



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**RİSKLİ PEDİATRİK HASTALARDA
KOLESTERİL ESTER DEPO HASTALIĞI
TARAMASI**



UZMANLIK TEZİ

Dr. Murat Çağlar EROL

Antalya, 2017



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

RİSKLİ PEDİATRİK HASTALARDA KOLESTERİL ESTER DEPO HASTALIĞI TARAMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Murat Çağlar EROL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Reha ARTAN

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2017

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalında asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarıma,

Tezimin tüm aşamalarında ve araştırma görevlisi eğitimim esnasında her türlü desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Reha ARTAN' a,

Tezimin veri toplama aşamasında destek sağlayan Prof. Dr. Gülsüm Özlem ELPEK'in şahsında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalına,

Hasta kan örneklerinin gönderilmesi, kayıtların düzenlemesi konusunda değerli katkılarından ötürü Hemşire Havva MOR'a,

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm uzman doktor arkadaşlarıma,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Her zaman desteğini hissettiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa :</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iii
Şekiller ve Resimler Dizini	v
Tablolar Dizini	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kolesterol Ester Depo Hastalığının Tanımlanması ve Tarihçe	2
2.2. Kolesterol Ester Depo Hastalığının Kalıtımı ve Epidemiyolojisi	3
2.3. Kolesterol Ester Depo Hastalığının Patogenezi	4
2.4. Kolesterol Ester Depo Hastalığının Semptom ve Bulguları	7
2.5. Kolesterol Ester Depo Hastalığında Ayırıcı Tanı	10
2.6. Lizozomal Asit Lipaz Tarama ve Lizozomal Asit Lipaz Eksikliği Tanı Koyma Yöntemleri	11
2.7. Kolesterol Ester Depo Hastalığının Yönetimi ve Gelişen Tedaviler	14
2.7.1. Lipid düşürücü tedaviler	14
2.7.2. E vitamini	15
2.7.3. Hematopoetik kök hücre ve karaciğer transplantasyonu	15
2.7.4. Enzim replasman tedavisi	16
2.8. Kolesterol Ester Depo Hastalığında İzlem ve Prognoz	16
3. HASTALAR VE YÖNTEM	18
4. BULGULAR	20
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇLAR	33
7. ÖZET	34
8. ABSTRACT	36
9. KAYNAKLAR	38

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABCA 1	Adenozin Trifosfat Bağlayıcı “Casette” Taşıyıcı A1
ACAT	Açilkolesterol Açıltransferaz
ALT	Alanin Aminotransferaz
Apo B	Apolipoprotein B
AST	Aspartat Aminotransferaz
CE	Kolesteril Esterleri
CESD	Kolesteril Ester Depo Hastalığı
DB	Direk Bilirubin
E8SJM	Ekzon 8 Kırpılma Bölgesi Mutasyonu
FA	Serbest Yağ Asitleri
FC	Serbest Kolesterol
FCH	Familyal Kombine Hiperlipidemi
FFA	Serbest Yağ Asitleri
GGT	Gama Glutamil Transferaz
HB	Hemoglobin
HDL-C	Yüksek Dansiteli Lipoprotein – Kolesterol
HeFH	Hereditör Familyal Hiperkolesterolemi
HMG-CoAr	Hidroksimetilglutaril – Koenzim A Redüktaz
LAL	Lizozomal Asit Lipaz
LAL-D	Lizozomal Asit Lipaz Eksikliği
LAMP	Lizozomal İlişkili Membran Proteini
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LDL-C	Düşük Dansiteli Lipoprotein – Kolesterol

LDL-R	Düşük Dansiteli Lipoprotein – Reseptörü
LIPA	Lizozomal Asit Tipli Lipaz A
LXR	Nükleer Karaciğer X Reseptör
NAFLD	Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH	Alkolik Olmayan Steatohepatit
PAS	Periodik Asit Schiff
PLT	Trombosit
SREBP	Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein
T. KOL	Total Kolesterol
TB	Total Bilirubin
TG	Trigliserit
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein – Kolesterol
WBC	Lökosit

