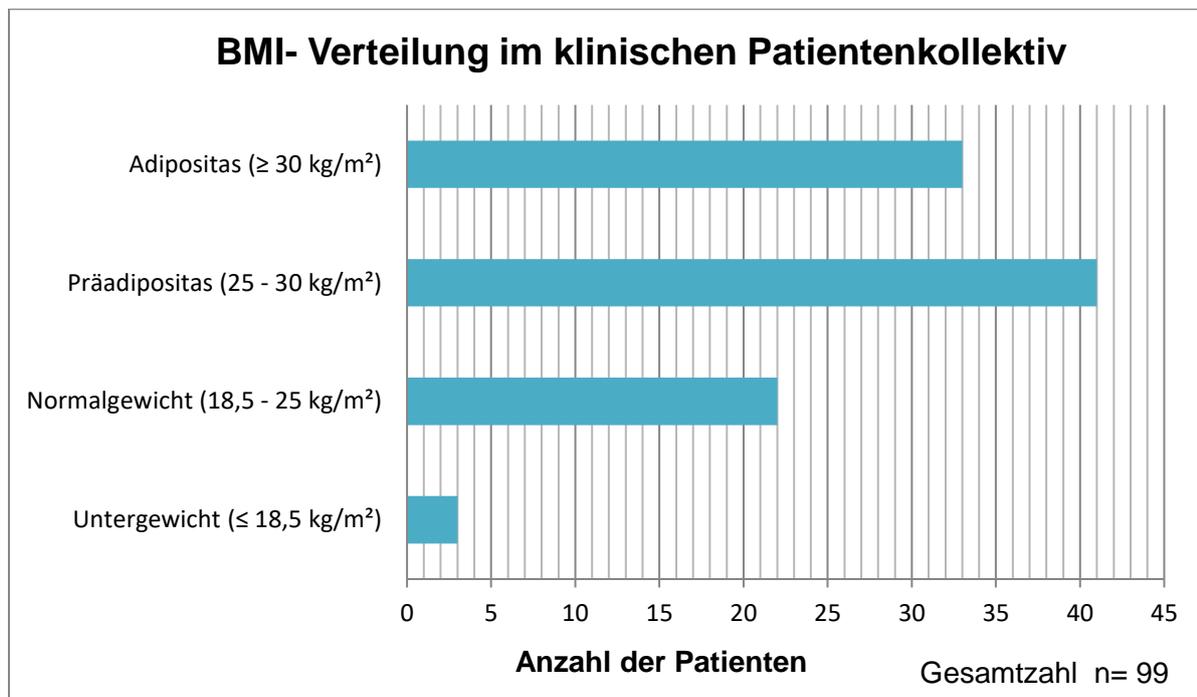


Abbildung 28 BMI-Verteilung im klinischen Patientenkollektiv.

Bei insgesamt 99 Patienten wurde der BMI ermittelt. Davon sind drei Patienten (3,03 %) untergewichtig. Die Gruppe der Normgewichtigen besteht aus 22 Patienten. Das sind 22,2 %. Einen BMI von 25 kg/m^2 bis 30 kg/m^2 haben 41 Patienten, welches einem Anteil von 42,7 % entspricht. In der Gruppe „Adipositas“ sind 32 Patienten. Das macht einen Anteil von 33,3 %. Diese Patienten wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Der niedrigste BMI beträgt 16,6 kg/m^2 . Der höchste errechnete BMI ist 44,4 kg/m^2 . Der durchschnittliche BMI beträgt 28,3 kg/m^2 .

Neben dem Body-Mass-Index, welches für Erwachsene Gültigkeit hat, gibt es die Perzentilenkurven für Kinder bis 18 Jahren. Diese wurden im Rahmen der Studie auch ermittelt, da es 31 Patienten unter 18 Jahren gab. Analog zur Darstellung der Ergebnisse der BMI-Werte erfolgt die Schilderung der Ergebnisse für die Patienten bis 18 Jahren. Es folgt ein Säulendiagramm zur Veranschaulichung des Anteiles der Patienten mit ermittelten Perzentilenkurven.

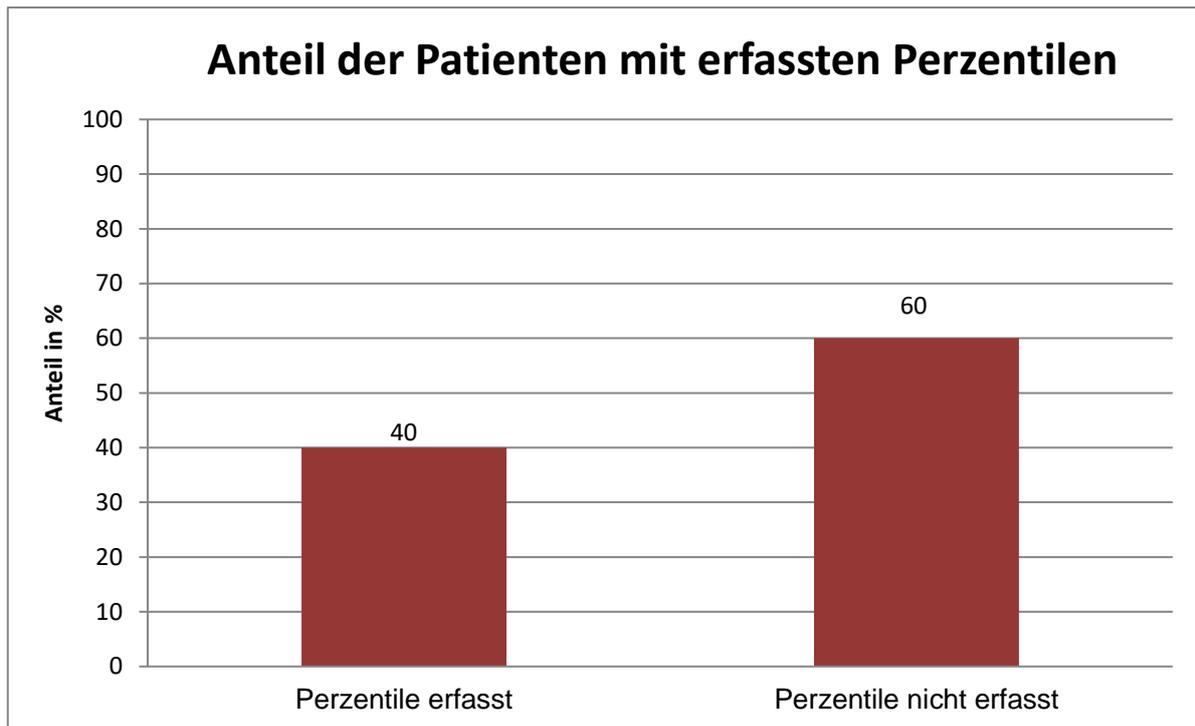


Abbildung 29 Anteil der Patienten mit erfassten Perzentilen.

Die Perzentilenkurven konnten für 40 % der 20 Patienten ermittelt werden. Das sind acht Patienten. Bei zwölf Patienten, also 60 %, konnten die Perzentilenkurven nicht ermittelt werden.

Gemäß der ermittelten Perzentilenwerte wurden die Patienten in drei Gruppen unterteilt: < 10. Perzentile, 10. bis 90. Perzentile und > 90. Perzentile. Patienten, die unter der 10. Perzentile liegen, sind untergewichtig (Gewichtsporzenteile) oder zu klein (Größenperzentile) im Vergleich zu gleichgeschlechtlichen Kindern im gleichen Alter. Liegen sie zwischen der 10. und der 97. Perzentile sind sie im Normbereich. Bei einer Perzentile ≥ 97 . sind die Kinder adipös (Gewichtsporzenteile) oder zu groß (Größenperzentile) im Vergleich zu gleichgeschlechtlichen Kindern im gleichen Alter. Das nachfolgende Balkendiagramm stellt die Resultate dar.

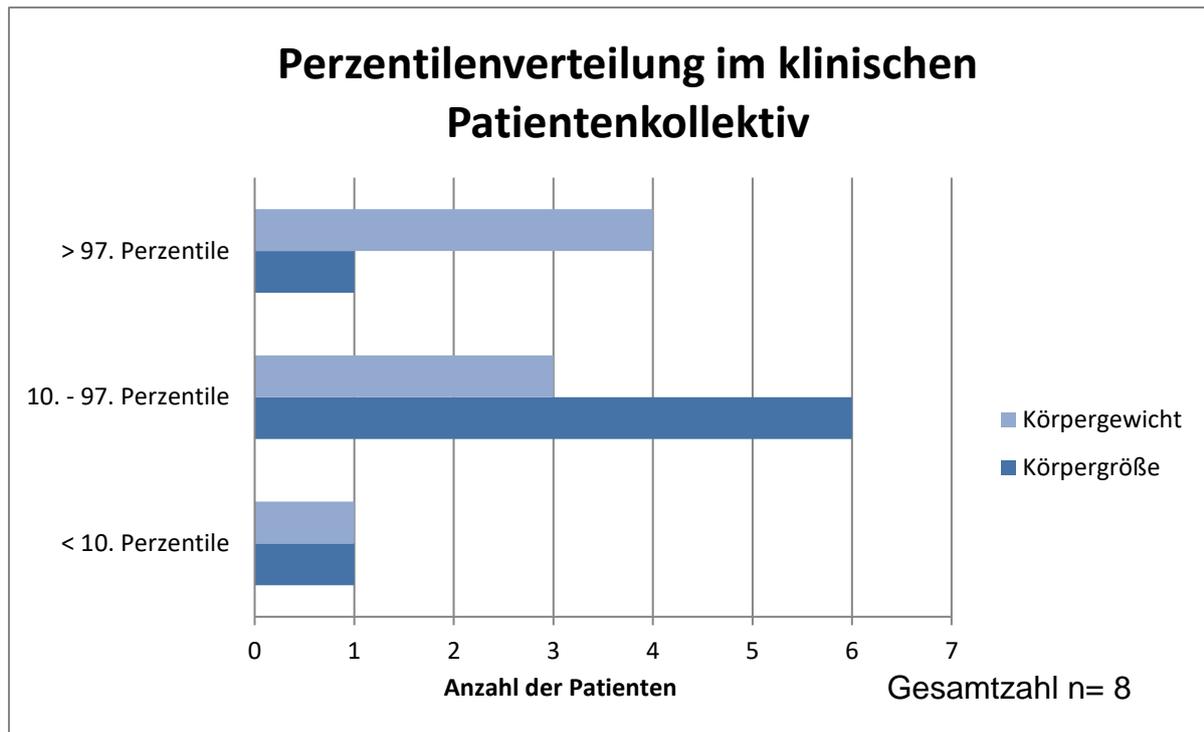


Abbildung 30 Perzentilenverteilung im klinischen Patientenkollektiv.

Der größte Teil der Kinder liegt in der Größenperzentile im Normbereich. Das sind sechs Kinder, also 75 %. Drei Kinder liegen in der Gewichtsperzentile im Normbereich. Das entspricht 37,5 %. Der größte Teil der Kinder liegt in der Gewichtsperzentile über der 97. Perzentile. Es sind 50 %, sprich vier Kinder. Sie sind demnach adipös und wurden aus der Studie ausgeschlossen. Größenmäßig liegt nur ein Kind über der 97. Perzentile. Das sind 12,5 %. Lediglich ein Kind liegt jeweils in der Gewichts- und der Größenperzentile unter der 10. Perzentile. Das entspricht 12,5 %.

5.2.4 Laborwerte

In dem nachfolgenden gestapelten Säulendiagramm werden die Laborparameter LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Gesamt-Cholesterin, Gesamt-Triglyzeride, ALT und AST in ihrer Verteilung in der Patientengruppe der klinischen Untersuchung dargestellt.

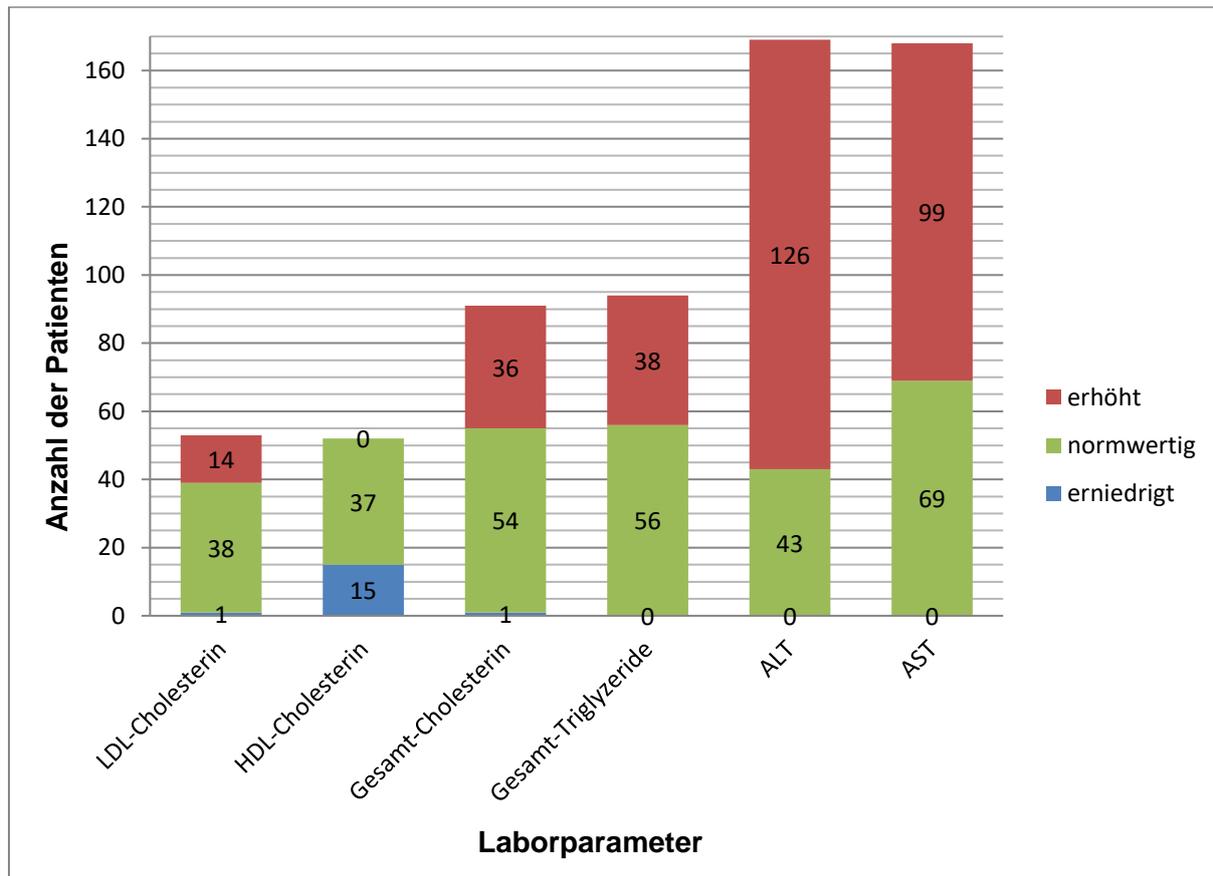


Abbildung 31 Verteilung der Laborwerte in der klinischen Patientengruppe.

Die Gesamtanzahl des klinischen Patientenkollektives betrug 209 Patienten. Es fällt daher auf, dass nicht von allen Patienten die Laborparameter gesammelt werden konnten.

Am häufigsten wurden die Serumtransaminasen ALT und AST für die Laboruntersuchung abgenommen. Es liegen bei 169 Patienten die Werte für ALT und bei 168 Patienten die Ergebnisse für AST vor. Demnach wurden bei 80,9 % der Patienten das ALT und bei 80,4 % das AST ermittelt. Es zeigt sich, dass ALT bei 43 Patienten normwertig ist. Bei den restlichen 126 Patienten ist es erhöht und deutet folglich auf eine Leberschädigung hin.

AST ist bei 69 Patienten normwertig und bei 99 Patienten erhöht. Damit liegt bei 74,6 % der Patienten eine ALT-Erhöhung und bei 58,9 % der Patienten eine Erhöhung der AST vor.

Das Gesamt-Cholesterin wurde bei 91 Patienten erhoben. Dies entspricht 43,5 % des klinischen Kollektives. Dabei war das Gesamt-Cholesterin bei einem Patienten erniedrigt und bei 54 Patienten im Normbereich. Bei 36 Patienten, also 39,6 %, war das Gesamt-Cholesterin erhöht.

Bei 94 Patienten wurde die Gesamt-Triglyzeride bestimmt. Das sind 45,0% der Patientengruppe. Bei 56 Patienten war es normwertig und bei 38 Patienten (40,4 %) erhöht.

Das LDL-Cholesterin und das HDL-Cholesterin wurden am seltensten abgenommen. Das LDL-Cholesterin wurde bei 53 Patienten und das HDL-Cholesterin bei 52 Patienten bestimmt. Dies sind 25,4 % (LDL-Cholesterin) und 24,9 % (HDL-Cholesterin). Das LDL-Cholesterin war bei einem Patienten erniedrigt, bei 38 Patienten normal und bei 14 Patienten erhöht. Folglich lag eine Erhöhung des LDL-Cholesterins bei 26,4% vor. Das HDL-Cholesterin war bei 37 Patienten in der Norm und bei 15 Patienten erniedrigt. Dies entspricht 28,8 %.

Insgesamt gab es einen Patienten, der alle für eine LAL-D sprechenden Veränderungen zeigte. Zusätzlich gab es zwei weitere Patienten, die alle typischen Laborveränderung bis auf die erhöhten Gesamt-Triglyzeride zeigten. Daneben gab es einen weiteren Patienten, der die typischen Veränderungen in den Blutfetten, jedoch keine erhöhten Serumtransaminasen aufwies.

5.3 Pathologische Befunde

In dem nachfolgenden Kreisdiagramm sind die verschiedenen Diagnosen der pathologischen Befunde, welche im ersten Schritt der Studie analysiert wurden, im Vergleich zueinander aufgeführt. Dabei wurden die Befunde in sechs verschiedene Diagnosegruppen geteilt: Neoplasien, sowohl benigne als auch maligne, Hepatitiden, Metastasen, Alkoholische Steatohepatitis (ASH), studienrelevante Befunde und „Andere“.

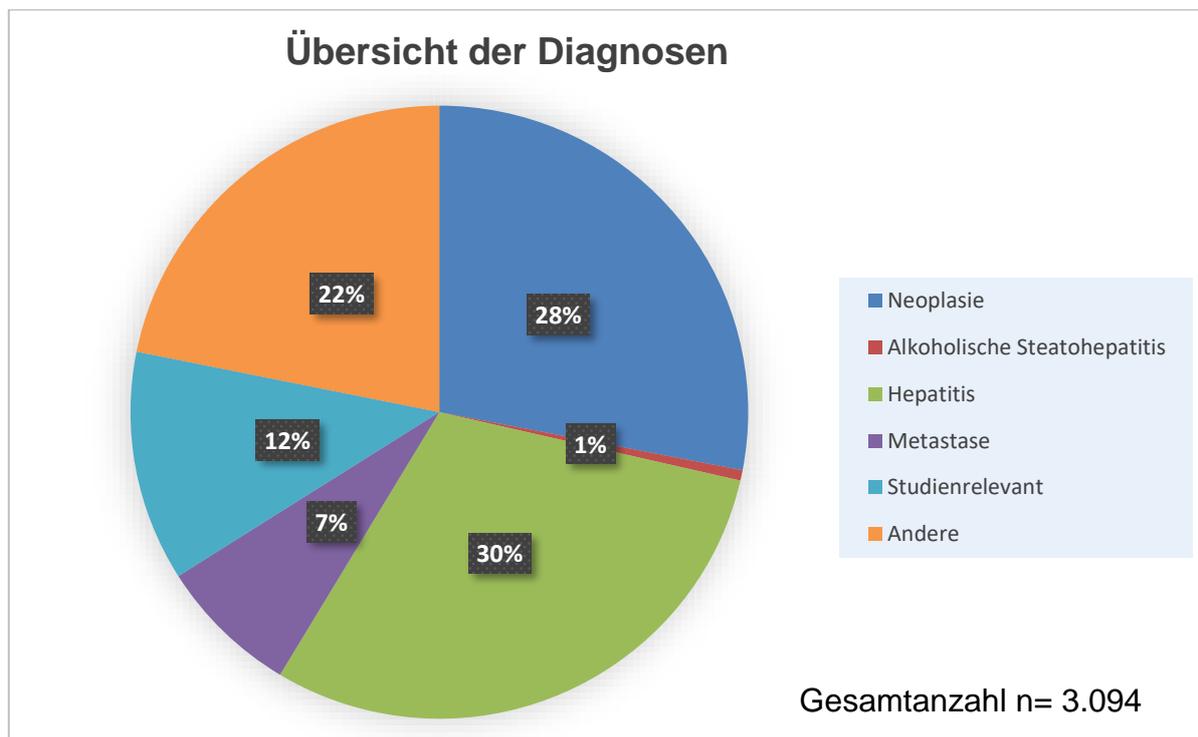


Abbildung 32 Übersicht der Diagnosen der pathologischen Befunde.