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Hücresel kolesterol homeostasisinin şematik görüntüsü	4
4.1. Kız (n:1) ve Erkek (n:12) hastalardaki düşük LAL (<0.37 nmol/punch/hr) oranı	21
4.2. LAL enzimi düşük (n:13) veya normal (n:164) gelen hastalarda T. kolesterol düzeyi ortalamaları	25
4.3. LAL enzim düzeyleri ve T. kolesterol seviyeleri arasındaki korelasyona ait serpilme	26
4.4. LAL enzim düzeyleri ve LDL seviyeleri arasındaki korelasyona ait serpilme	26
<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Hepatositlerdeki mikroveziküler yağlanma	9

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Lizozomal asit lipaz eksikliğinde klinik, serum belirteçleri ve karaciğer biyopsisi bulguları	8
2.2. LAL-D şüphesi olan hastaya algoritmik yaklaşım	12
3.1. Çalışma grubu hasta dağılımı	18
4.1. Kız ve erkek hastaların LAL enzim düşük ve yüksekliğine göre dağılımı	21
4.2. Hepatomegalisi olan ve olmayan hastaların LAL enzim düzeyi düşük ve normal olması açısından karşılaştırılması	22
4.3. Splenomegalisi olan ve olmayan hastaların LAL enzim düzeyi düşük ve normalliği açısından karşılaştırılması	23
4.4. Mikrosteatozu olan ve olmayan hastaların LAL enziminin düşük ve normal düzeyleri açısından karşılaştırılması	23
4.5. LAL enzim düzeyi ve çalışmaya dahil edilen hematolojik, biyokimyasal, patolojik parametrelerin kategorik olarak analizi	25

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, son dönem karaciğer hastalığına ilerleyebilen yaygın bir metabolik sendromdur. Obesite ve insülin direnci ile ilişkisi bilinmektedir ve çocuklarda bu iki durumun prevalansı belirgin olarak artmaktadır. Yağlı karaciğer hastalığı, çocuklarda en yaygın görülecek karaciğer hastalığı potansiyeli taşımaktadır. Karaciğer hastalığının histolojik görünümü, tek başına yağlı değişiklikten steatohepatit (“non-alcoholic steatohepatitis” NASH), siroza kadar değişebilir. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı ile birlikte çocukluk çağında mortalite, morbidite oranı yüksek hastalıklar karşımıza çıkmaktadır. En fazla birlikte görülenler, obezite, tip 2 diyabet ve hiperlipidemidir.

Bazı çalışmalarda NASH, sadece parankimal enflamasyonla birlikte makroveziküler steatozisin bulunması olarak tanımlanır. Bu tanım genellikle benign steatozisi ve özgün olmayan reaktif enflamasyonu içerir. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığının ayırıcı tanılarında biri olan batı toplumlarında görülme oranı 1/40.000 olan Kolesterol Ester Depo Hastalığı (CESD)’dir. CESD, LDL reseptör aracılı endositoz ile lizozomlarda depo edilen trigliserid ve kolesterol esterlerini hidrolize eden lizozomal asit lipaz enzim eksikliğine bağlı ortaya çıkar. Kolesterol esterlerinin ve trigliseritlerin karaciğer, dalak, kardiyovasküler sistem, sürrenal, bağırsaklar ve makrofaj-monosit sisteminde birikimine yol açar. Hastalık hepatomegali ve hiperlipidemi ile karşımıza çıkar, karaciğer yetmezliği, hızlanmış ateroskleroz ve erken ölüme neden olabilir. Hastalığın tanısı her ne kadar karaciğer biyopsisi ile olsa da enzim aktivitesi ölçülebilmekte ve “LIPA gene sequencing” yöntemi ile hastalığa tanı konabilmektedir. Amacımız Akdeniz Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D’na başvurmuş risk grubundaki hastaları tarayarak, CESD tanısı alanların saptanması, tedaviye ulaşmasını sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolesterol Ester Depo Hastalığının Tanımlanması ve Tarihçe

Yağlı karaciğer en sık görülen karaciğer problemi olup (1), batı dünyasında ciddi bir sağlık yükü oluşturmaktadır. Hastalık spektrumu histolojik anomaliler olarak basit steatozdan (ek karaciğer hasarı olmadan sadece steatoz) başlayıp ciddi formlara kadar uzanabilir (2). Hastalığın erken formu hepatik yağlanma yahut hepatosit sitoplazmasında lipid depolanmasıyla karşımıza çıkarken (6,7); hepatik yağlanma ciddi agresif nekro-inflamatuvar formuna steatohepatite dönüşebilir (2). Steatohepatit kliniğindeki hastalarda, steatozlu hastalara oranla karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinoma riskinde belirgin artış söz konusudur (7-9). Yağlı karaciğer hastalığının nedenlerinden biri de lizozomal asit lipaz eksikliğidir (LAL-D).

LAL-D nadir otozomal resesif bir hastalık olup, kolesterol esterleri ve trigliseritlerin karaciğer, dalak ve diğer organlarda ilerleyici birikimi ile karakterizedir (11). Erken mortalite, hızlanmış ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık gelişiminden sorumlu dislipidemi hastalığının sık bir bulgusudur (11-13). Progresif karaciğer hastalığı hastalığın başka bir sık görülen bulgusu olup hepatomegali, yüksek transaminaz düzeyleri ve/veya mikroveziküler yağlanma ile karşımıza çıkmaktadır (11).

LAL-D tanısı atlanabilmekte olup, etkilenen bireylerin bir kısmı tedavi almamakta yahut başka tanılar altında farklı tedaviler almaktadırlar. Hastalık heterojenöz bir klinikle ortaya çıkıp ilerleyici şekilde belirti ve bulgular vermektedir. 1956 yılında hastaneye kusma, karın şişliği, solukluk, sarılık ile başvuran iki yaşında bir bebekte Moshe Wolman ve arkadaşları ksantomatozis ve masif adrenal kalsifikasyon tanımladılar (7). Otopsi sonrası Wolman notlarına karaciğer, bağırsaklar ve lenf nodlarını da içeren birçok dokuda lipid damlacıkları gördüğünü eklemiştir.

Wolman Hastalığı, 1961 yılında her biri üç ay içinde kaybedilmiş üç kız kardeş üzerinde primer ksantomatozis, yavaş kilo alımı, sindirim sistemi belirtileri, hepatosplenomegali ve adrenal kalsifikasyon özellikleri ile Dr. Moshe Wolman tarafından tanımlanmıştır. Bundan birkaç yıl sonra Fredrickson 12

yaşındaki bir erkek hastada hiperkolesterolemi, hepatomegali ve karaciğer biyopsisi ile kolesterol ester birikimini göstermiş, hastalığın bu sonradan ortaya çıkan klinik formu ise kolesterol ester depo hastalığı (CESD) olarak adlandırmıştır. Bu dönemden sonra Wolman hastalığı ve CESD'nın aynı moleküler patolojiyi paylaştıkları görülmüştür. Bu durum kolesterol esterleri, trigliseridler ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) parçacıklarını serbest kolesterol ve serbest yağ asitlerine dönüştüren enzim olan lizozomal asit lipazı kodlayan LIPA genindeki mutasyonlar sonucunda karşımıza çıkmaktadır (19-22).

2.2. Kolesterol Ester Depo Hastalığının Kalıtımı ve Epidemiyolojisi

Ortalama 45 kb uzunluğunda olup, 10 ekzona sahip olan ve kromozomun 10q23.2 bölgesinde bulunan LIPA genindeki mutasyonlar LAL-D'ne yol açmaktadır.

Bazı hastalarda okkült mutasyonlar olsa da LAL-D otozomal resesif geçişli bir hastalık olup çoğu vaka homozigot veya kompozit heterozigot LIPA mutasyonları olarak karşımıza çıkmaktadır. Ciddi değişimler (nonsens mutasyonlar, çerçeve kayma defektleri, nokta mutasyonlar, stop kodonlar) bebeklerde karşımıza çıkarken, daha hafif mutasyonlar ile çocukluk döneminde karşılaşmaktayız. En fazla geçiş gösteren defekt ekzon 8 splice site mutasyonudur (E8SJM). Bu mutasyon etkilenen hasta grubunun yarısından fazlasında saptanmaktadır.