Bei einer Gesamtzahl von 3094 Befunden, fielen 928 Befunde aufgrund von Hepatitiden heraus. Das sind 30 % der Gesamtzahl und somit die größte Diagnosegruppe. Weitere 676 Befunde, sprich 22 %, wurden in die Diagnosegruppe „Andere“ eingestuft und entfielen für den weiteren Verlauf der Studie. Abermals 229 Befunde konnten der Gruppe „Metastase“ zugeordnet werden. Dies entspricht 7 %. Die kleinste Gruppe in der Verteilung war die Gruppe „ASH“ mit einem Anteil von 1 % an der Gesamtzahl. Demnach entfielen 17 Befunde für die Diagnose einer Alkoholischen Steatohepatitis. Für die Studie in Frage kommende Befunde wurden in der Gruppe „Studienrelevant“ zusammengefasst. Es konnten 376 passende Befunde gefunden werden. Der Anteil der studienrelevanten Gruppe beträgt dementsprechend 12 %. Es stellt damit die viertgrößte Diagnosegruppe dar.

Die verbliebene Gruppe ist die der Neoplasien. Sie beinhaltet 868 Befunde. Mit einem Anteil von 28 % ist sie die zweitgrößte Gruppe. Diese Gruppe lässt sich in zwei weitere Untergruppen unterteilen, wie das folgende Kuchendiagramm zeigt.

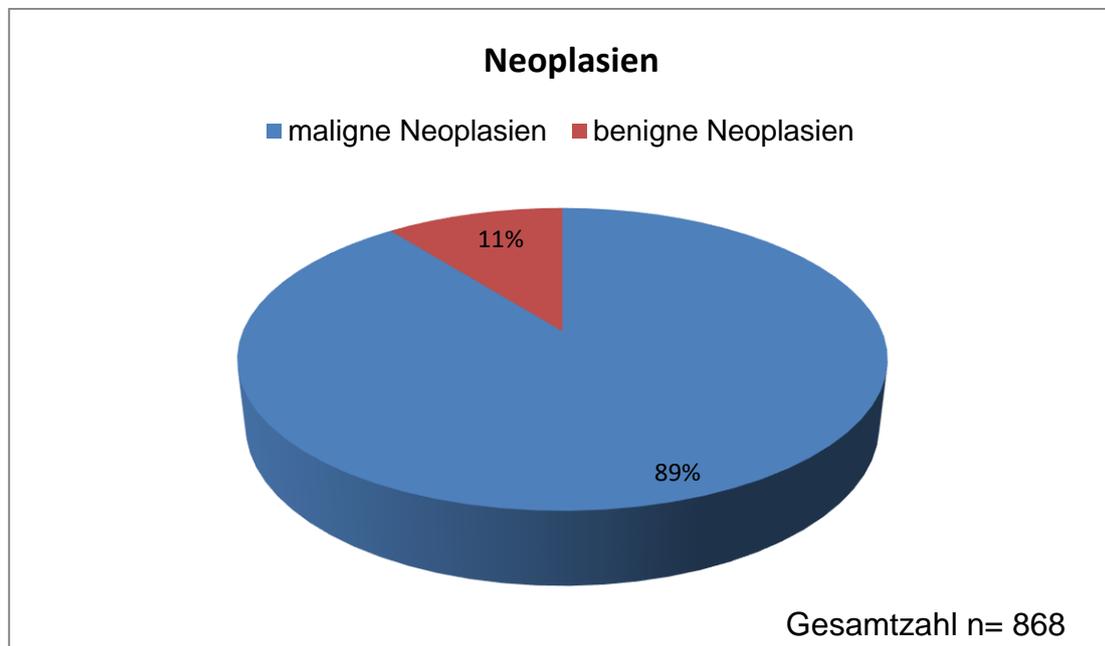


Abbildung 33 Verteilung der Neoplasien.

Benigne Neoplasien wurden in 92 Befunden ermittelt, wohingegen maligne Neoplasien in 769 Fällen vorlagen. Damit stellen maligne Neoplasien mit 89 % eindeutig die Mehrheit dar. In 411 Befunden der malignen Neoplasien wurden Karzinome diagnostiziert. Sie repräsentieren mit 57,3 % mehr als die Hälfte der malignen Neoplasien.

5.4 Befunde der Mikroskopie

Im nachfolgenden Abschnitt werden einige der Präparate der Patienten dieser Studie dargestellt. Im Unterthema „Differentialdiagnosen“ werden zunächst Präparate der gängigen Differentialdiagnosen der LAL-D gezeigt. Im darauffolgenden Unterthema werden exemplarisch die Leberpathologien der Patienten des letzten Studienschrittes aufgeführt.

5.4.1 Differentialdiagnosen

Eine Differentialdiagnose der LAL-D ist der medikamentös-toxische Leberschaden. Dieser zeichnet sich durch eine gemischtropfige und zonal gegliederte Verfettung aus.

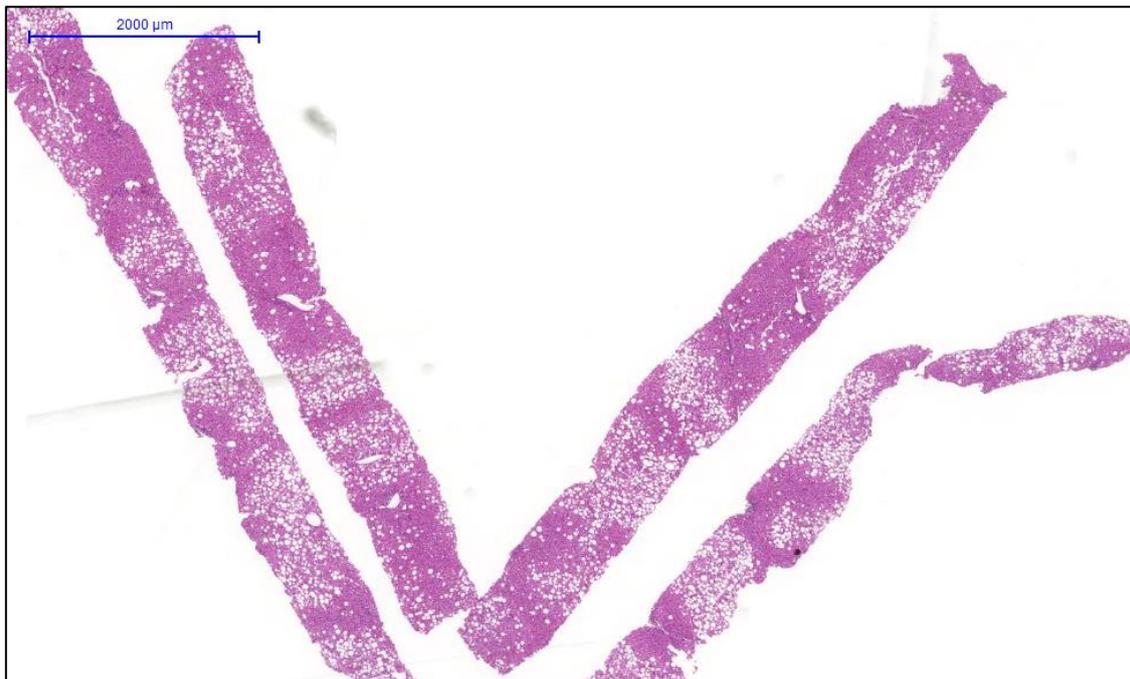


Abbildung 34 Leberschaden medikamentös-toxischer Genese, Übersichtsaufnahme.

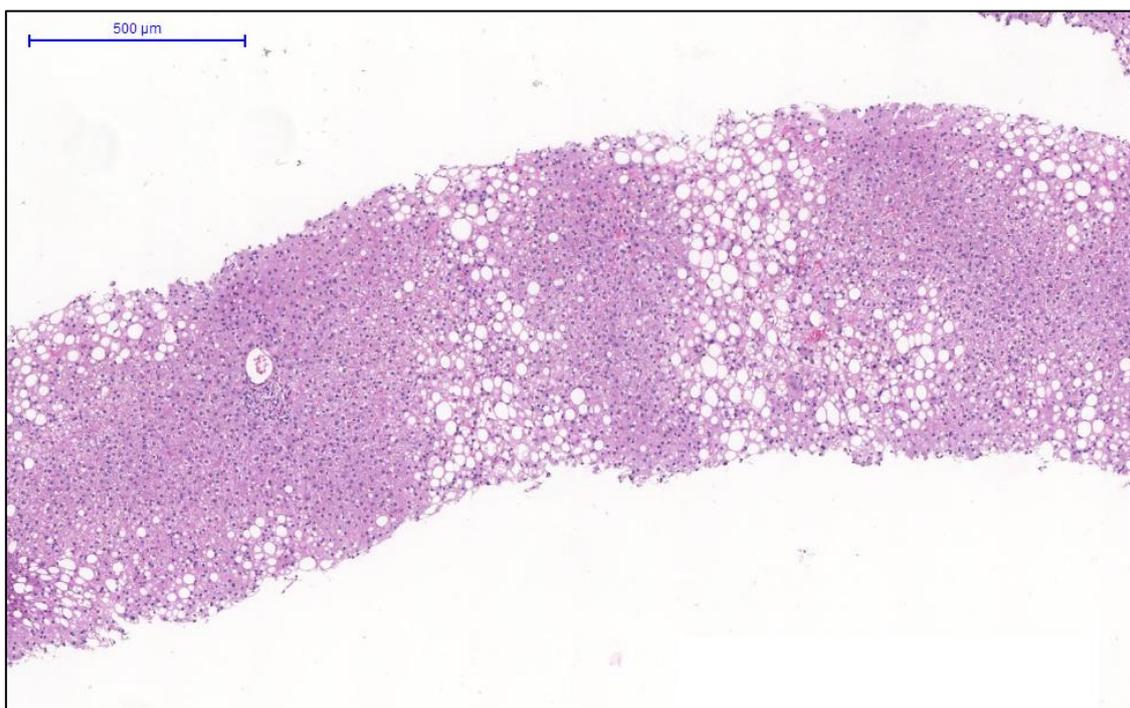


Abbildung 35 Leberschaden medikamentös-toxischer Genese, Detailaufnahme.

Eine weitere Differentialdiagnose ist die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH). Dabei liegt eine gemischttröpfige bis grobtropfige Verfettung vor. Die Verfettung ist dabei diffus und nicht auf eine Zone begrenzt verteilt. Zusätzlich findet man Granulozyten als Zeichen einer lymphohistiozytärer Entzündung.

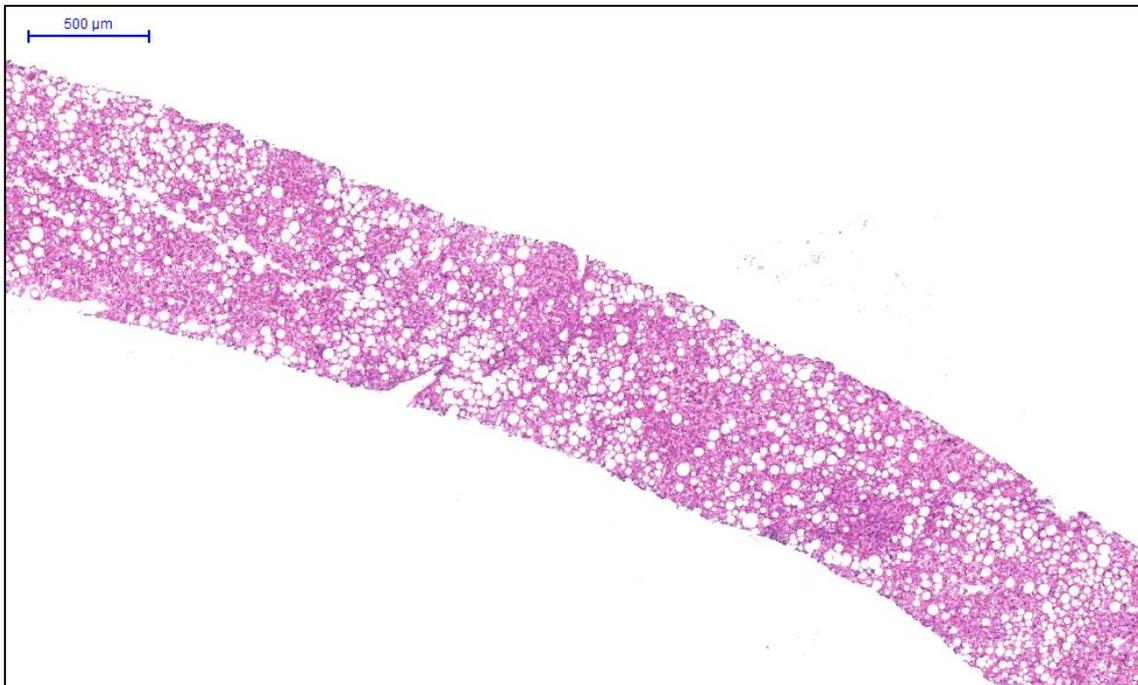


Abbildung 36 Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH).

Auch die äthyltoxische Leberzirrhose stellt eine Differentialdiagnose dar. Die Verfettung ist hierbei grobtropfig und zonal begrenzt. Neben der Verfettung finden sich zusätzlich ein zirrhotischer Leberparenchymumbau mit bindegewebiger Kollagenfaserneubildung und azinäre Entzündungsherde sowie ballonierte Hepatozyten. Die Fibrosierung des Leberparenchyms wird besonders in der PAS-Färbung deutlich.

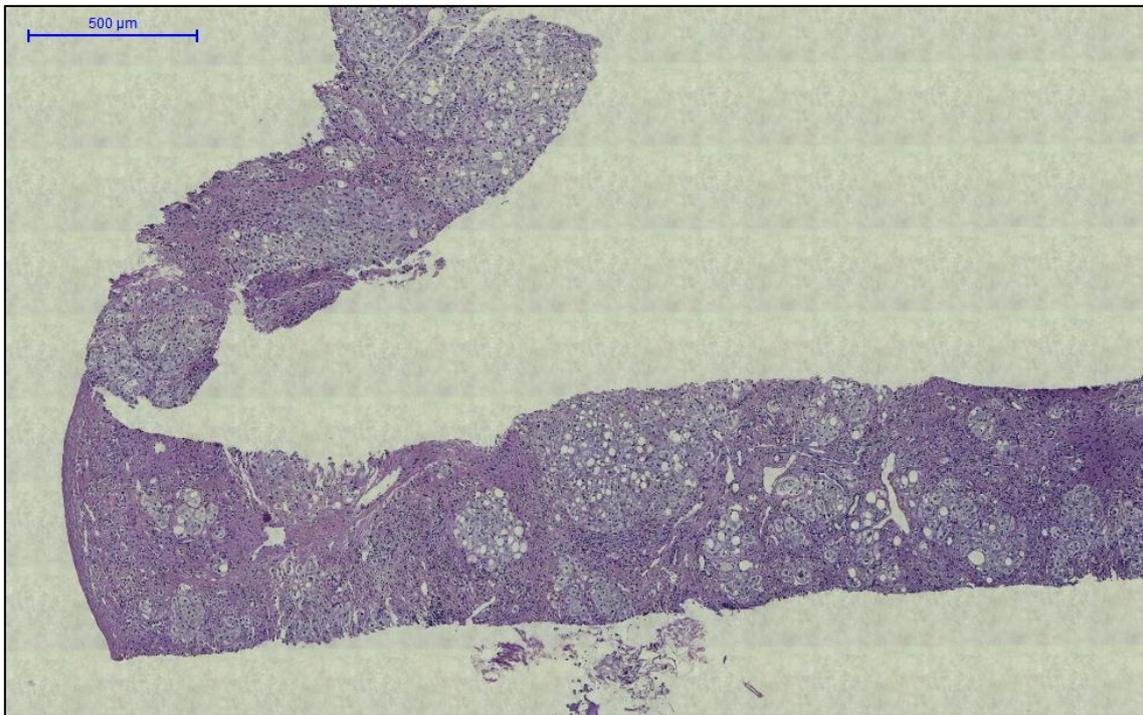


Abbildung 37 Leberzirrhose, PAS-Färbung.

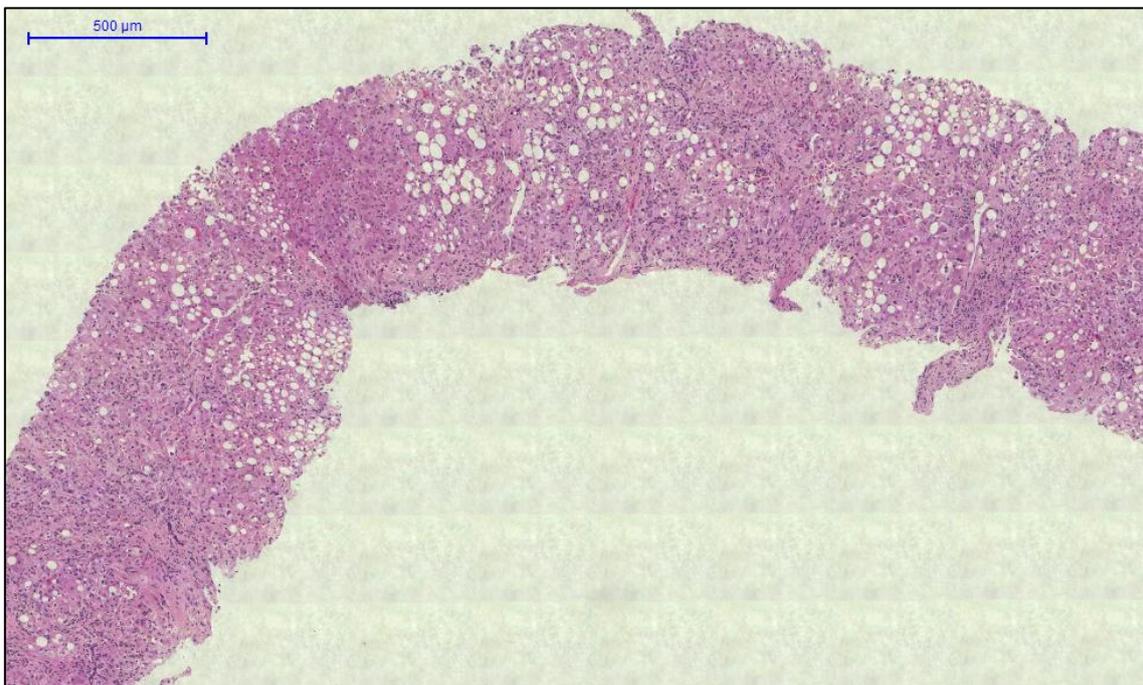


Abbildung 38 Leberzirrhose, HE-Färbung.

5.4.2 Patienten des letzten Studienschrittes

Im folgenden Absatz werden die pathologischen Präparate der Teilnehmer des letzten Studienschrittes, in welchem die CD68-Färbung erfolgte, präsentiert. Es werden sowohl die HE-Färbungen, soweit diese vorlagen, als auch die CD68-Färbungen gezeigt. Bei den zwei Patienten mit LAL-D, die eine positive CD68-Färbung aufweisen, werden zusätzlich die Siriusrot-Färbung, die Eisenfärbung und die Retikulin-Färbung abgebildet.

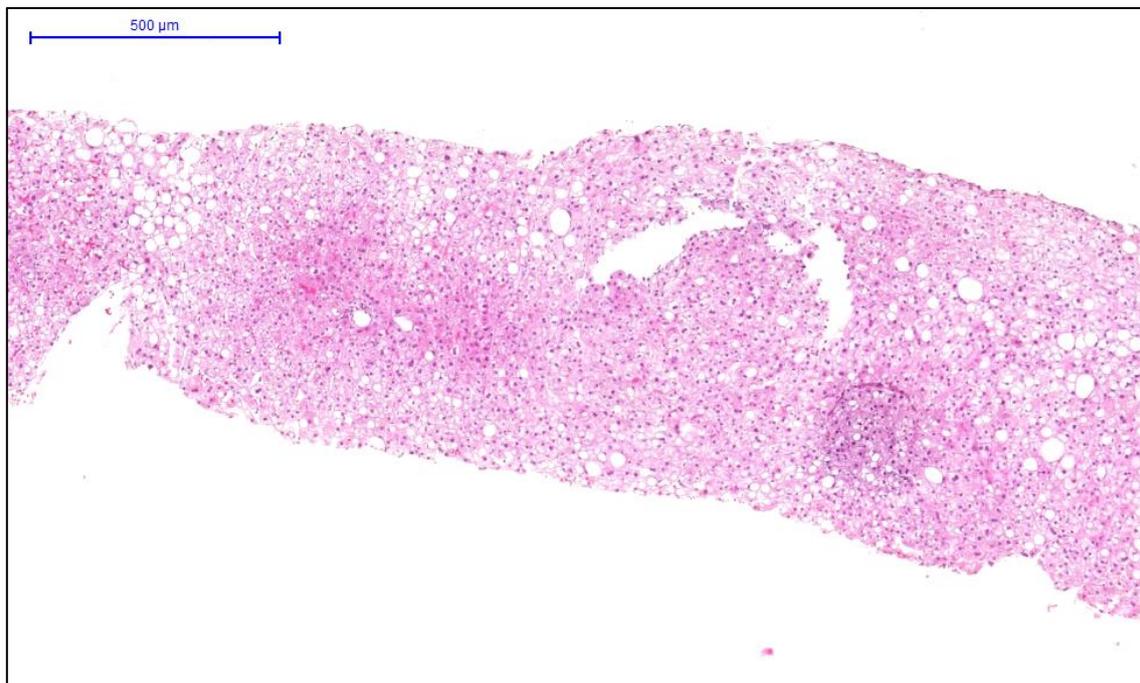


Abbildung 39 Patient A, HE-Färbung.

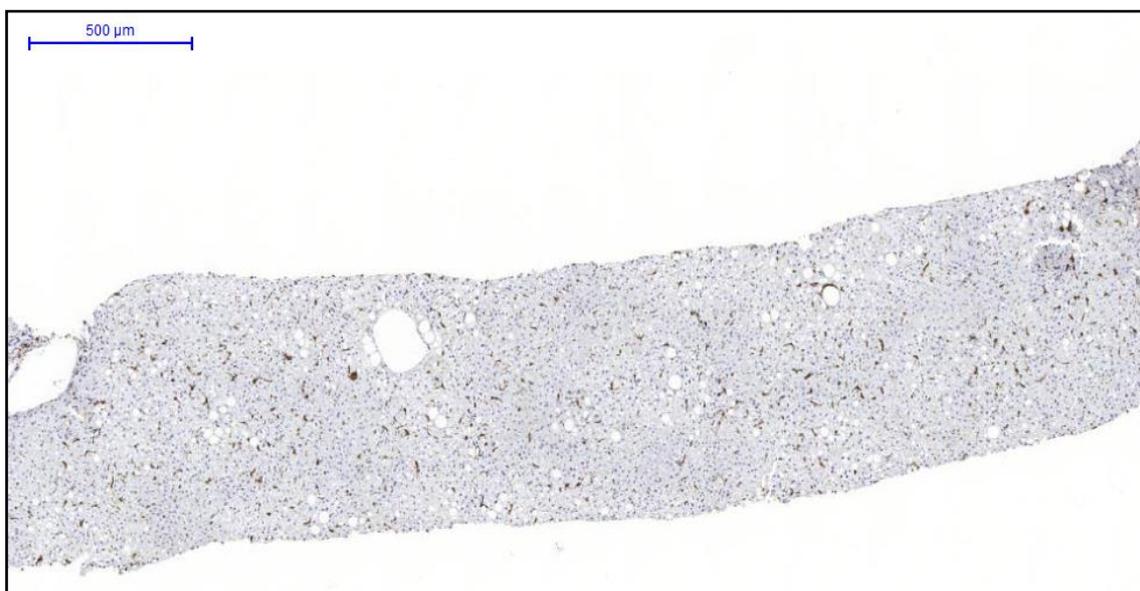


Abbildung 40 Patient A, CD68-Färbung.

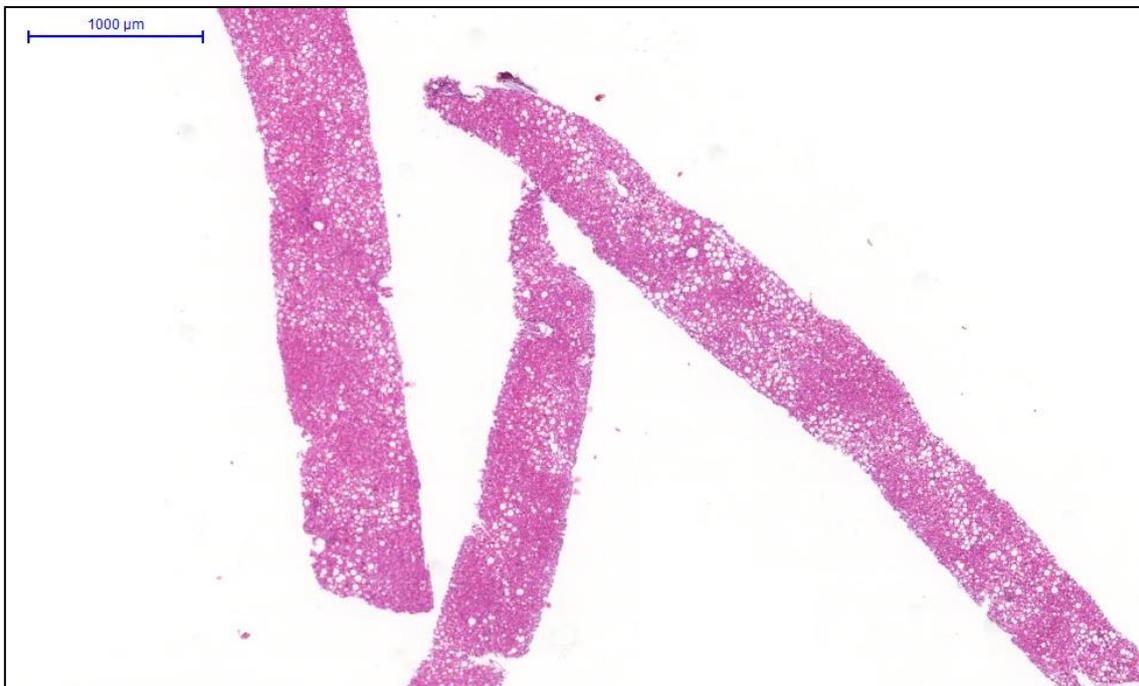


Abbildung 41 Patient B, HE-Färbung.

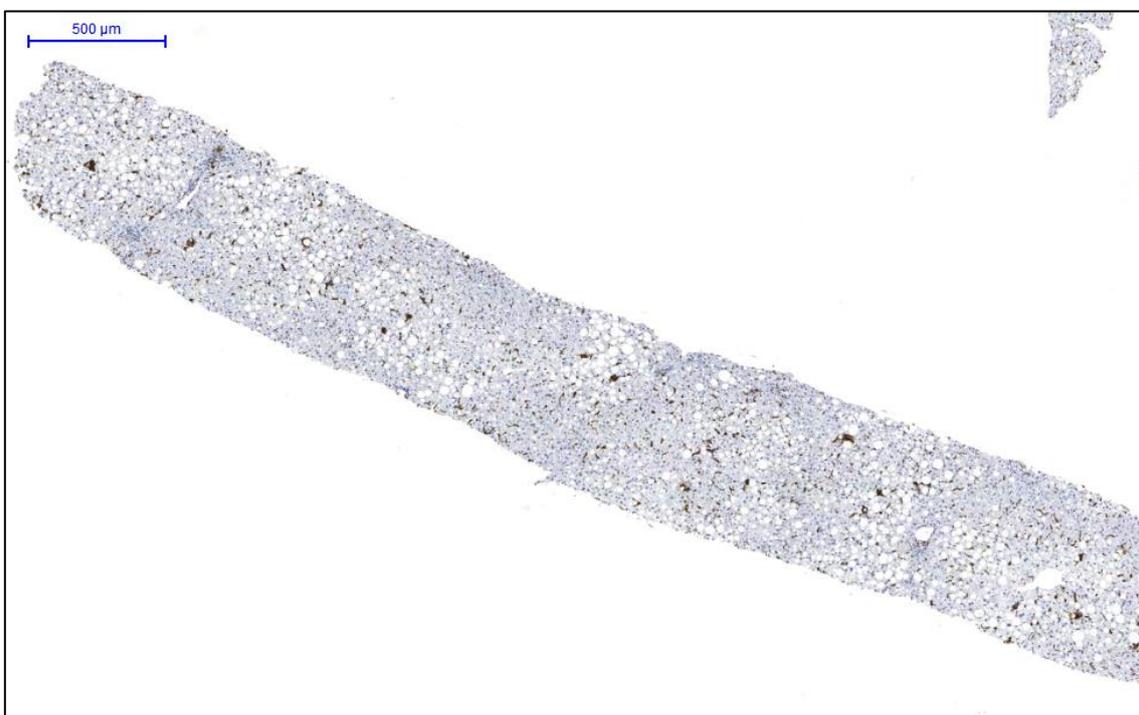


Abbildung 42 Patient B, CD68-Färbung.

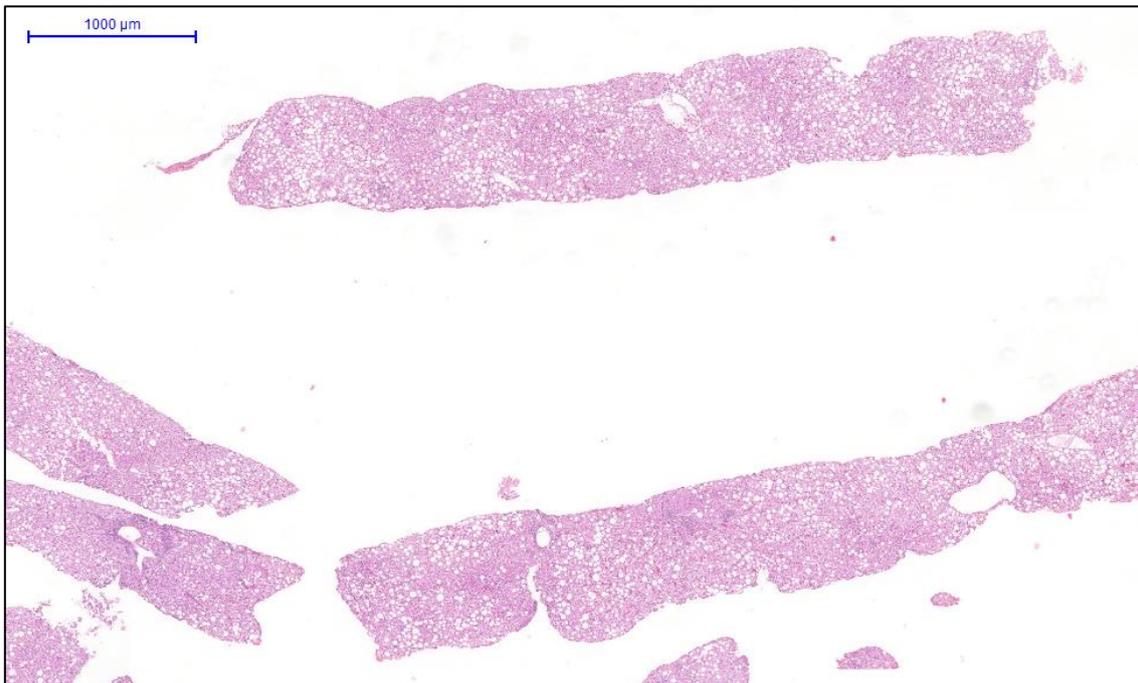


Abbildung 43 Patient C, HE-Färbung.

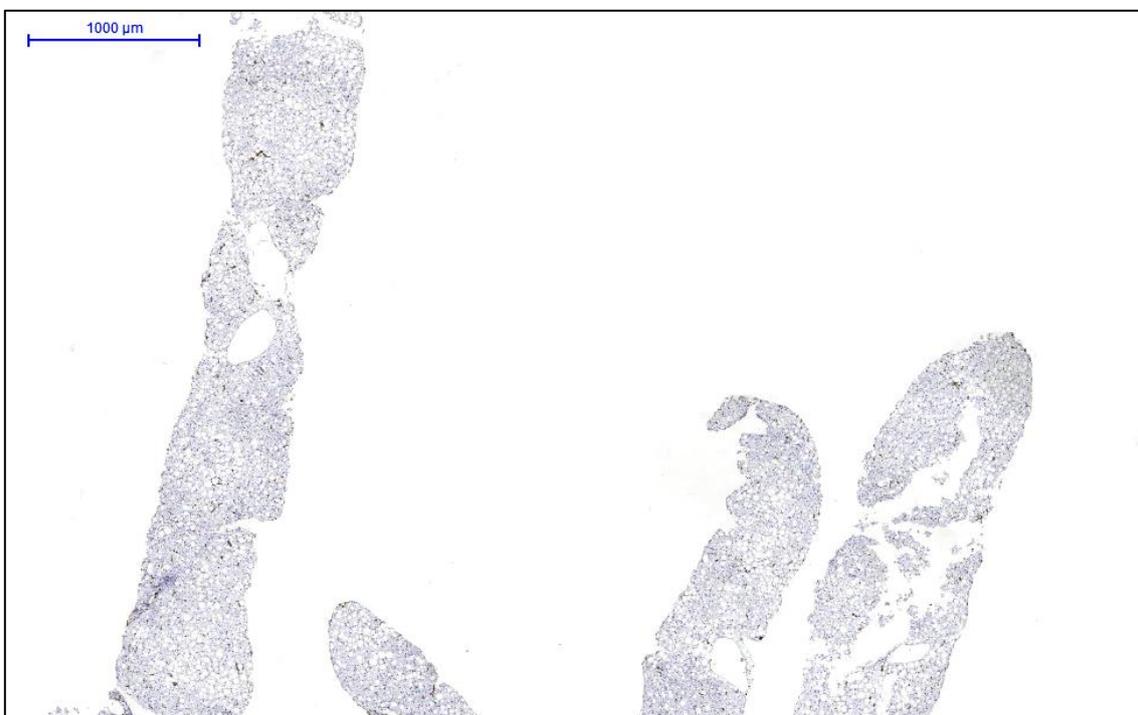


Abbildung 44 Patient C, CD68-Färbung.

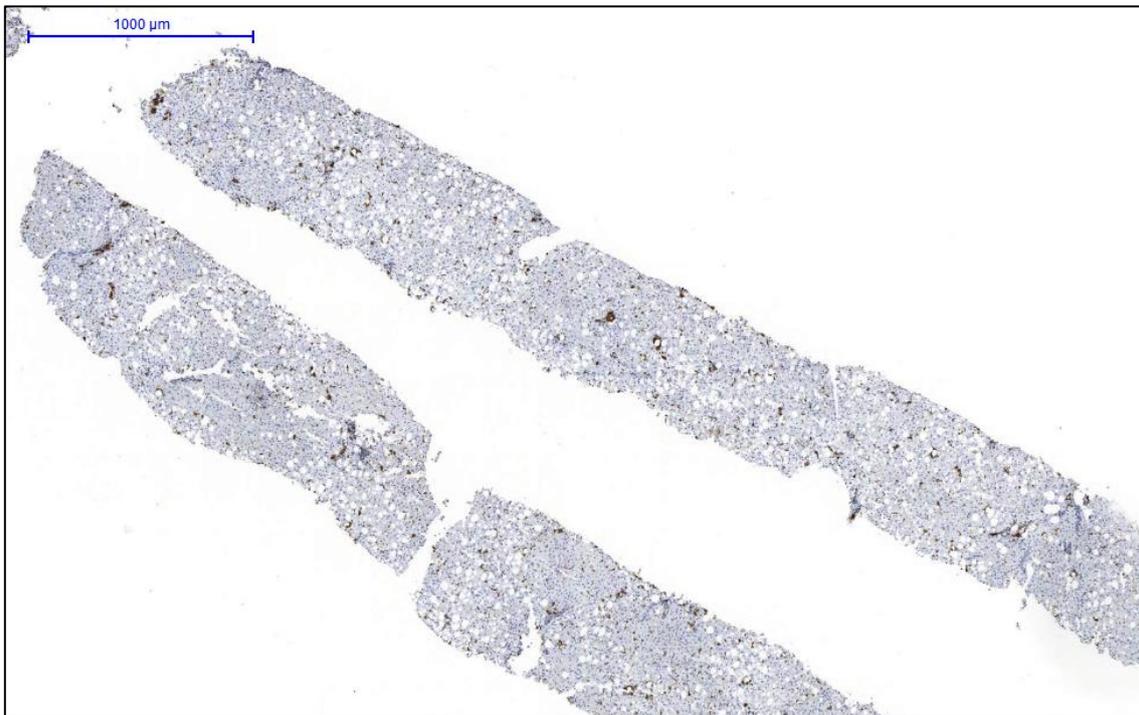


Abbildung 45 Patient D, CD68-Färbung.