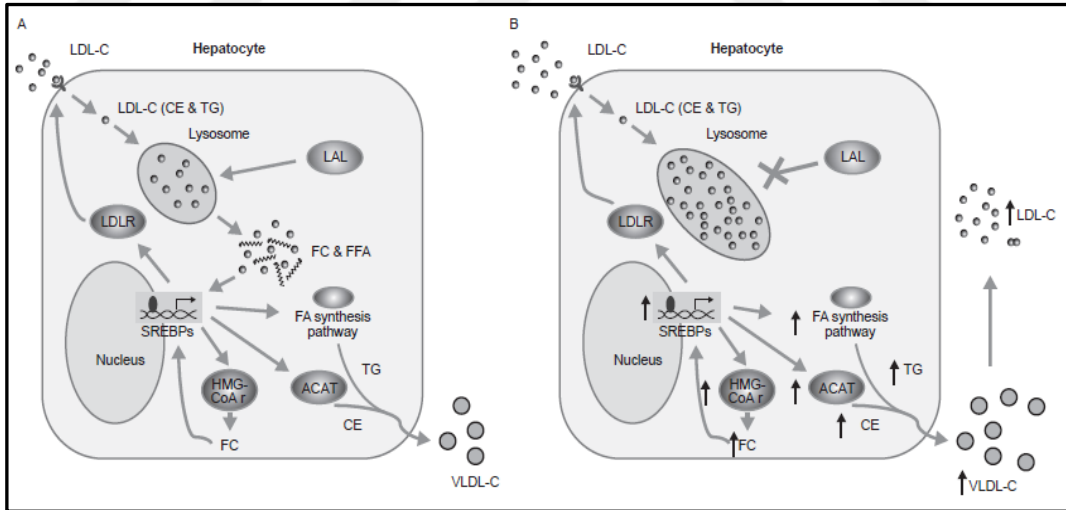
Çalışmalar beyazlarda 0,0013 (Amerika 0,0017; Almanya 0,0025; Avrupa 0,0012), Güney Amerikalılarda 0,0017, Amerika'daki Askenazi Yahudilerinde 0,0010, Asyalılarda 0,0005 ve Afrika kökenli Amerikalılarda 0,0000 oranında E8SJM aleline rastlamıştır.

Etkilenen hasta grubunun %50 ile 70'inde E8SJM olduğu varsayımına dayanılarak genel hastalık prevalansı etnik gruplar ve coğrafi bölgeler göz önüne alındığında 1/40.000 ile 1/300.000 arasında tahmin edilmektedir. Avrupa'da resmi bir LAL-D insidans çalışması henüz yapılmamıştır. Avustralya'da LAL-D sıklığı 1/700.000 olarak rapor edilmiştir. Irak ve İran kökenli Yahudi bebeklerde en fazla risk altında olduğu görülmektedir ki bu grubun Los Angeles'ta yaşayan bir topluluğu üzerinde yapılan çalışmada oran 1/4200 olarak saptanmıştır.

LAL-D eksikliğinde heterozigotluğun rolü henüz derinlemesine araştırılmamıştır. E8SJM mutasyonu açısından heterozigot olan 13 birey üzerinde yapılan derecelendirmede lipid profili ve artmış kardiyovasküler risk açısından poligenik hiperkolesterolemi ile aynı derecede bir değişim saptanmıştır (27). Bu durumu daha derinlemesine incelemek adına 13.194 kişiden oluşan Avrupa kökenli bir çalışma grubunda lipid düzeyleri araştırılmıştır. Fakat lipid düzeyleri ile heterozigotluk arasında bir bağ gösterilememiştir (24). Bu noktada vurgulanmak istenen heterozigotların sayısı az olmasına rağmen, yeni çalışmaların amacı heterozigotluğun LAL-D'nin ateroskleroz ve karaciğer fonksiyon bozukluğuna yol açacak klinik özelliklerinden sorumlu olup olmadığını kanıtlamaktır.