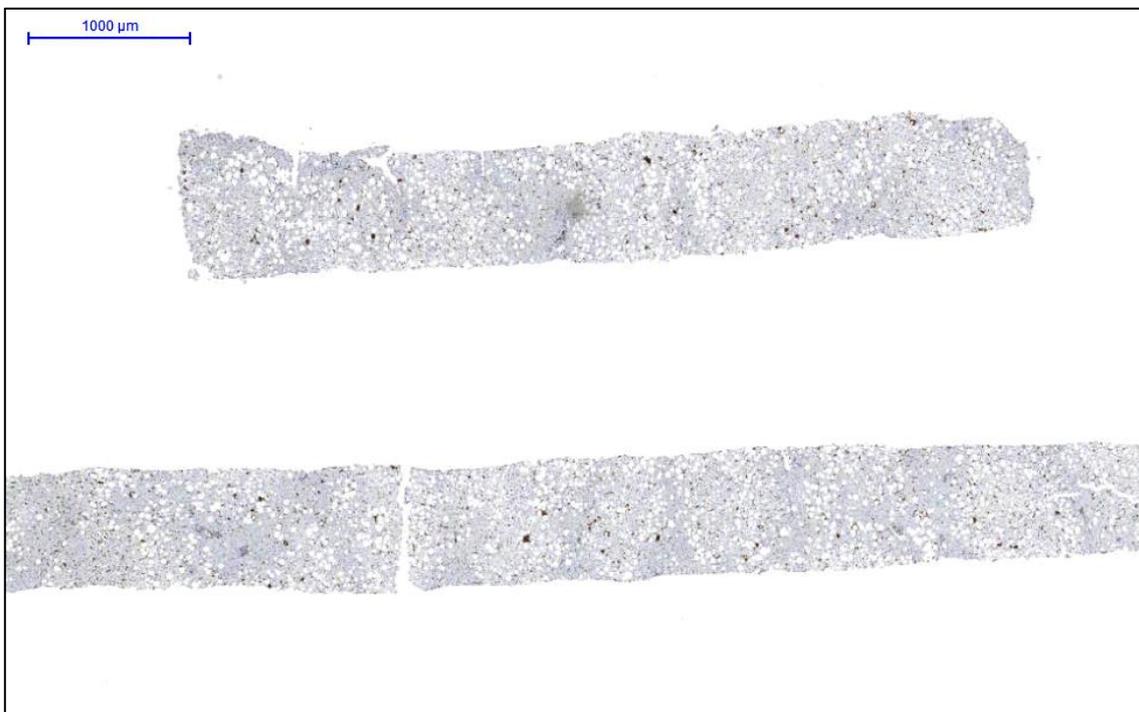


Abbildung 46 Patient E, CD68-Färbung.

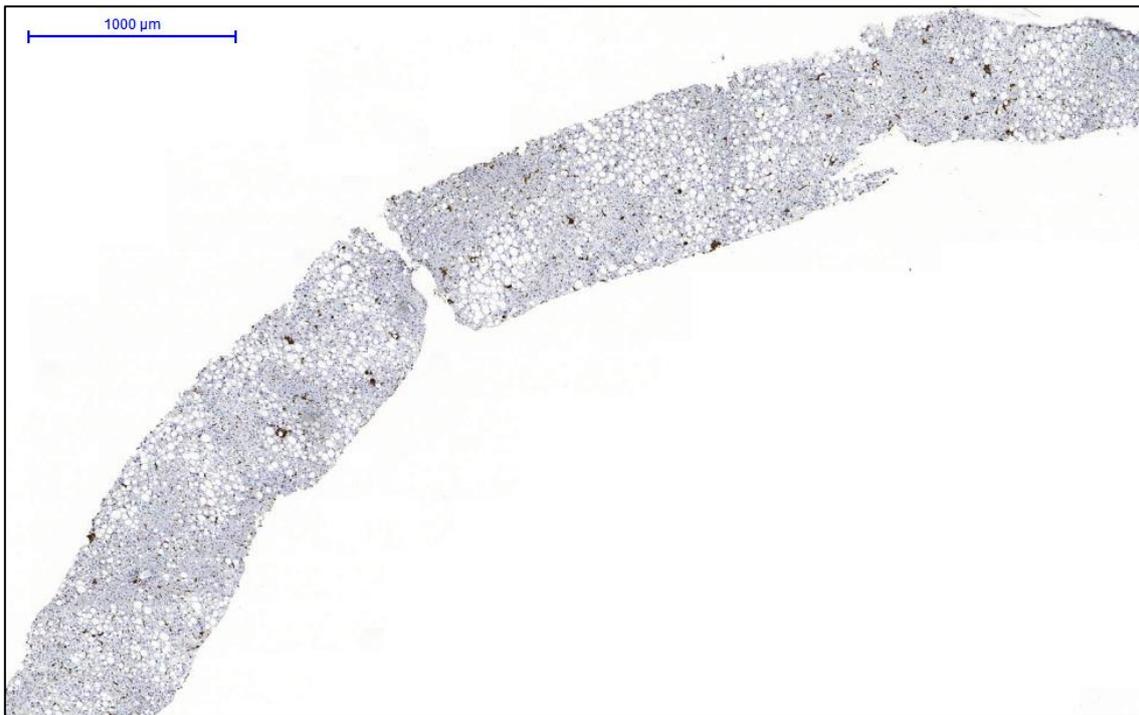


Abbildung 47 Patient F, CD68-Färbung.

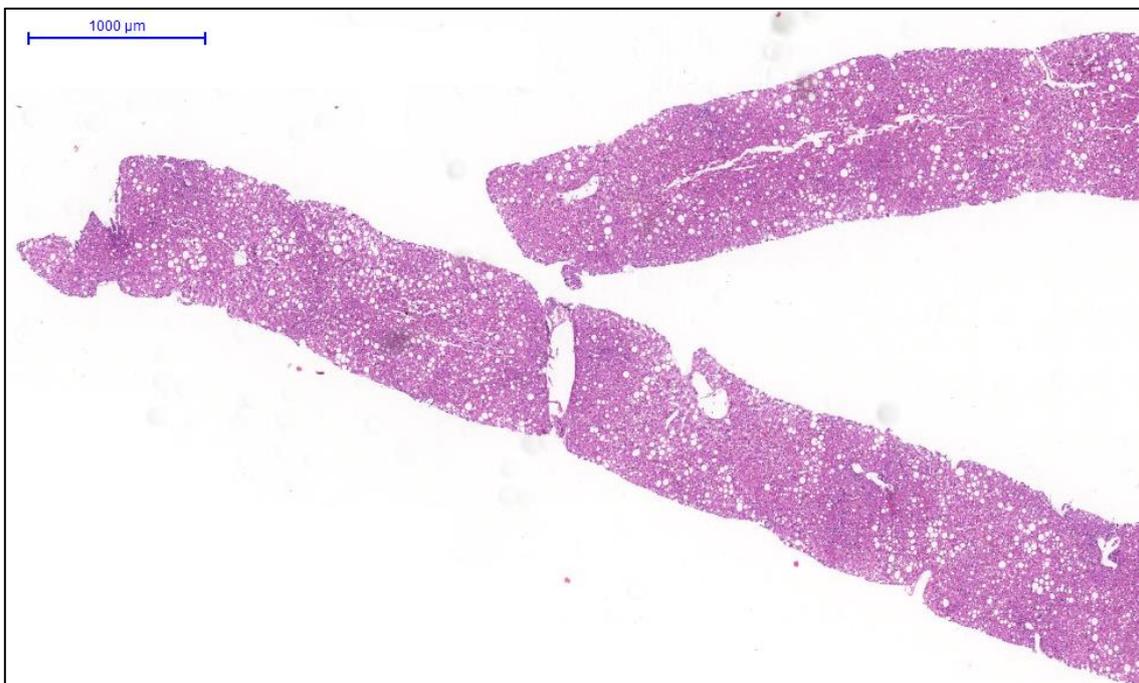


Abbildung 48 Patient G, HE-Färbung.

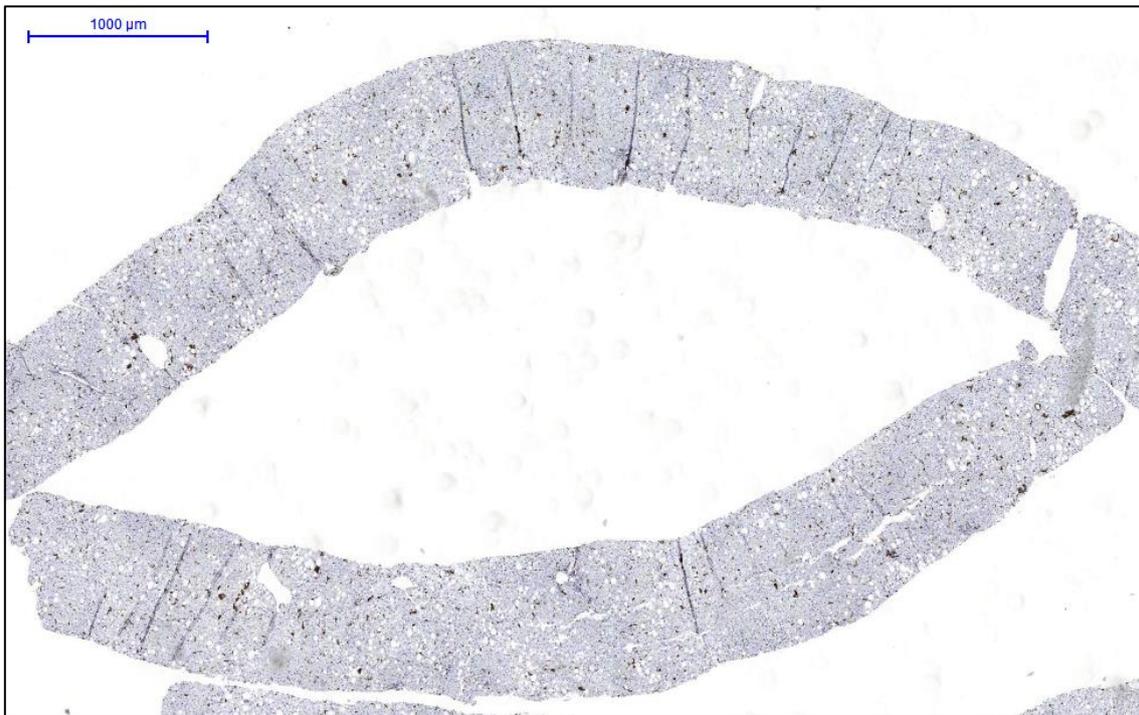


Abbildung 49 Patient G, CD68-Färbung.

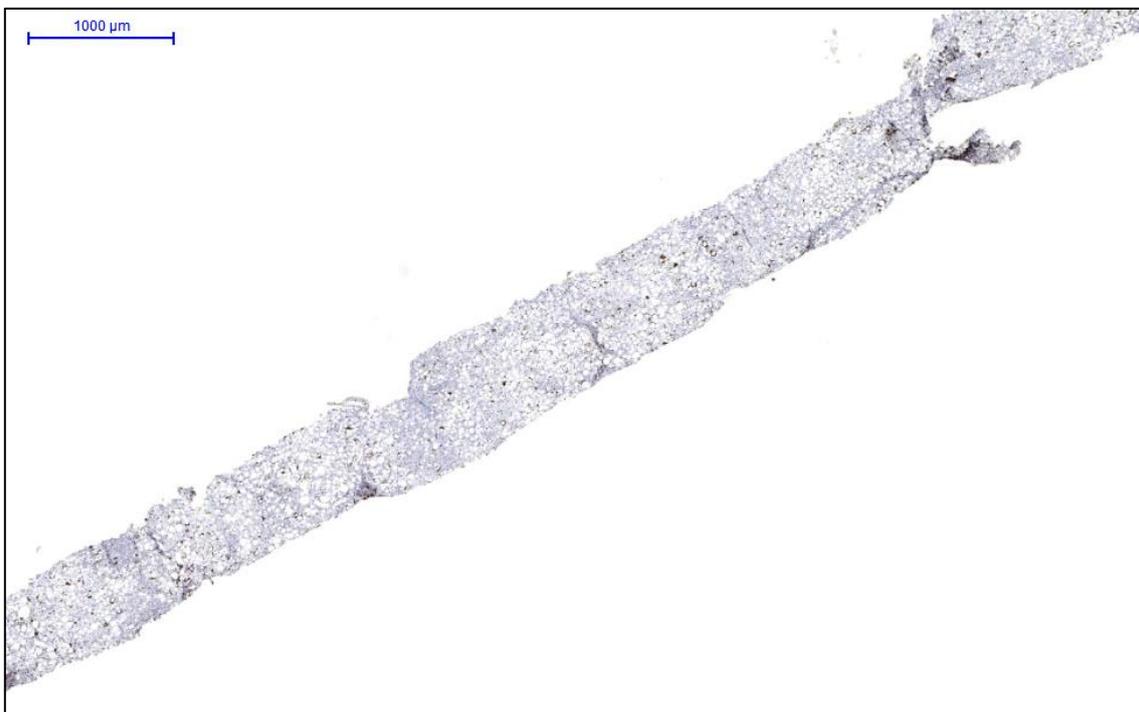


Abbildung 50 Patient H, CD68-Färbung.

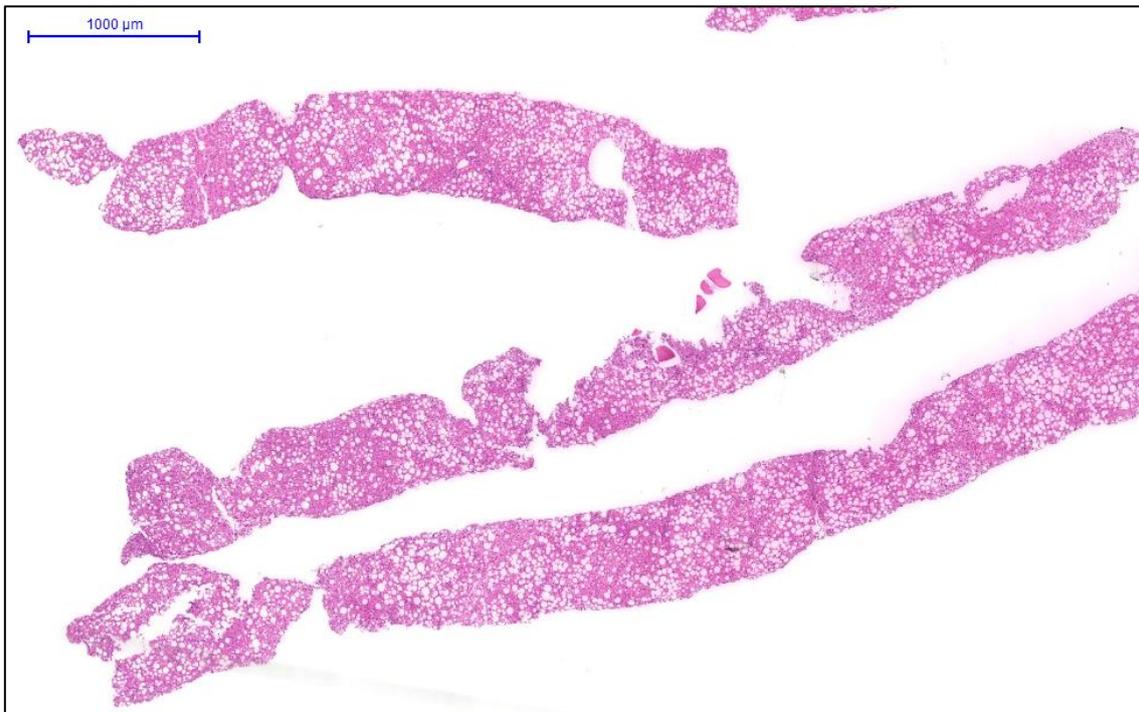


Abbildung 51 Patient I, HE-Färbung.

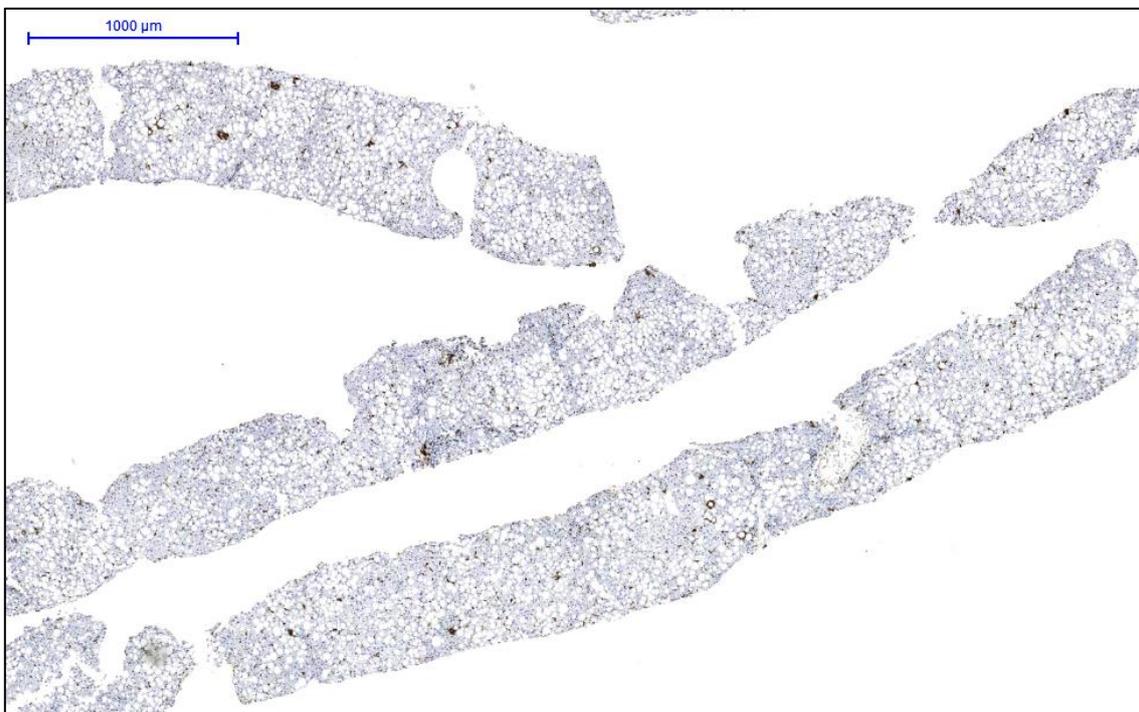


Abbildung 52 Patient I, CD68-Färbung.

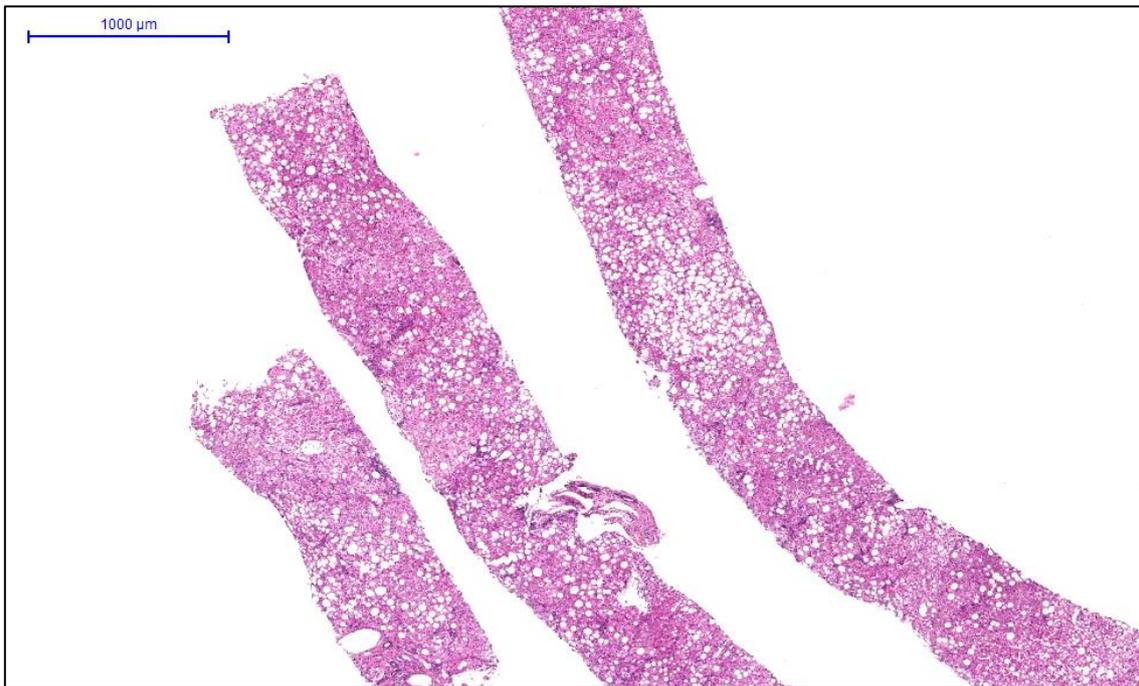


Abbildung 53 Patient J, HE-Färbung.



Abbildung 54 Patient J, CD68-Färbung.

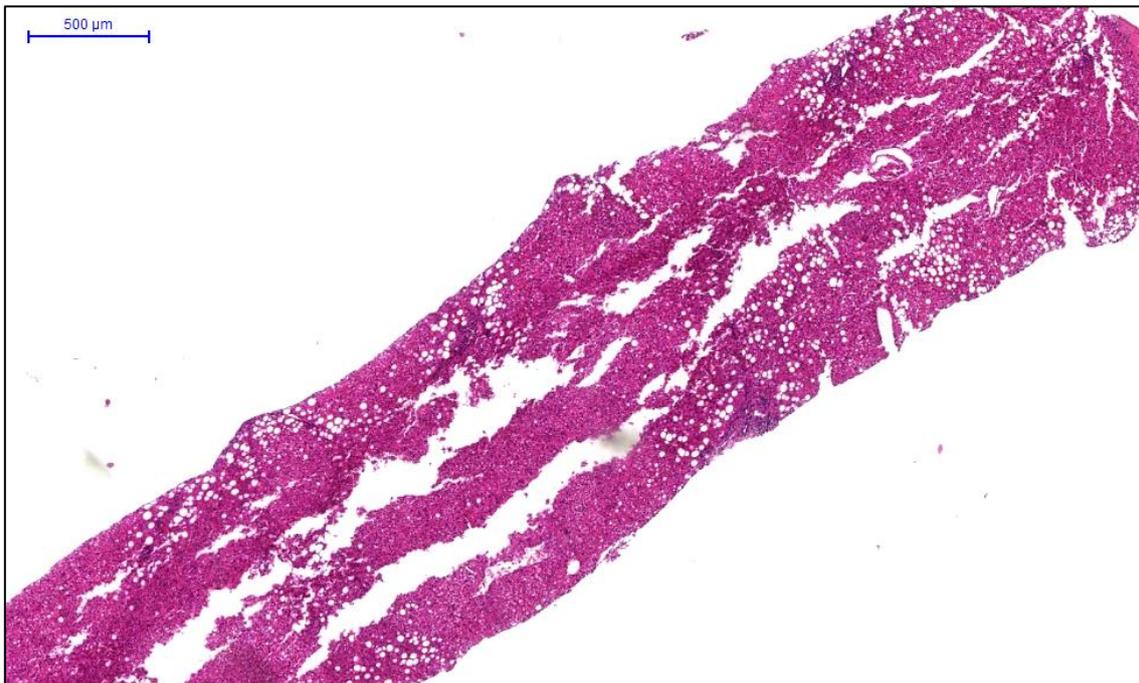


Abbildung 55 Patient K, HE-Färbung.

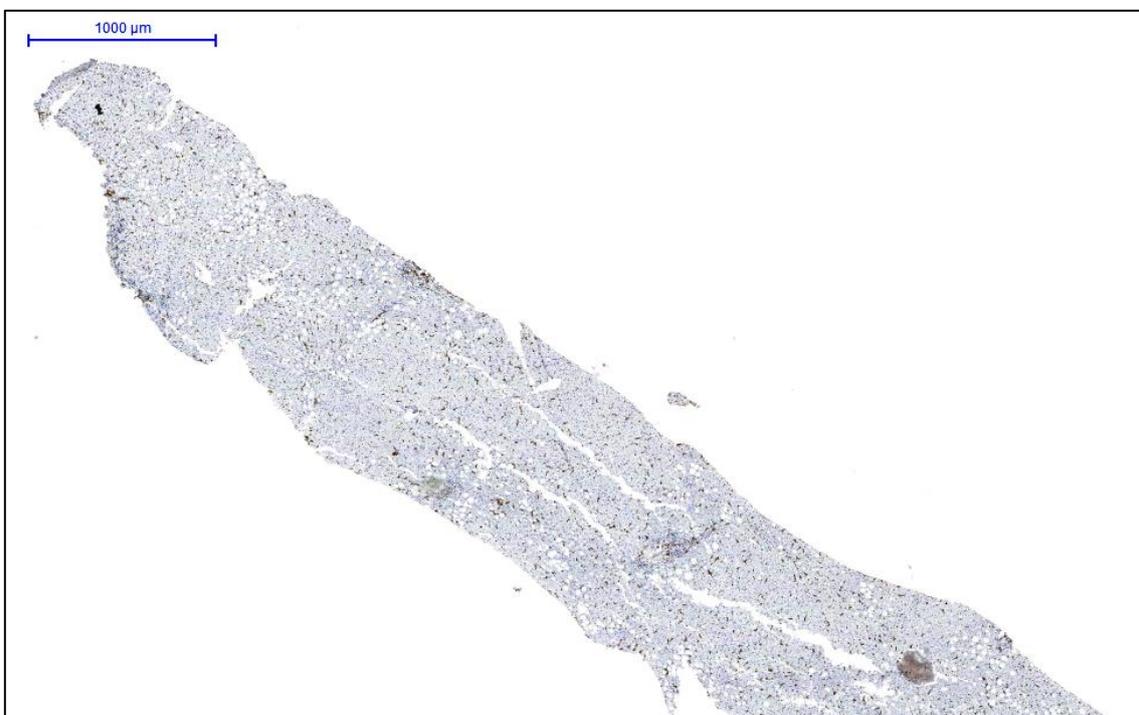


Abbildung 56 Patient K, CD68-Färbung.

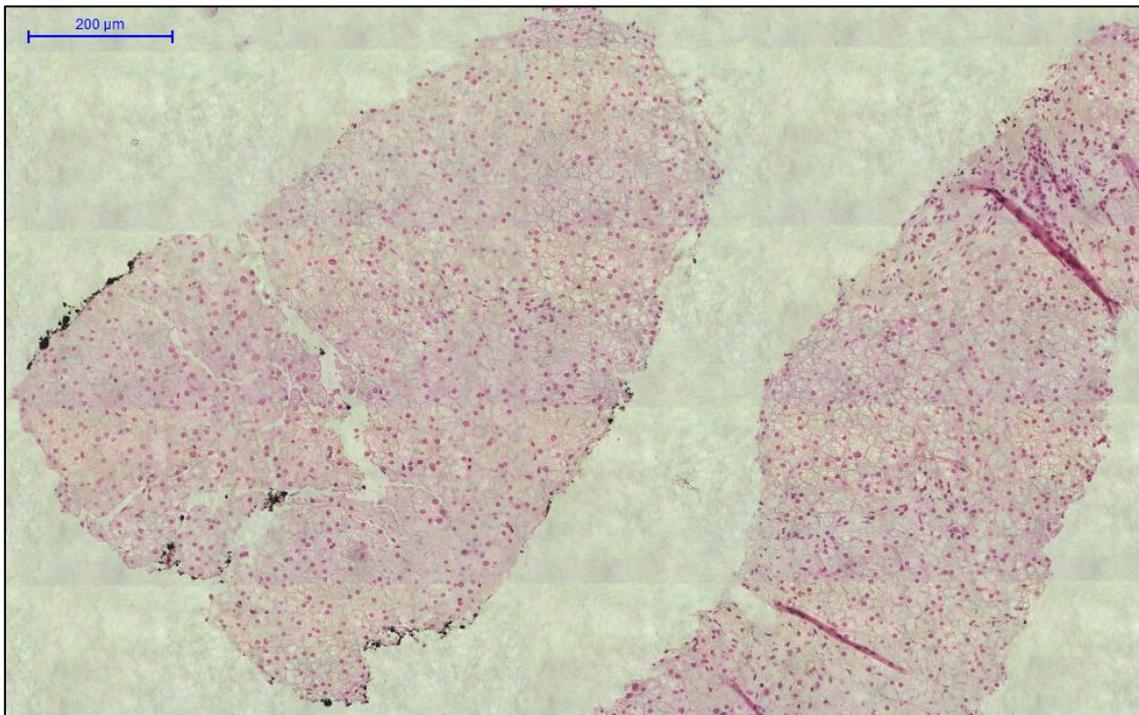


Abbildung 57 LAL-D-Patient 1, HE-Färbung.

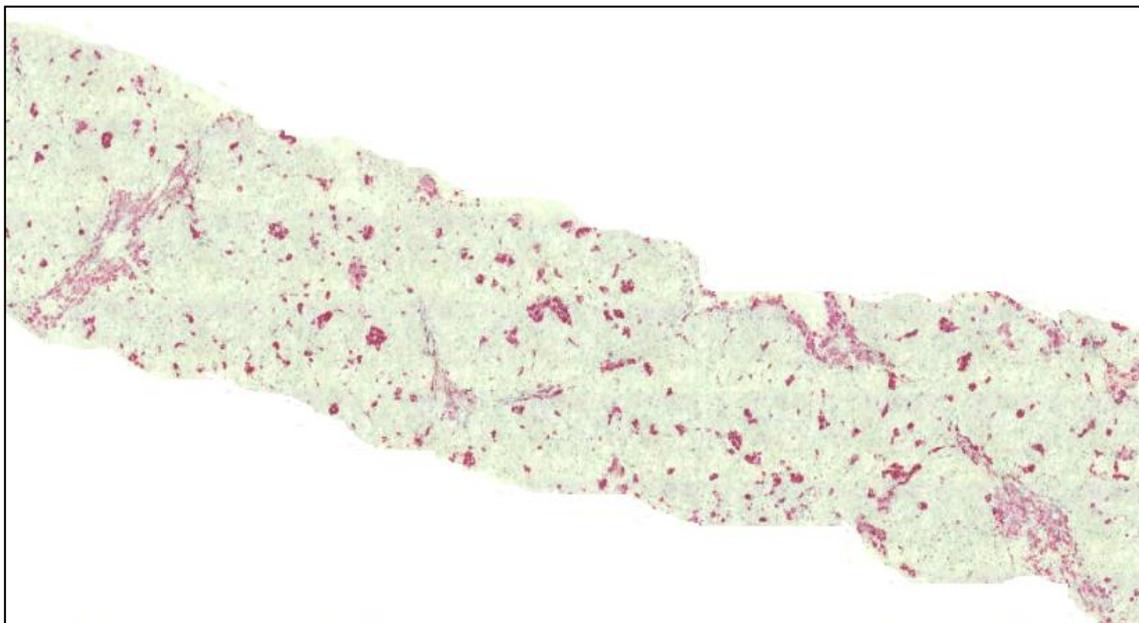


Abbildung 58 LAL-D-Patient 1, CD68-Färbung

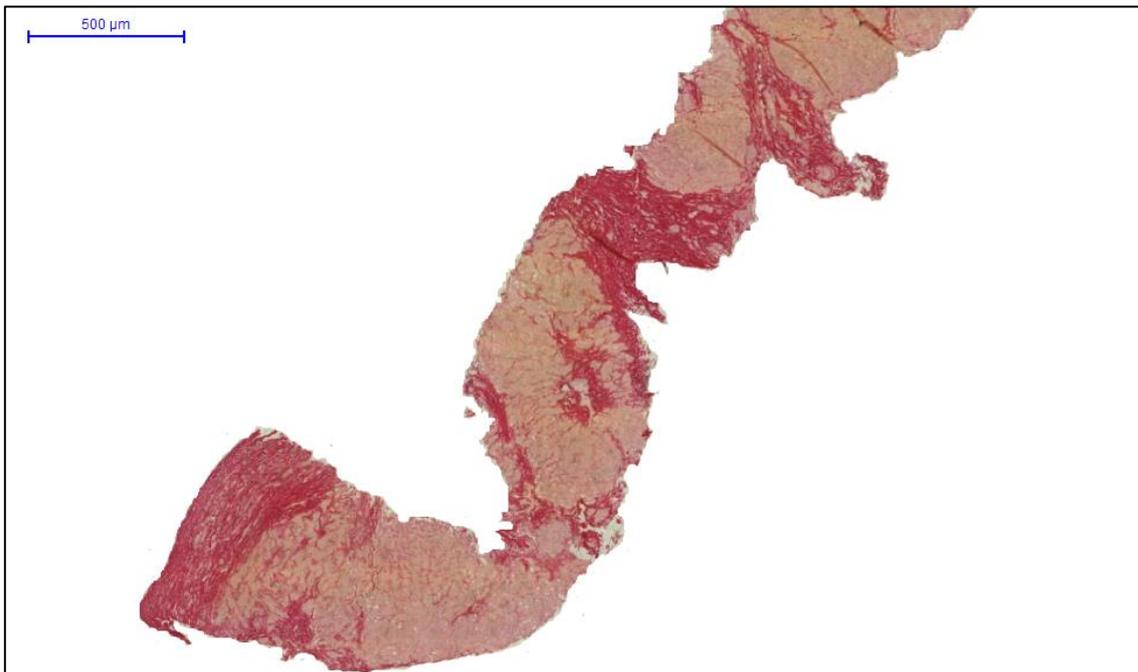


Abbildung 59 LAL-D-Patient 1, PAS-Färbung.

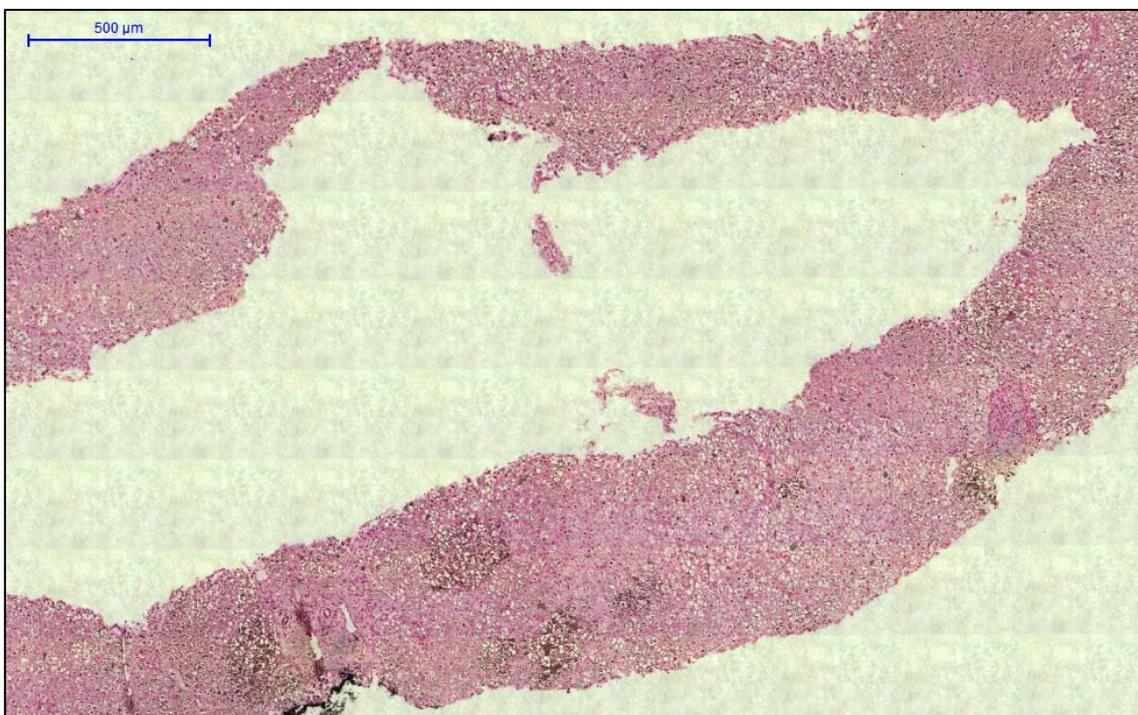


Abbildung 60 LAL-D-Patient 1, FE-Färbung.



Abbildung 61 LAL-D-Patient 2, Ret-Färbung.



Abbildung 62 LAL-D-Patient 2, CD68-Färbung.

5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach der Durchführung aller oben beschriebenen Studienschritte wurden zwei Patienten mit LAL-D identifiziert.

Sowohl Patient 1 als auch Patientin 2 zeigten in der mikroskopischen Untersuchung eine diffuse mikrovesikuläre Steatose und Schaumzellen in den Sinusoiden der Leber. Zusätzlich konnten bei beiden Patienten fibrotische Veränderungen des Leberparenchyms beobachtet werden.

Auch ihre klinische Darstellung entsprach weitgehend der typischen LAL-D-Präsentation.

Patient 1 war zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme zehn Jahre alt. Damit fällt er in das typische Diagnosealter, welches bei LAL-D-Patienten in den ersten 20 Lebensjahren liegt. Mit einem BMI von 20,1 kg/m² liegt Patient 1 im alterskorrigierten Normbereich. Typischerweise sind LAL-D-Patienten norm- oder untergewichtig. Die Laborparameterkonstellation des Patienten 1 sprach auch für eine LAL-D-Erkrankung. Der Patient hatte ein erhöhtes LDL-Cholesterin, ein erniedrigtes HDL-Cholesterin und erhöhte Gesamt-Cholesterin-, AST- und ALT-Werte. Lediglich die Gesamt-Triglyzeride waren normwertig und entsprachen nicht der charakteristischen Laborkonstellation bei LAL-D. Zusätzlich wurde bei Patient 1 eine Hepatomegalie in der MRT-Untersuchung festgestellt.

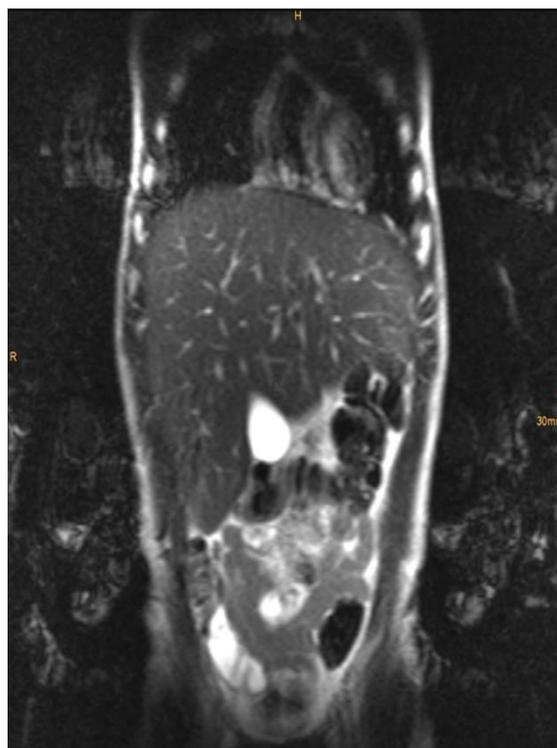


Abbildung 63 MRT-Aufnahme des Patienten 1 mit Hepatomegalie.

Patientin 2 war zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme 53 Jahre alt. Dies ist nicht kennzeichnend für eine LAL-D-Erkrankung, jedoch wird die Erkrankung bei Patienten oft in einem höheren Alter diagnostiziert, da sie bei einem milderem Krankheitsverlauf länger asymptomatisch bleiben oder die Diagnose aufgrund der unspezifischen Symptome lange nicht erkannt wird. Die Patientin hat einen Body-Mass-Index von 17,0 kg/m² und ist demnach untergewichtig. Dies spricht, wie oben bereits erwähnt, für das Vorliegen der Erkrankung. Ihre Laborparameter zeigten ein erhöhtes LDL- und Gesamt-Cholesterin, sowie erhöhte ALT- und AST- Werte. Das HDL-Cholesterin war erniedrigt und die Gesamt-Triglyzeride normwertig. Auch bei Patientin 2 sind die Laborparameter, bis auf die Gesamt-Triglyzeride, charakteristisch für die LAL-D.