2.3 Kolesterol Ester Depo Hastalığının Patogenezi

LAL lizozomlarda kolesterol esterleri ve trigliseritlerin hidrolizinde lipid metabolizmasında kilit bir role sahiptir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Hücrel kolesterol homeostasisinin şematik görüntüsü; (A) Sağlıklı bireyler (B) LAL-D olan hastalar.

ACAT: açıl kolesterol açıltransferaz; CE: kolesterol esterleri; FA: serbest yağ asitleri, FC: serbest kolesterol; FFA: serbest yağ asitleri; HMG-CoA r: hidroksimetilglutaril-koenzim A redüktaz; LAL: lizozomal asit lipaz; LDL-C: düşük dansiteli lipoprotein kolesterol; LDLR: düşük dansiteli lipoprotein reseptörü; SREBP: sterol düzenleyici element bağlayıcı protein; TG: trigliserit; VLDL-C: çok düşük dansiteli lipoprotein - kolesterol

LDL kaynaklı kolesterol esterleri ve trigliseritler, LAL tarafından indirgenerek hücrel kolesterol homeostasisinin önemli mediatörleri olan serbest kolesterol ve yağ asitleri oluşur (28). Bu lipidler veya onların okside deriveleri doğrudan kolesterolün hücre içi alımında ve lipogenezden sorumlu genlerin ekspresyonundan sorumlu transkripsiyon faktörleri (sterol düzenleyici element bağlayıcı protein [SREBPs]) ile etkileşime geçerler (29).

Normalde hücre içi serbest kolesterol artışı SREBP-2 aracılı LDL reseptörlerinin aşağı regülasyonuna (kolesterolün hücre içine alımında azalmaya neden olur), hidroksimetil koenzim A (HMGCoA)'nın geri beslemeli baskılanmasına (azalmış kolesterol sentezine neden olur) ve açıl-kolesterol açıl transferazın da stimülasyonuna (kolesterol esterlenmesinde artış) neden olur. Aynı zamanda intrasellüler serbest yağ asidi artışı SREBP-1 aracılı serbest yağ asidi sentezinin aşağı regülasyonuna bağlı olarak fosfolipid ve trigliserid üretiminde baskılanmaya yol açar (30). LAL aktivitesinin azalması yahut yok olması, kolesterol esterlerinin yıkılmadan lizozomlarda birikmesine neden olur. İntrasellüler serbest kolesterol kıtlığı sürekli hale geldiğinde HMG-CoA redüktaz üretimi ile SREBP aracılı endojen kolesterol üretiminin artışı ve artmış apolipoprotein B (ApoB) sentezi ve LDL reseptör aracılı endositozla çok düşük dansteli lipoprotein kolesterol (VLDL-C) üretiminde artış yoluna gidilir. İntrasellüler kolesterol azalmasıyla duyarlanan SREBP-2'nin yol açtığı HMG-CoA redüktaz ekspresyonundaki artış, serbest kolesterol düzeylerinde artışa neden olur.

LAL-D de gözlenen HMG-CoA redüktaz artmış regülasyonuna bağlı serbest kolesterol düzeylerinin artışı tam anlamıyla anlaşılamamış fakat, LDL reseptör aktivitesinin geri beslemeli baskılanmasına ve dolaşımdan LDL-C temizlenmesinde azalmaya neden olduğu düşünülmektedir. Ancak LAL-D'de kolesterol akışı bu şemaya pek uymamaktadır. Örneğin LAL eksikliği olan fibroblastlarda sellüler LDL-C alımı artmakla birlikte, LAL-D olan hastalarda ApoB alımı normaldir (28-32). LAL eksikliği olan hepatositlerde kolesterol sentezi artışı, VLDL-C üretim ve sekresyonunda çok fazla artışa neden olup, karaciğerden kolesterol salınımına sonrasında da LDL-C üretiminde artış ile hiperkolesterolemiye katkıda bulunan önemli bir faktördür (32).