6. Diskussion

Die Diskussion gliedert sich in vier Unterthemen. Zuerst wird auf die Schwierigkeiten, die bei der Bearbeitung der Studie aufkamen, eingegangen. Danach folgt die Erklärung zur Festlegung der Einschlusskriterien, um dem Leser den Hintergrundgedanken der Studie zu verdeutlichen. Als Hauptthema gilt die Erläuterung zur Prävalenz der Erkrankung. Hierbei wird das Ergebnis dieser Studie mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen. Abgeschlossen wird die Arbeit mit einer Überlegung zu einem geeigneten Screening- beziehungsweise Detektionsverfahren für Patienten mit einer LAL-D, um in Zukunft eine frühzeitige Diagnosestellung zu vereinfachen.

6.1 Herausforderungen der Studie

Die Durchführung der Studie war mit einigen Herausforderungen verbunden. LAL-D ist eine seltene und wenig bekannte Erkrankung. Deshalb gibt es in der Literatur nur wenige beschriebene Fallberichte.

Eine Studie mit einem vergleichbaren Studiendesign, in dem mit Hilfe einer retrospektiven Suche Patienten detektiert wurden, ist in der Literatur nicht verzeichnet. Eine große Studie, die über 135 Patienten mit einer LAL-D berichtet, ist die von Bernstein et al, welche im Jahr 2013 publiziert wurde. Dabei wurden jedoch die Patienten durch eine Literaturrecherche in PubMed herausgesucht und deren Symptome, Laborparameter und radiologischen Befunde zusammengefasst, um die charakteristischen Merkmale der Erkrankung darzustellen.

Aufgrund des Fehlens einer ähnlichen Studie, die die typischen histologischen und klinischen Merkmale der LAL-D nutzt, um retrospektiv anhand dieser Kriterien Erkrankte zu entdecken, ist es schwer, Vergleiche zu den bereits vorhandenen Studien zu ziehen.

Eine weitere Schwierigkeit zeigte sich bei der Ausführung der Studie selbst.

Im Schritt der Auswertung der klinischen Daten zeigte sich, dass bei einigen Patienten studienrelevante Daten nicht vorhanden waren. Dies gilt insbesondere für den Body-Mass-Index und die Laborparameter.

Der Body-Mass-Index konnte bei 110 Patienten nicht erhoben werden. Bei den Patienten unter 18 Jahren konnten bei zwölf Patienten keine Perzentilenangaben ermittelt werden. Da ein zu hoher BMI ($\geq 30,0 \text{ kg/m}^2$) und eine Gewichtsperzentile $> 97.$ Perzentile ein Ausschlusskriterium der Studie darstellt, konnten die 122 Patienten in dieser Hinsicht nicht evaluiert werden.

Auch die Laborwerte für die Blutlipide und Transaminasen konnten nicht bei allen Patienten ermittelt werden, da sie zum Zeitpunkt des stationären Aufenthaltes nicht bestimmt wurden. Eine Bestimmung des LDL-Cholesterins wurde lediglich bei 53 der 209 Patienten im klinischen Studienabschnitt durchgeführt. Das HDL-Cholesterin wurde bei 52 Patienten, das Gesamt-Cholesterin bei 91 Patienten und die Gesamt-Triglyzeride bei 94 Patienten erhoben. Die Transaminasen wurden am häufigsten bestimmt. Die ALT wurde bei 169 Patienten und die AST bei 168 Patienten erhoben. Auch die fehlenden Laborparameter erschwerten die Beurteilung für das Vorliegen der Erkrankung, da LAL-D-Patienten häufig ein typisches Laborbild aufweisen.

In beiden Fällen wurden bei den jeweiligen Patienten auf weitere Kriterien, wie zum Beispiel das Alter oder die radiologischen und histologischen Befunde, zurückgegriffen. Es wurde bei jedem Patienten individuell eine Entscheidung über den Verbleib in der Studie getroffen. So war es trotz fehlender BMI- oder Laborangaben möglich, Patienten in dem klinischen Studienabschnitt sicher aus der Studie auszuschließen. Im Falle eines Zweifels verblieb der jeweilige Patient für die weiteren Untersuchungsschritte in der Studie.

6.2 Einschlusskriterien

Die Einschlusskriterien dieser Studie wurden nach intensiver Literaturrecherche gefasst.

Zunächst wurden die histologischen Charakteristika von LAL-D-Patienten im Rahmen der Studie verwendet, da dies aufgrund der Krankheitspathologie ein Hauptmerkmal der Patienten ist. Wie Bernstein et al., Reiner et al., Burton et al. und Reynolds einstimmig berichten, ist das histologische Merkmal der LAL-D das Vorliegen einer diffusen Steatosis des Leberparenchyms.

In den meisten Fällen liegt eine mikrovesikuläre Steatose vor (Beaudet et al., 1977; Bernstein et al., 2013; Boldrini et al., 2004; Burton et al., 2015b; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Valayannopoulos et al., 2017). Es sind jedoch auch Patientenberichte bekannt, bei denen eine gemischtvesikuläre Steatose vorlag (Chatrath et al., 2009; D'Agostino et al., 1988; Freudenberg et al., 2013; Valayannopoulos et al., 2017). Deshalb wurden im zweiten Studienschnitt Patienten mit mikro- und makrovesikulärer Steatose herausgefiltert. Ein weiteres histologisches Kriterium sind die schaumzelligen Kupfer-Zellen (Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; D'Agostino et al., 1988; Elleder et al., 1990; Freudenberg et al., 2013; Hůlková and Elleder, 2012; Nchimi et al., 2003; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Su et al., 2016; Valayannopoulos et al., 2017). Zusätzlich zu diesen Kriterien liegen bei den Erkrankten häufig zirrhotisch veränderte Leberparenchymanteile vor (Bernstein et al., 2013; Chatrath et al., 2009; D'Agostino et al., 1988; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Su et al., 2016; Valayannopoulos et al., 2017). Im Mikroskopieschritt dieser Studie wurden die beschriebenen histologischen Veränderungen als Kriterien für die Beurteilung der Patienten verwendet, um so das Vorliegen einer LAL-D auszuschließen beziehungsweise zu erkennen.

Im darauffolgenden klinischen Studienabschnitt wurden verschiedene Einschlusskriterien herangezogen. Zunächst sortierte man die Patienten aufgrund ihrer Laborparameter hinsichtlich der Blutlipide und Serumtransaminasen. Patienten mit einer LAL-D zeigen ein typisch verändertes Laborbild. Das Gesamt-Cholesterin, die Gesamt-Triglyzeride und das LDL-Cholesterin sind erhöht. Dagegen ist das HDL-Cholesterin erniedrigt (Quinn et al., 2014; Reiner et al., 2014; D'Agostino et al., 1988; Bernstein et al., 2013; Milan Elleder et al., 2000). Die Serumtransaminasen ALT und AST sind als Marker einer Leberparenchymschädigung häufig schon früh in der Erkrankung erhöht (Beaudet et al., 1977; Bernstein et al., 2013; Cummings and Watts, 1995; D'Agostino et al., 1988; Fouchier and Defesche, 2013; Freudenberg et al., 2013; Gokce, 2016; Pullinger et al., 2015; Quinn et al., 2014; Reiner et al., 2014, 2014; Reynolds, 2013). Nach diesen Kriterien wurden die Patienten in der Studie kategorisiert. Wie Bernstein et al. beschreibt, sind nicht bei jedem LAL-D-Patienten alle genannten Laborparameter verändert (Bernstein et al., 2013). Deshalb wurden die Studienteilnehmer nicht allein aufgrund fehlender einzelner Laborparameterveränderungen aus der Studie ausgeschlossen.

Vielmehr wurde bei den Patienten des klinischen Studienabschnittes nach Betrachtung aller klinischen Angaben evaluiert, ob ihre Veränderungen für das Vorliegen einer LAL-D sprechen. Dabei waren die Laborparameter ein Hinweis und Patienten mit vollkommen unauffälligen Laborwerten konnten ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Evaluationskriterium ist der Body-Mass-Index und die Gewichtsperzentilenkurven der Patienten. In die Studie wurden nur Patienten mit einem BMI ≤ 30 kg/m² beziehungsweise einer Gewichtsperzentile ≤ 97 eingeschlossen. Bei adipösen Patienten liegt eine Leberverfettung aufgrund ihres Übergewichtes vor. Diese ist zumeist eine grobtropfige Verfettung (Decarlis et al., 2009; Reiner et al., 2014). Viele Patienten mit einer LAL-D zeichnen sich im Gegensatz dazu durch ein vermindertes Wachstum und ein reduziertes Gewicht aus (Bernstein et al., 2013; Harrison, 2016; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013). Deshalb konnte man den BMI als ein Ausschlusskriterium für die Studie heranziehen und anhand dessen die Patientenpopulation selektieren (Reiner et al., 2014).

Zusätzlich zu den bisher genannten Kriterien dient das Patientenalter als ein Weiteres. Es sind keine Fallberichte dokumentiert, welches Patienten in einem Alter von über 70 Jahren beschreibt (Bernstein et al., 2013). Die älteste dokumentierte Patientin war 68 Jahre (Pisciotta et al., 2009) und der älteste männliche Patient war bei Diagnosestellung 44 Jahre alt (Gasche et al., 1997). Deshalb wurden nur Patienten unter 70 Jahren in die Studie aufgenommen. Sechs der 209 Patienten wurden entsprechend dieser Vorgabe aus der Studie ausgeschlossen.

Im letzten Studienschritt erfolgte die CD68-Färbung der Präparate der verbliebenen zwölf Patienten. LAL-D-Patienten weisen bei einer CD68-Färbung ein typisches histologisches Bild auf. Bei Vorliegen der Erkrankung zeigen sich große Gruppen von vergrößerten und schaumzelligen Makrophagen in den Portalfeldern (Chatrath et al., 2009; Valayannopoulos et al., 2017). Die zwölf Patienten wurden im letzten Mikroskopieschritt auf diese histologische Veränderung untersucht. Zwei dieser Patienten zeigten das typische histologische Bild einer lysosomalen sauren Lipase Defizienz.

6.3 Prävalenz

Die genaue Prävalenz der lysosomalen sauren Lipase Defizienz ist unbekannt (Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Freudenberg et al., 2013; Muntoni et al., 2007; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Zhang and Porto, 2013). Viele Patienten dieser Erkrankung werden aufgrund der unspezifischen Symptome fehldiagnostiziert oder nicht diagnostiziert (Burton et al., 2015b; Milan Elleder et al., 2000; Freudenberg et al., 2013; Reynolds, 2013). Mithilfe der Kenntnis über die Mutationsprävalenzen kann man eine ungefähre Prävalenz der Erkrankung mit der Hardy-Weinberg-Gleichung berechnen (Bernstein et al., 2013; Muntoni et al., 2007; Reiner et al., 2014): Der aktuellen Studienlage nach haben ungefähr 50 % bis 60 % der CESD-Patienten eine E8SJM-Mutation im LIPA-Gen (Bernstein et al., 2013). In einem Populationsscreening, das im Rahmen einer Studie von Muntoni et al. durchgeführt wurde, wurde unter gesunden Westdeutschen eine Heterozygotenfrequenz der E8SJM-Mutation von eins in 200 Personen festgestellt (Muntoni et al., 2007). Ausgehend von der Tatsache, dass diese Mutation bei 50 % der Patienten vorliegt, ist die Heterozygotenfrequenz für alle LIPA-Genmutationen eins in circa 100. Unter Verwendung der Hardy-Weinberg-Gleichung kann man dementsprechend eine ungefähre Prävalenz von eins von 40.000 Neugeborenen berechnen (Bernstein et al., 2013; Reynolds, 2013). Damit ergibt sich rechnerisch eine Prävalenz von 366 Patienten unter 18 Jahren in Deutschland. (Muntoni et al., 2007).

Diese Berechnung der Prävalenz galt für die untersuchte Kohortengruppe von Mitteleuropäern. Es zeigte sich jedoch, dass sich die Häufigkeit der LIPA-Genmutationen unter ethnischen Gruppen unterscheidet. Eine Studie im Raum Los Angeles ergab, dass in der dortigen iranisch-jüdischen Bevölkerung ungefähr eins von 4.200 lebendgeborenen Säuglingen mit der Wolman-Krankheit zur Welt kommen (Bernstein et al., 2013; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013). Eine andere Untersuchung ergab eine Prävalenz von unter eins in 700.000 Neugeborenen in Australien (Meikle et al., 1999). In der afrikanischen und asiatischen Bevölkerung gibt es nur vereinzelte Fälle eines LAL-Mangels, sodass es keine validen Angaben oder Berechnungen für eine Prävalenz gibt (Bernstein et al., 2013).

Die Berechnung der Prävalenz widerspricht deutlich den bekannten publizierten Patientenfällen (Bernstein et al., 2013; Muntoni et al., 2007; Reynolds, 2013). Das bedeutet, dass es viele nicht diagnostizierte Patienten gibt.

Aus diesem Grund bedarf es einem geschärften Bewusstsein gegenüber der Erkrankung, um betroffene Patienten frühzeitig diagnostizieren zu können.

Ziel dieser Studie ist es, eine Prävalenz der LAL-D-Patienten in Freiburg in einem Zeitraum von 2006 bis 2016 anzugeben. Bei einer Gesamtstudienteilnehmerzahl von 3094 Probanden wurden zwei LAL-D-Patienten detektiert. Dies sind 0,065 % der Gesamtzahl. Andere Studien geben die Prävalenz mit 25 in 1.000.000 Patienten an (Bernstein et al., 2013; Muntoni et al., 2007; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013).

Man erkennt einen deutlichen Unterschied in den genannten Prävalenzangaben. Besonders wichtig zu beachten ist jedoch, dass in der vorliegenden Studie, LAL-D-Patienten in einer Gesamtpopulation gesucht wurden, in welcher alle Patienten eine Lebererkrankung vorweisen. Mit dem Suchbegriff „Leber“ in der klinikinternen Datenbank PathoPro wurde eine Gruppe von Patienten mit Lebererkrankungen generiert. Im Populationsscreening von Muntoni et al. wurde hingegen eine gesunde Gesamtpopulation untersucht. Es ist offensichtlich, dass in einer solchen Population eine geringere Wahrscheinlichkeit für das Auffinden von LAL-D-Patienten vorliegt. In einer Kohorte mit verschiedenen Lebererkrankungen ist das Auftreten einer LAL-D, welche mit einer Leberveränderung einhergeht, wahrscheinlicher. Dies erklärt die deutlich höhere Prävalenz in der Studiengruppe. Die aus der Studie resultierende Prävalenz ist für eine allgemeine Prävalenzaussage deshalb nur bedingt aussagekräftig.

Zusätzlich ist die Gesamtpopulation mit 3094 Patienten in einem Zeitraum von zehn Jahren für eine Prävalenzbestimmung zu klein. Im Rahmen des Populationsscreening von Muntoni et al. wurden 1152 Studienteilnehmer innerhalb eines Jahres untersucht. Aufgrund der kleinen Studienpopulation kann keine valide Allgemeinaussage bezüglich der Prävalenz gemacht werden.

Die Ergebnisse dieser Studie unterscheiden sich von den Ergebnissen bisheriger Studien. Durch die kleine und selektierte Studienkohorte lässt sich dieser Unterschied plausibel erklären. Nichtsdestotrotz zeigen die Studienergebnisse einen Widerspruch zwischen berechneter Prävalenz und tatsächlich dokumentierten Fällen.

6.4 Optimierung der Diagnosestellung

Die Problematik der Prävalenzangabe ist einer anzunehmenden Dunkelziffer von LAL-D Erkrankungen geschuldet. Das verdeutlicht das unzureichende Bewusstsein der Erkrankung gegenüber und die damit einhergehende Schwierigkeit der Diagnosestellung (Reiner et al., 2014). Häufig werden Patienten mit den Symptomen einer lysosomalen sauren Lipase Defizienz aufgrund dem häufigeren Vorkommen der gängigen Differentialdiagnosen fehldiagnostiziert (Bernstein et al., 2013; Burton et al., 2015b; Milan Elleder et al., 2000; Freudenberg et al., 2013; Reiner et al., 2014). Es ist wichtig, das Bewusstsein für diese Erkrankung zu schärfen, damit im seltenen Fall eines Vorliegens der Erkrankung diese erkannt wird und eine passende Therapie eingeleitet werden kann (Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Su et al., 2016). Da das Patientenalter sehr variabel ist und sowohl Kinder als auch Erwachsene betroffen sind, müssen nicht nur Pädiater, sondern auch Allgemeinmediziner, Hausärzte, Endokrinologen, Radiologen und Pathologen für die Erkrankung sensibilisiert werden. Das ist von besonderer Wichtigkeit, da mit der Sebelipase alfa ein Medikament zur Verfügung steht, welches die Erkrankung kausal therapiert und in den bisherigen Studien ein sehr positives Ergebnis zeigte (Burton et al., 2015a; Paton, 2016; Poznansky et al., 1989; Su et al., 2016).

Eine Möglichkeit zur Erleichterung der Diagnosestellung wird im Artikel von Reiner et al. präsentiert (Reiner et al., 2014). Er zeigt eine Abfolge von Screeningkriterien, anhand derer man Patienten im Hinblick auf die Erkrankung evaluieren kann. Dabei werden die Patienten auf die krankheitstypischen Lipidveränderungen im Blut zu Beginn der Diagnosestellung untersucht. Bei Vorliegen einer Erhöhung des LDL-Cholesterins folgt eine genetische Analyse. Dabei wird auf die Familienanamnese eingegangen. Falls diese keinen Hinweis auf die Differentialdiagnosen HeFH oder FCH, welche im Gegensatz zur lysosomalen sauren Lipase Defizienz autosomal dominant vererbt werden, gibt, wird der Patient im nächsten Schritt des Screenings auf folgende fünf Gesichtspunkte untersucht: eine mindestens 1,5-fache Erhöhung der Serumtransaminase ALT, das Vorliegen einer Hepatomegalie, ein HDL-Cholesterin unter 50 mg/dl, ein BMI $\leq 30,0$ kg/ m² und eine mikrovesikuläre Steatose in der Leberbiopsie. Falls drei oder mehr dieser Kriterien erfüllt sind, wird anschließend eine Enzymaktivitätsmessung in Trockenblut durchgeführt.

Diese ergibt bei Vorliegen einer LAL-D schließlich eine verminderte LAL-Enzymaktivität, womit die Erkrankung diagnostiziert ist. Falls eine grenzwertige Enzymaktivität gemessen wird, kann zur sicheren Abklärung eine Gensequenzierung erfolgen (Reiner et al., 2014).

Dieses Screeningverfahren beachtet die typischen Veränderungen, die im Rahmen einer LAL-Erkrankung auftreten und ist somit ein sehr geeignetes Diagnoseverfahren. Eine Problematik kann jedoch die Zeitintensität dieses Screenings sein. Um eine genaue Diagnose zu ermöglichen, ist darüber hinaus eine Leberbiopsie zur histologischen Bewertung notwendig. Die Leberbiopsie ist ein invasiver Therapieschritt und besonders bei Neugeborenen und Kleinkindern zu vermeiden. Deshalb wird die Leberbiopsie von der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zur Diagnosestellung der LAL-D nicht empfohlen (Valayannopoulos et al., 2017). Es kann jedoch zur Beurteilung der Krankheitsprogression herangezogen werden.

Zur Diagnose der LAL-D wird die LAL-Enzymaktivitätsmessung in Trockenblut empfohlen (Hamilton et al., 2012; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Su et al., 2016; Valayannopoulos et al., 2017). Die Trockenblutmessung ist minimal invasiv und somit gerade bei Kindern gut geeignet. Aufgrund der Effizienz dieser Methode wird sie für zahlreiche Screeningprogramme genutzt (Reynolds, 2013). Deshalb wird diskutiert, ob man die Messung in das Neugeborenen-Screening für Stoffwechsel- und Hormonerkrankungen, welches in der Regel am dritten Lebenstag durchgeführt wird, aufnehmen sollte, um Säuglinge mit einem angeborenen LAL-Mangel zu detektieren und frühzeitig behandeln zu können (Hamilton et al., 2012; Reiner et al., 2014; Reynolds, 2013; Valayannopoulos et al., 2017).