Bu bağlamda LAL-D olan hatalarda statinlerin kullanımı, bazı endişeleri de beraberinde getirmektedir. Öncelikle kolesterol esterlerinin karaciğerde birikimine bağlı hasarı azalttığı yönünde bir bulgu yoktur. Ayrıca hastalardan statin kullananlarda karaciğer transaminazlarında artış ve fibrozisin siroza ilerlediği yönünde kanıtlar mevcuttur (1,33). İkincil olarak statinlerin, LDL reseptör ekspresyonunu artırması ve ApoB içeren lipoproteinlerin sekresyonunu azaltması beklenmektedir. Bu durum plasma LDL-C düzeylerinde azalma olarak karşımıza çıkar, fakat bakıldığında LDL-C'un reseptör aracılı artmış alımı ve kolesterol esterlerinin lizozomal birikiminde artışa, karaciğer fonksiyonları açısından zararlı etkilere yol açmaktadır.

LAL-D olan hastalar düşük yüksek dansiteli lipoprotein, artmış trigliseritler, artmış serum total kolesterolü, yüksek LDL-C şeklinde dislipidemi ile karşımıza çıkarlar (17).

Total kolesterol ve trigliserit düzeyinde artış, LDL-C ve VLDL-C gibi ApoB içeren lipoproteinlerin plazmaya geçişine bağlıdır (36). HDL-C düzeylerindeki azalma ise olgun HDL oluşumunda azalmaya neden olacak olan adenosin trifosfat bağlayıcı cassette taşıyıcı A1 (ABCA1) üretiminde azalmaya bağlanmaktadır. ABCA1 geninin ekspresyonu artmış hücre içi kolesterol miktarı ile, nükleer karaciğer X-reseptör (LXR)'ün oksisiterol aracılı aktivasyonu ile gerçekleşir (37,38).

LAL-D'de lizozomlarda kolesteril esterlerinin tuzaklanması ve hücre içi serbest kolesterol havuzunda azalma aşağıdaki durumlara neden olur;

1. Oksisterol formasyonunda ve bunu takiben ABCA1 ekspresyonunda azalma,
2. Aslen HDL oluşturacak olan, ABCA1 aracılı ekstrasellüler düşük lipidli apolipoprotein A1'e transfer edilmek üzere kullanılacak plazma membranındaki ve subsellüler kompartmanlardaki kolesterolün azalması.

Kolesteril esterlerinin ve trigliseritlerin santral sinir sisteminde astrositler ve oligodendrositlerde birikimi görülmüştür (69). LAL-D ile doğan bebeklerde hastalığın erken başlangıcından sonra bilişsel gerileme görülmekle birlikte bunun santral sinir sistemi birikimine yahut malabsorbsiyona bağlı hastalığın sekonder sonucu olan malabsorbsiyona mı bağlı olduğu net değildir. LAL-D hastalarında

trigliserit ve kolesterol ester birikimi, myenterik plexus nöronlarında da olur ki, bu durum gastrointestinal patolojiye katkıda bulunmaktadır (70). Ayrıca bazı araştırmacılara göre azalmış nöronal myelinizasyon azalmış kolesterol ester ve trigliserit metabolizmasının sonucudur (71). Çoğu lizozomal depo hastalıklarında normal lizozomal yollar işlemesine rağmen görülen nörodejenerasyon bu durumun LAL'in tamamıyla yokluğuna bağlanabilir mi tartışma konusudur. LAL-D'deki artmış erken mortalite oranları hastalığın uzun süre nörolojik hasar açısından izlenmesine olanak vermemektedir.

2.4. Kolesterol Ester Depo Hastalığının Semptom ve Bulguları

LAL-D semptomları hastalar arasında değişiklik gösterebilir. En sık karşılaşılan klinik bulgular dislipidemi, hepatomegali, artmış serum transaminazlar, fibrozis, siroza ilerleyebilen karaciğer hücre hasarı ve bunlara ek (daha az sıklıkla) metabolik – kardiyovasküler problemler olarak karşımıza çıkar.