7. Zusammenfassung

Die lysosomale saure Lipase Defizienz ist eine seltene angeborene lysosomale Speichererkrankung. Aufgrund der Seltenheit ist sie nur wenig bekannt. Patienten mit einem LAL-Mangel zeigen ähnliche Symptome wie Betroffene anderer Erkrankungen, die weitaus häufiger auftreten. Folglich werden viele Erkrankte falsch oder gar nicht diagnostiziert und erhalten eine inadäquate Therapie. Das führt zu einer Progression der Erkrankung und dadurch zu einem vorzeitigen Versterben der Patienten. Es ist wichtig, dass Ärzte auf diese Erkrankung aufmerksam gemacht werden, um die richtige Therapie einzuleiten. Dies ist eines der Ziele der vorliegenden Arbeit. Mit der Sebelipase alpha, einem medikamentösen Enzymersatz, kann die Erkrankung effektiv therapiert werden. Das Medikament ist erst seit wenigen Jahren zugelassen, jedoch zeigen die bisherigen Studien ein sehr gutes Ergebnis. Ziel dieser Studie war die Detektion von LAL-D-Patienten im Raum Freiburg vom Jahr 2006 bis 2016. Dafür wurde mithilfe der klinikinternen Datenbank PathoPro eine Studienpopulation von 3094 Patienten generiert, welche alle eine Leberbiopsie aufgrund einer Lebererkrankung erfuhren. Für das Screening der Studienkohorte wurden typische LAL-D-Veränderungen als Einschlusskriterien gewählt. Diese schließen die typischen histologischen Merkmale, die charakteristischen Veränderungen der Laborparameter und das klinische Erscheinungsbild einer LAL-D ein. Nach mehreren Selektionsschritten konnte bei zwei Patienten eine lysosomale saure Lipase Defizienz diagnostiziert werden. Das entspricht 0,0646 %. Demnach liegt die Prävalenz in dieser Studie bei 646 von 1.000.000 Patienten. Das Ergebnis dieser Studie unterscheidet sich von den Prävalenzangaben ähnlicher Studien. Hauptgrund hierfür ist wahrscheinlich die unterschiedliche Populationskonstellation. Vergleichbare Studien ermittelten die LAL-D-Prävalenz in verschiedenen gesunden Bevölkerungsgruppen, wohingegen das Patientenkollektiv dieser Studie durch das Vorliegen einer Lebererkrankung charakterisiert war. Dennoch stimmt die Studie in der Aussage einer hohen Dunkelziffer der Erkrankten mit den anderen Studien überein. Somit wird die Notwendigkeit eines verschärften Screenings für die Erkrankung gesehen. Die Testung auf die LAL-D im Rahmen des Neugeborenen-Screenings erscheint hierfür am geeignetsten, da somit Neugeborene mit einem geringen Aufwand und minimal-invasiv diagnostiziert werden können. Im Falle einer LAL-D würde dadurch die geeignete Therapie schnell eingeleitet werden können.

8. Referenzen

- Abramov, A., Schorr, S., Wolman, M., 1956. Generalized xanthomatosis with calcified adrenals. *AMA J. Dis. Child.* 91, 282–286.
- A-Kader, H.H., 2017. Lysosomal acid lipase deficiency: a form of non-obese fatty liver disease (NOFLD). *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 911–924. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343144>
- Ambler, G.K., Hoare, M., Brais, R., Shaw, A., Butler, A., Flynn, P., Deegan, P., Griffiths, W.J.H., 2013. Orthotopic liver transplantation in an adult with cholesterol ester storage disease. *JIMD Rep.* 8, 41–46. https://doi.org/10.1007/8904_2012_155
- Ameis, D., Brockmann, G., Knoblich, R., Merkel, M., Ostlund, R.E., Yang, J.W., Coates, P.M., Cortner, J.A., Feinman, S.V., Greten, H., 1995. A 5' splice-region mutation and a dinucleotide deletion in the lysosomal acid lipase gene in two patients with cholesteryl ester storage disease. *J. Lipid Res.* 36, 241–250.
- Anderson, R.A., Rao, N., Byrum, R.S., Rothschild, C.B., Bowden, D.W., Hayworth, R., Pettenati, M., 1993. In Situ Localization of the Genetic Locus Encoding the Lysosomal Acid Lipase/Cholesteryl Esterase (LIPA) Deficient in Wolman Disease to Chromosome 10q23.2-q23.3. *Genomics* 15, 245–247. <https://doi.org/10.1006/geno.1993.1052>
- Aqul, A., Lopez, A.M., Posey, K.S., Taylor, A.M., Repa, J.J., Burns, D.K., Turley, S.D., 2014. Hepatic entrapment of esterified cholesterol drives continual expansion of whole body sterol pool in lysosomal acid lipase-deficient mice. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 307, G836–G847. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00243.2014>
- Aslanidis, C., Ries, S., Fehringer, P., Büchler, C., Klima, H., Schmitz, G., 1996. Genetic and Biochemical Evidence That CESD and Wolman Disease Are Distinguished by Residual Lysosomal Acid Lipase Activity. *Genomics* 33, 85–93. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0162>
- Baratta, F., Pastori, D., Polimeni, L., Tozzi, G., Violi, F., Angelico, F., Del Ben, M., 2015. Does Lysosomal Acid Lipase Reduction Play a Role in Adult Non-Alcoholic Fatty Liver Disease? *Int. J. Mol. Sci.* 16, 28014–28021. <https://doi.org/10.3390/ijms161226085>
- Beaudet, A.L., Ferry, G.D., Nichols, B.L., Rosenberg, H.S., 1977. Cholesterol ester storage disease: Clinical, biochemical, and pathological studies. *J. Pediatr.* 90, 910–914. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(77\)80557-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(77)80557-X)
- Ben-Haroush, A., Yogev, Y., Levit, O., Hod, M., Kaplan, B., 2003. Isolated fetal ascites caused by Wolman disease. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 21, 297–298. <https://doi.org/10.1002/uog.73>
- Bernstein, D.L., Hülkova, H., Bialer, M.G., Desnick, R.J., 2013. Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. *J. Hepatol.* 58, 1230–1243. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.014>
- Boldrini, R., Devito, R., Biselli, R., Filocamo, M., Bosman, C., 2004. Wolman disease and cholesteryl ester storage disease diagnosed by histological and ultrastructural examination of intestinal and liver biopsy. *Pathol. - Res. Pract.* 200, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2003.11.001>

- Burton, B.K., Balwani, M., Feillet, F., Barić, I., Burrow, T.A., Camarena Grande, C., Coker, M., Consuelo-Sánchez, A., Deegan, P., Di Rocco, M., Enns, G.M., Erbe, R., Ezgu, F., Ficicioglu, C., Furuya, K.N., Kane, J., Laukaitis, C., Mengel, E., Neilan, E.G., Nightingale, S., Peters, H., Scarpa, M., Schwab, K.O., Smolka, V., Valayannopoulos, V., Wood, M., Goodman, Z., Yang, Y., Eckert, S., Rojas-Caro, S., Quinn, A.G., 2015a. A Phase 3 Trial of Sebelipase Alfa in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 373, 1010–1020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501365>
- Burton, B.K., Deegan, P.B., Enns, G.M., Guardamagna, O., Horslen, S., Hovingh, G.K., Lobritto, S.J., Malinova, V., McLin, V.A., Raiman, J., Di Rocco, M., Santra, S., Sharma, R., Sykut-Cegielska, J., Whitley, C.B., Eckert, S., Valayannopoulos, V., Quinn, A.G., 2015b. Clinical Features of Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 61, 619–625. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000935>
- Burton, B.K., Silliman, N., Marulkar, S., 2017. Progression of liver disease in children and adults with lysosomal acid lipase deficiency. *Curr. Med. Res. Opin.* 33, 1211–1214. <https://doi.org/10.1080/03007995.2017.1309371>
- Castro, M., Rosati, P., Boldrini, R., Lucidi, V., Gambarara, M., Bosman, C., 1999. Wolman's disease diagnosed by intestinal biopsy. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.* 31, 610–612.
- Chatrath, H., Keilin, S., Attar, B.M., 2009. Cholesterol Ester Storage Disease (CESD) Diagnosed in an Asymptomatic Adult. *Dig. Dis. Sci.* 54, 168–173. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0310-2>
- Chora, J.R., Alves, A.C., Medeiros, A.M., Mariano, C., Lobarinhas, G., Guerra, A., Mansilha, H., Cortez-Pinto, H., Bourbon, M., 2017. Lysosomal acid lipase deficiency: A hidden disease among cohorts of familial hypercholesterolemia? *J. Clin. Lipidol.* 11, 477–484.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.11.002>
- Cummings, M.H., Watts, G.F., 1995. Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in cholesteryl ester storage disease. *Clin. Chem.* 41, 111–114.
- D'Agostino, D., Bay, L., Gallo, G., Chamoles, N., 1988. Cholesterol ester storage disease: clinical, biochemical, and pathological studies of four new cases. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7, 446–450.
- Dairaku, T., Iwamoto, T., Nishimura, M., Endo, M., Ohashi, T., Eto, Y., 2014. A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease. *Mol. Genet. Metab.* 111, 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.11.003>
- Decarlis, S., Agostoni, C., Ferrante, F., Scarlino, S., Riva, E., Giovannini, M., 2009. Combined hyperlipidaemia as a presenting sign of cholesteryl ester storage disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 32, 11–13. <https://doi.org/10.1007/s10545-008-1027-2>
- Desai, N.K., Md, D.P.W., 2000. Lysosomal Acid Lipase Deficiency, in: De Groot, L.J., Chrousos, G., Dungan, K., Feingold, K.R., Grossman, A., Hershman, J.M., Koch, C., Korbonits, M., McLachlan, R., New, M., Purnell, J., Rebar, R., Singer, F., Vinik, A. (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Desai, P.K., Astrin, K.H., Thung, S.N., Gordon, R.E., Short, M.P., Coates, P.M., Desnick, R.J., Reynolds, J.F., 1987. Cholesteryl ester storage disease: Pathologic changes in an affected fetus. *Am. J. Med. Genet.* 26, 689–698. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320260324>

- Di Bisceglie, A.M., Ishak, K.G., Rabin, L., Hoeg, J.M., 1990. Cholesteryl ester storage disease: hepatopathology and effects of therapy with lovastatin. *Hepatology*. Baltimore, Md 11, 764–772.
- Du, H., Cameron, T.L., Garger, S.J., Pogue, G.P., Hamm, L.A., White, E., Hanley, K.M., Grabowski, G.A., 2008. Wolman disease/cholesteryl ester storage disease: efficacy of plant-produced human lysosomal acid lipase in mice. *J. Lipid Res.* 49, 1646–1657. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700482-JLR200>
- Elleder, Milan, Chlumská, A., Hyánek, J., Poupětová, H., Ledvinová, J., Maas, S., Lohse, P., 2000. Subclinical course of cholesteryl ester storage disease in an adult with hypercholesterolemia, accelerated atherosclerosis, and liver cancer. *J. Hepatology*. 32, 528–534. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80407-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80407-9)
- Elleder, M., Chlumská, A., Ledvinová, J., Poupětová, H., 2000. Testis - a novel storage site in human cholesteryl ester storage disease. Autopsy report of an adult case with a long-standing subclinical course complicated by accelerated atherosclerosis and liver carcinoma. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 436, 82–87.
- Elleder, M., Ledvinová, J., Cieslar, P., Kuhn, R., 1990. Subclinical course of cholesterol ester storage disease (CESD) diagnosed in adulthood. *Virchows Arch. A* 416, 357–365. <https://doi.org/10.1007/BF01605297>
- Erwin, A.L., 2017. The role of sebelipase alfa in the treatment of lysosomal acid lipase deficiency. - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28804516> (accessed 11.9.17).
- Fasano, T., Pisciotta, L., Bocchi, L., Guardamagna, O., Assandro, P., Rabacchi, C., Zanoni, P., Filocamo, M., Bertolini, S., Calandra, S., 2012. Lysosomal lipase deficiency: Molecular characterization of eleven patients with Wolman or cholesteryl ester storage disease. *Mol. Genet. Metab., Program and Abstracts for the 2012 Meeting of the Society for Inherited Metabolic Disorders Society for Inherited Metabolic Disorders* 105, 450–456. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.12.008>
- Ferry, G.D., Whisnand, H.H., Finegold, M.J., Alpert, E., Glombicki, A., 1991. Liver transplantation for cholesteryl ester storage disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 12, 376–378.
- Fouchier, S.W., Defesche, J.C., 2013. Lysosomal acid lipase A and the hypercholesterolaemic phenotype. *Curr. Opin. Lipidol.* 24, 332–338. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328361f6c6>
- Frampton, J.E., 2016. Sebelipase Alfa: A Review in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *Am. J. Cardiovasc. Drugs Drugs Devices Interv.* 16, 461–468. <https://doi.org/10.1007/s40256-016-0203-2>
- Fredrickson, D.S., 1963. Newly Recognized Disorders of Cholesterol Metabolism. *Ann. Intern. Med.* 58, 718. https://doi.org/10.7326/0003-4819-58-4-718_1
- Freudenberg, F., Bufler, P., Ensenaer, R., Lohse, P., Koletzko, S., 2013. Cholesteryl ester storage disease: an easily missed diagnosis in oligosymptomatic children. *Z. Für Gastroenterol.* 51, 1184–1187. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1350463>
- Fulcher, A.S., Das Narla, L., Hingsbergen, E.A., 1998. Pediatric case of the day. Wolman disease (primary familial xanthomatosis with involvement and calcification of the adrenal glands). *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc* 18, 533–535. <https://doi.org/10.1148/radiographics.18.2.9536498>

- Gasche, C., Aslanidis, C., Kain, R., Exner, M., Helbich, T., Dejaco, C., Schmitz, G., Ferenci, P., 1997. A novel variant of lysosomal acid lipase in cholesteryl ester storage disease associated with mild phenotype and improvement on lovastatin. *J. Hepatol.* 27, 744–750. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(97\)80092-X](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(97)80092-X)
- Gautier, M., Lalous, D., Raulin, J., 1978. [Cholesterol ester storage disease in children. Comparative biochemistry of hepatocyte and fibroblast cultures]. *Arch. Fr. Pediatr.* 35, 38–49.
- Gokce, S., 2016. The Key Clinical Manifestations of Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 63, e39. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001255>
- Goldstein, J.L., Dana, S.E., Faust, J.R., Beudet, A.L., Brown, M.S., 1975. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J. Biol. Chem.* 250, 8487–8495.
- Grabowski, G., 2013. Therapy for lysosomal acid lipase deficiency: Replacing a missing link. *Hepatology* 58, 850–852. <https://doi.org/10.1002/hep.26366>
- Gramatges, M.M., Dvorak, C.C., Regula, D.P., Enns, G.M., Weinberg, K., Agarwal, R., 2009. Pathological evidence of Wolman’s disease following hematopoietic stem cell transplantation despite correction of lysosomal acid lipase activity. *Bone Marrow Transplant.* 44, 449–450. <https://doi.org/10.1038/bmt.2009.57>
- Hamilton, J., Jones, I., Srivastava, R., Galloway, P., 2012. A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2. *Clin. Chim. Acta* 413, 1207–1210. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.03.019>
- Harrison, S.A., 2016. Management of Lysosomal Acid Lipase Deficiency for the Gastroenterologist and Hepatologist. *Gastroenterol. Hepatol.* 12, 331–333.
- Himes, R.W., Barlow, S.E., Bove, K., Quintanilla, N.M., Sheridan, R., Kohli, R., 2016. Lysosomal Acid Lipase Deficiency Unmasked in Two Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Pediatrics* 138, e20160214. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-0214>
- Hoeg, J.M., Demosky, S.J., Pescovitz, O.H., Brewer, H.B., 1984. Cholesteryl ester storage disease and Wolman disease: phenotypic variants of lysosomal acid cholesteryl ester hydrolase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 36, 1190–1203.
- Hoffman, E.P., Barr, M.L., Giovanni, M.A., Murray, M.F., 1993. Lysosomal Acid Lipase Deficiency, in: Pagon, R.A., Adam, M.P., Ardinger, H.H., Wallace, S.E., Amemiya, A., Bean, L.J., Bird, T.D., Ledbetter, N., Mefford, H.C., Smith, R.J., Stephens, K. (Eds.), *GeneReviews*(®). University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- Hůlková, H., Elleder, M., 2012. Distinctive histopathological features that support a diagnosis of cholesterol ester storage disease in liver biopsy specimens: Acid lipase deficiency in liver biopsies. *Histopathology* 60, 1107–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04164.x>
- Jones, S.A., Bernstein, D., Bialer, M., Dhawan, A., Hendriksz, C., Whitley, C.B., Banikazemi, M., Chan, A., Guardamagna, O., Raiman, J., Gamal, I., Selim, L., Cederbaum, S., Di Rocco, M., Domm, J., Enns, G., Finegold, D., Gargus, J., Zaki, O., Eckert, S., Schneider, E., Quinn, A.G., Valayannopoulos, V., 2014. Severe and rapid disease course in the natural history of infants with lysosomal acid lipase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 111, S57–S58. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.12.125>

- Jones, S.A., Valayannopoulos, V., Schneider, E., Eckert, S., Banikazemi, M., Bialer, M., Cederbaum, S., Chan, A., Dhawan, A., Di Rocco, M., Domm, J., Enns, G.M., Finegold, D., Gargus, J.J., Guardamagna, O., Hendriksz, C., Mahmoud, I.G., Raiman, J., Selim, L.A., Whitley, C.B., Zaki, O., Quinn, A.G., 2016. Rapid progression and mortality of lysosomal acid lipase deficiency presenting in infants. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 18, 452–458. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.108>
- Krivit, W., Peters, C., Dusenbery, K., Ben-Yoseph, Y., Ramsay, N.K., Wagner, J.E., Anderson, R., 2000. Wolman disease successfully treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 26, 567–570. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702557>
- Lageron, A., Gautier, M., Scotto, J., 1985. [Clinical and histoenzymological peculiarities of cholesterol storage in 2 children of the same family]. *Arch. Fr. Pediatr.* 42 Suppl 1, 605–611.
- Leone, L., Ippoliti, P.F., Antonicelli, R., 1991. Use of simvastatin plus cholestyramine in the treatment of lysosomal acid lipase deficiency. *J. Pediatr.* 119, 1008–1009.
- Leone, L., Ippoliti, P.F., Antonicelli, R., Balli, F., Gridelli, B., 1995. Treatment and liver transplantation for cholesterol ester storage disease. *J. Pediatr.* 127, 509–510. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(95\)70103-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(95)70103-6)
- Levy, R., Ostlund, R.E., Schonfeld, G., Wong, P., Semenkovich, C.F., 1992. Cholesteryl ester storage disease: complex molecular effects of chronic lovastatin therapy. *J. Lipid Res.* 33, 1005–1015.
- Lohse, P., Maas, S., Lohse, P., Elleder, M., Kirk, J.M., Besley, G.T., Seidel, D., 2000. Compound heterozygosity for a Wolman mutation is frequent among patients with cholesteryl ester storage disease. *J. Lipid Res.* 41, 23–31.
- Lukacs, Z., Barr, M., Hamilton, J., 2017. Best practice in the measurement and interpretation of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2. *Clin. Chim. Acta* 471, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.05.027>
- Maciejko, J.J., Anne, P., Raza, S., Lyons, H.J., 2017. Lysosomal acid lipase deficiency in all siblings of the same parents. *J. Clin. Lipidol.* 11, 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2017.02.006>
- Maslen, C.L., Babcock, D., Illingworth, D.R., 1995. Occurrence of a mutation associated with Wolman disease in a family with cholesteryl ester storage disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 18, 620–623. <https://doi.org/10.1007/BF02436008>
- Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E., Carey, W.F., 1999. Prevalence of Lysosomal Storage Disorders. *JAMA* 281, 249–254. <https://doi.org/10.1001/jama.281.3.249>
- Muntoni, S., Wiebusch, H., Jansen-Rust, M., Rust, S., Seedorf, U., Schulte, H., Berger, K., Funke, H., Assmann, G., 2007. Prevalence of Cholesteryl Ester Storage Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1866–1868. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.146639>
- Nchimi, A., Rausin, L., Khamis, J., 2003. Ultrasound appearance of bowel wall in Wolman's disease. *Pediatr. Radiol.* 33, 284–285. <https://doi.org/10.1007/s00247-003-0873-1>
- Ozmen, M.N., Aygün, N., Kiliç, I., Kuran, L., Yalçın, B., Besim, A., 1992. Wolman's disease: ultrasonographic and computed tomographic findings. *Pediatr. Radiol.* 22, 541–542.

- Pagani, F., Pariyarath, R., Garcia, R., Stuani, C., Burlina, A.B., Ruotolo, G., Rabusin, M., Baralle, F.E., 1998. New lysosomal acid lipase gene mutants explain the phenotype of Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. *J. Lipid Res.* 39, 1382–1388.
- Paton, D.M., 2016. Sebelipase alfa: Enzymatic replacement treatment for lysosomal acid lipase deficiency. *Drugs Today* 52, 287. <https://doi.org/10.1358/dot.2016.52.5.2488974>
- Pericleous, M., Kelly, C., Wang, T., Livingstone, C., Ala, A., 2017. Wolman's disease and cholesteryl ester storage disorder: the phenotypic spectrum of lysosomal acid lipase deficiency. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2, 670–679. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30052-3](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30052-3)
- Pisciotta, L., Fresa, R., Bellocchio, A., Pino, E., Guido, V., Cantafora, A., Rocco, M.D., Calandra, S., Bertolini, S., 2009. Cholesteryl Ester Storage Disease (CESD) due to novel mutations in the LIPA gene. *Mol. Genet. Metab.* 97, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.02.007>
- Pisciotta, L., Tozzi, G., Travaglini, L., Taurisano, R., Lucchi, T., Indolfi, G., Papadia, F., Di Rocco, M., D'Antiga, L., Crock, P., Vora, K., Nightingale, S., Michelakakis, H., Garoufi, A., Lykopoulou, L., Bertolini, S., Calandra, S., 2017. Molecular and clinical characterization of a series of patients with childhood-onset lysosomal acid lipase deficiency. Retrospective investigations, follow-up and detection of two novel LIPA pathogenic variants. *Atherosclerosis* 265, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.021>
- Poznansky, M.J., Hutchison, S.K., Davis, P.J., 1989. Enzyme replacement therapy in fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 3, 152–156.
- Pullinger, C.R., Stock, E.O., Movsesyan, I., Malloy, M.J., Frost, P.H., Tripuraneni, R., Quinn, A.G., Ishida, B.Y., Schaefer, E.J., Asztalos, B.F., Kane, J.P., 2015. Identification and metabolic profiling of patients with lysosomal acid lipase deficiency. *J. Clin. Lipidol.* 9, 716-726.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.07.008>
- Quinn, A.G., Burton, B., Deegan, P., Di Rocco, M., Enns, G., Guardamagna, O., Horslen, S., Hovingh, G.K., Lobritto, S., Malinova, V., McLin, V., Raiman, J., Santra, S., Sharma, R., Sykut-Cegielska, J., Valayannopoulos, V., Whitley, C.B., Eckert, S., Schneider, E., 2014. Sustained elevations in LDL cholesterol and serum transaminases from early childhood are common in lysosomal acid lipase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 111, S89. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.12.215>
- Rajamohan, F., Reyes, A.R., Ruangsiluk, W., Hoth, L.R., Han, S., Caspers, N., Tu, M., Ward, J., Kurumbail, R.G., 2015. Expression and functional characterization of human lysosomal acid lipase gene (LIPA) mutation responsible for cholesteryl ester storage disease (CESD) phenotype. *Protein Expr. Purif.* 110, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.12.009>
- Reiner, Ž., 2013. Statins in the primary prevention of cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 10, 453–464. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2013.80>
- Reiner, Ž., Guardamagna, O., Nair, D., Soran, H., Hovingh, K., Bertolini, S., Jones, S., Ćorić, M., Calandra, S., Hamilton, J., Eagleton, T., Ros, E., 2014. Lysosomal acid lipase deficiency--an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis* 235, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.003>

- Reynolds, T., 2013. Cholesteryl ester storage disease: a rare and possibly treatable cause of premature vascular disease and cirrhosis. *J. Clin. Pathol.* 66, 918–923. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-201302>
- Ries, S., Aslanidis, C., Fehringer, P., Carel, J.C., Gendrel, D., Schmitz, G., 1996. A new mutation in the gene for lysosomal acid lipase leads to Wolman disease in an African kindred. *J. Lipid Res.* 37, 1761–1765.
- Riva, S., Spada, M., Sciveres, M., Minervini, M., Cintonio, D., Maggiore, G., Gridelli, B., 2008. Hepatocarcinoma in a child with cholesterol ester storage disease. *Dig. Liver Dis.* 40, 784. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.01.009>
- Saito, S., Ohno, K., Suzuki, T., Sakuraba, H., 2012. Structural bases of Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. *Mol. Genet. Metab.* 105, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.11.004>
- Seedorf, U., Wiebusch, H., Muntoni, S., Christensen, N.C., Skovby, F., Nickel, V., Roskos, M., Funke, H., Ose, L., Assmann, G., 1995. A Novel Variant of Lysosomal Acid Lipase (Leu336→Pro) Associated With Acid Lipase Deficiency and Cholesterol Ester Storage Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 773–778. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.6.773>
- Sen, D., Satija, L., Saxena, S., Rastogi, V., Singh, M., 2015. A rare constellation of imaging findings in Wolman disease. *Med. J. Armed Forces India* 71, S448–451. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.02.006>
- Sreekantam, S., Nicklaus-Wollenteit, I., Orr, J., Sharif, K., Vijay, S., McKiernan, P.J., Santra, S., 2016. Successful long-term outcome of liver transplantation in late-onset lysosomal acid lipase deficiency. *Pediatr. Transplant.* 20, 851–854. <https://doi.org/10.1111/petr.12748>
- Stein, J., Garty, B.Z., Dror, Y., Fenig, E., Zeigler, M., Yaniv, I., 2007. Successful treatment of Wolman disease by unrelated umbilical cord blood transplantation. *Eur. J. Pediatr.* 166, 663–666. <https://doi.org/10.1007/s00431-006-0298-6>
- Su, K., Donaldson, E., Sharma, R., 2016. Novel treatment options for lysosomal acid lipase deficiency: critical appraisal of sebelipase alfa. *Appl. Clin. Genet.* Volume 9, 157–167. <https://doi.org/10.2147/TACG.S86760>
- Tadiboyina, V.T., Liu, D.M., Miskie, B.A., Wang, J., Hegele, R.A., 2005. Treatment of dyslipidemia with lovastatin and ezetimibe in an adolescent with cholesterol ester storage disease. *Lipids Health Dis.* 4, 26. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-4-26>
- Tandra, S., Yeh, M.M., Brunt, E.M., Vuppalanchi, R., Cummings, O.W., Ünalp-Arida, A., Wilson, L.A., Chalasani, N., 2011. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 55, 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.021>
- Tarantino, M.D., McNamara, D.J., Granstrom, P., Ellefson, R.D., Unger, E.C., Udall, J.N., 1991. Lovastatin therapy for cholesterol ester storage disease in two sisters. *J. Pediatr.* 118, 131–135.
- Thelwall, P.E., Smith, F.E., Leavitt, M.C., Canty, D., Hu, W., Hollingsworth, K.G., Thoma, C., Trenell, M.I., Taylor, R., Rutkowski, J.V., Blamire, A.M., Quinn, A.G., 2013. Hepatic cholesteryl ester accumulation in lysosomal acid lipase deficiency: non-invasive identification and treatment monitoring by magnetic resonance. *J. Hepatol.* 59, 543–549. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.016>

-
- Todoroki, T., Matsumoto, K., Watanabe, K., Tashiro, Y., Shimizu, M., Okuyama, T., Imai, K., 2000. Accumulated lipids, aberrant fatty acid composition and defective cholesterol ester hydrolase activity in cholesterol ester storage disease. *Ann. Clin. Biochem.* 37, 187–193. <https://doi.org/10.1258/0004563001899195>
- Tolar, J., Petryk, A., Khan, K., Bjoraker, K.J., Jessurun, J., Dolan, M., Kivisto, T., Charnas, L., Shapiro, E.G., Orchard, P.J., 2008. Long-term metabolic, endocrine, and neuropsychological outcome of hematopoietic cell transplantation for Wolman disease. *Bone Marrow Transplant.* 43, 21–27. <https://doi.org/10.1038/bmt.2008.273>
- Valayannopoulos, V., Mengel, E., Brassier, A., Grabowski, G., 2017. Lysosomal acid lipase deficiency: Expanding differential diagnosis. *Mol. Genet. Metab.* 120, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.11.002>
- Weiskirchen, R., 2017. Fast progression of liver damage in lysosomal acid lipase deficiency. *Curr. Med. Res. Opin.* 33, 2081–2083. <https://doi.org/10.1080/03007995.2017.1335193>
- Wolman, M., Sterk, V.V., Gatt, S., Frenkel, M., 1961. Primary Familial Xanthomatosis with Involvement and Calcification of the Adrenals. *Pediatrics* 28, 742–757.
- Yanir, A., Allatif, M.A., Weintraub, M., Stepensky, P., 2013. Unfavorable outcome of hematopoietic stem cell transplantation in two siblings with Wolman disease due to graft failure and hepatic complications. *Mol. Genet. Metab.* 109, 224–226. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.03.007>
- Zhang, B., Porto, A.F., 2013. Cholesteryl Ester Storage Disease: Protean Presentations of Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *J. Pediatr. Gastroenterol.* 56, 682–685. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31828b36ac>

9. Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Organe, die bei einer LAL-D von einer Verfettung betroffen sind. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Alexion: Kanuma (Sebelipase alfa) Fachinformation, Oktober 2015	3
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Cholesterin-Regulierung beim Gesunden und bei Patienten mit LAL-D. Quelle: Reiner et al., Lysosomal acid lipase deficiency-An under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction, Atherosclerosis, 235, 2014.....	6
Abbildung 3 Genlocus des LIPA-Gens auf Chromosom 10, q23.2-q23.3. Quelle: Reiner et al., Lysosomal acid lipase deficiency-An under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction, Atherosclerosis, 235, 2014.....	7
Abbildung 4 E8SJM-Mutationsfrequenz und Prävalenz der CESD in verschiedenen Populationen. Quelle: Su et al., Novel treatment options for lysosomal acid lipase deficiency: critical appraisal of sebelipase alfa, The Application of Clinical Genetics, 9, 2016.....	10
Abbildung 5 Altersverteilung der US-Bevölkerung (rot) und aller bekannten LAL-D-Patienten (violett) im Jahr 2010. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Alexion: Kanuma (Sebelipase alfa) Fachinformation, Oktober 2015.	10
Abbildung 6 Histologisches Bild einer CESD. Quelle: Reiner et al., Lysosomal acid lipase deficiency-An under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction, Atherosclerosis, 235, 2014.....	13
Abbildung 7 Histologisches Bild einer CESD. Quelle: Hůlková and Elleder, Distinctive histopathological features that support a diagnosis of cholesterol ester storage disease in liver biopsy specimens, Histopathology, 60, 2012	15
Abbildung 8 Leberonographie mit Hepatomegalie und Verkalkung der Nebenniere. Quelle: Sen et al., A rare constellation of imaging findings in Wolman, Medical Journal Armed Forces India, 71, 2015.....	17
Abbildung 9 Röntgenbild mit hervorgetretenem Darm und Verkalkung der Nebenniere. Quelle: Sen et al., A rare constellation of imaging findings in Wolman, Medical Journal Armed Forces India, 71, 2015.	17
Abbildung 10 Beobachtete In-vivo-Effekte im LAL-D-Rattenmodell. Quelle: Quinn AG, et al. Poster presented at: 60th ASHG; November 2-6, 2010; Washington.....	24
Abbildung 11 Prozentsatz der Patienten mit Normalisierung der ALT/AST-Werte in Woche 20. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Alexion: Kanuma (Sebelipase alfa) Fachinformation, Oktober 2015.	25
Abbildung 12 Mittlere prozentuale Veränderung des LDL-/HDL-Cholesterins. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Alexion: Kanuma (Sebelipase alfa) Fachinformation, Oktober 2015	25

Abbildung 13 Mittlere prozentuale Veränderung des Lipidprofils. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Alexion: Kanuma (Sebelipase alfa) ,Fachinformation, Oktober 2015	26
Abbildung 14 Mittlere prozentuale Abnahme des Fettgehalts der Leber. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Alexion: Kanuma (Sebelipase alfa) Fachinformation, Oktober 2015	26
Abbildung 15 Mittlere prozentuale Veränderung des Milzvolumens. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Alexion: Kanuma (Sebelipase alfa) Fachinformation, Oktober 2015	27
Abbildung 16 Vergleich des Überlebens einer Population mit natürlichen Krankheitsverlauf und einer mit Sebelipase alpha therapierten Population. Quelle: Jones S, et al. Poster presented at: 11th Annual World Symposium; February 9-13, 2015; Orlando, Florida.....	29
Abbildung 17 Überleben der mit Sebelipase alpha therapierten Patienten. Quelle: Jones S, et al. Poster presented at: 11th Annual World Symposium; February 9-13, 2015; Orlando, Florida.....	29
Abbildung 18 Studiendesign.	33
Abbildung 19 Studienverlauf.	43
Abbildung 20 Verhältnis der Geschlechter in der Gesamtpopulation.	45
Abbildung 21 Verhältnis der Geschlechter nach Bearbeitung der pathologischen Befunde.	46
Abbildung 22 Verteilung der Geschlechter nach der ersten Mikroskopie.....	46
Abbildung 23 Verteilung der Geschlechter in der klinischen Patientengruppe.....	47
Abbildung 24 Verteilung der Geschlechter nach der zweiten Mikroskopie.....	47
Abbildung 25 Altersverteilung in der klinischen Patientengruppe.	48
Abbildung 26 Altersverteilung der selektierten klinischen Patientengruppe	49
Abbildung 27 Anteil der Patienten mit erfasstem BMI.	50
Abbildung 28 BMI-Verteilung im klinischen Patientenkollektiv.	51
Abbildung 29 Anteil der Patienten mit erfassten Perzentilen.	52
Abbildung 30 Perzentilenverteilung im klinischen Patientenkollektiv.	53
Abbildung 31 Verteilung der Laborwerte in der klinischen Patientengruppe.	54
Abbildung 32 Übersicht der Diagnosen der pathologischen Befunde.	56
Abbildung 33 Verteilung der Neoplasien.....	57
Abbildung 34 Leberschaden medikamentös-toxischer Genese, Übersicht.	58
Abbildung 35 Leberschaden medikamentös-toxischer Genese, Detailaufnahme...	58
Abbildung 36 Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH).	59
Abbildung 37 Leberzirrhose, PAS-Färbung.	60
Abbildung 38 Leberzirrhose, HE-Färbung.....	60
Abbildung 39 Patient A, HE-Färbung.	61
Abbildung 40 Patient A, CD68-Färbung.....	61
Abbildung 41 Patient B, HE-Färbung.....	62
Abbildung 42 Patient B, CD68-Färbung.....	62
Abbildung 43 Patient C, HE-Färbung.....	63
Abbildung 44 Patient C, CD68-Färbung.....	63
Abbildung 45 Patient D, CD68-Färbung.....	64

Abbildung 46 Patient E, CD68-Färbung.....	64
Abbildung 47 Patient F, CD68-Färbung.....	65
Abbildung 48 Patient G, HE-Färbung.....	65
Abbildung 49 Patient G, CD68-Färbung.....	66
Abbildung 50 Patient H, CD68-Färbung.....	66
Abbildung 51 Patient I, HE-Färbung.....	67
Abbildung 52 Patient I, CD68-Färbung.....	67
Abbildung 53 Patient J, HE-Färbung.....	68
Abbildung 54 Patient J, CD68-Färbung.....	68
Abbildung 55 Patient K, HE-Färbung.....	69
Abbildung 56 Patient K, CD68-Färbung.....	69
Abbildung 57 LAL-D-Patient 1, HE-Färbung.....	70
Abbildung 58 LAL-D-Patient 1, CD68-Färbung.....	70
Abbildung 59 LAL-D-Patient 1, PAS-Färbung.....	71
Abbildung 60 LAL-D-Patient 1, FE-Färbung.....	71
Abbildung 61 LAL-D-Patient 2, Ret-Färbung.....	72
Abbildung 62 LAL-D-Patient 2, CD68-Färbung.....	72
Abbildung 63 MRT-Aufnahme des Patienten 1 mit Hepatomegalie.....	73

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Normbereiche relevanten Laborparameter.....	38
Tabelle 2 Alterskorrigierte Normbereiche des Body-Mass-Index	39
Tabelle 3 Einschlusskriterien der Studie	41

9.3 Eidesstattliche Versicherung

Anlage 2

Zum Antrag auf Zulassung zur Promotion

Zum Dr. med.
(med. / med.dent.)

Weissgerber, Theresia

(Name) (Vorname)

Eidesstattliche Versicherung

gemäß § 8 Absatz 1 Nr. 3 der Promotionsordnung der Universität Freiburg für die Medizinische Fakultät

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema
Defizienz der lysosomalen sauren Lipase (LAL-D) bei Kindern und Erwachsenen mit Steatosis hepatis oder Leberzirrhose unklarer Genese: eine retrospektive Suche anhand histologischer Schnitte aus Leberbiopsaten
handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
 2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
 3. Die Ordnung der Albert-Ludwigs-Universität zur Sicherung der Redlichkeit in der Wissenschaft habe ich zur Kenntnis genommen und akzeptiert
 4. Die Dissertation oder Teile davon habe ich
(Zutreffendes bitte ankreuzen)
- bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
- wie folgt an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt:

Titel der andernorts vorgelegten Arbeit:

Name der betreffenden Hochschule:

Jahr der Vorlage der Arbeit:

Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung:

5. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
6. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Mannheim, 22.09.2018

Ort und Datum

T. Weissgerber
Unterschrift

9.4 Danksagung

Ganz herzlich danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Patrick Gerner für die Vergabe des interessanten Themas, für die kompetente fachliche Betreuung und die geduldige Unterstützung und Beratung während der Anfertigung dieser Arbeit. Nicht zuletzt haben auch seine Ideen und Anregungen zum erfolgreichen Abschluss dieser Doktorarbeit geführt.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Gian Kayser, der mit mir mit großer Ausdauer und Genauigkeit die pathologischen Schnitte unklarer Patienten mikroskopierte und auswertete und mir bei allen Fragen stets zuverlässig und geduldig zur Seite stand.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich stets unterstützt und motiviert hat. Ohne ihre Hilfe wären die Fertigstellung der Doktorarbeit und auch der Abschluss meines Studiums nicht möglich gewesen. Sie motivierten mich immer, meine Ziele gewissenhaft und strebsam zu verfolgen und standen mir zu jeder Zeit mit Rat zur Seite.