LAL-D olan bebekler, ergenlere oranla daha akut klinik bulgular gösterirler. Sindirim sistemi belirtileri (kusma, steatore ile birlikte diyare, abdominal distansiyon) ve büyüme geriliği ilk görülen bulgulardır (15). Abdominal distansiyon, primer olarak masif hepatosplenomegali kaynaklıdır. Enzimin tamamıyla yokluğunda %50 bebekte radyolojik olarak karakteristik punktat adrenal kalsifikasyonlar görülebilir (15). Anemi, kliniğe eşlik edebilir. Santral sinir sistemine etkileri doğrudan LAL-D tarafından değil, malnutrisyon ve/veya özgül besinsel eksikliklere bağlı olarak değerlendirilmektedir (15).

LAL-D'nin hafif formu olan ve parsiyel enzim aktivitesinin bulunduğu kolesterol ester depo hastalığında ise klinik, görece daha hafiftir. Hastalığın saptanması genelde insidental olup tanımlanan yaş grubu, ergenlik ve süt çocuğu dönemine kayar. Bu klinik özellikler, bazen erişkin dönemine kadar kendini belli etmez. Hepatosplenomegali ve anemi ile hastaneye başvuran 36 yaşındaki kadın hastada LAL-D tanısı konulmuş olup, hastanın tıbbi kayıtlarına bakıldığında iki yaşında hastalığın erken belirtileri olabilecek sarılık, hepatomegali ve kahverengimsi deri lezyonları nedeniyle takip edildiğine rastlanmıştır (42). Ergenlik ve çocukluk yaş grubunda belirti vermiş dahi olsa, bu hasta grubunun da üçte biri ciddi ishal, kusma, karın ağrısı, malabsorbsiyon ve steatore gibi ciddi

sindirim sistemi belirtilerinin yanında kolestaz, büyüme gelişme geriliği, adrenal kalsifikasyon, inme, safra disfonksiyonu da bildirilmiştir (1,40,44).

Tablo 2.1. Lizozomal asit lipaz eksikliğinde klinik, serum belirteçleri ve karaciğer biyopsisi bulguları.

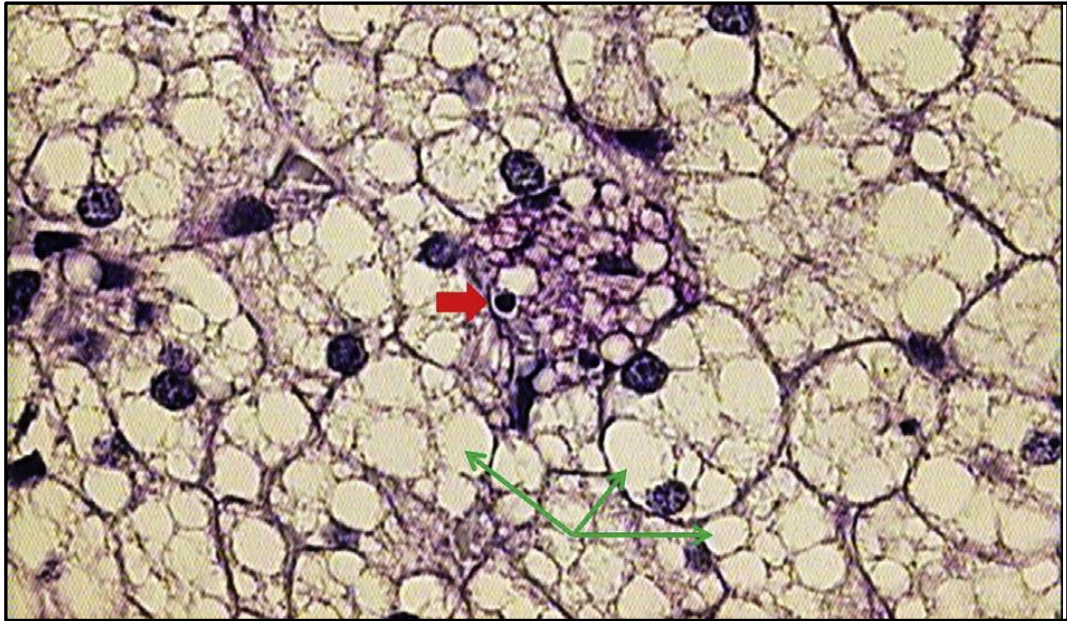
Klinik belirti ve bulgular	Hepatomegali / hepatosplenomegali İshal Karına ağrısı Kusma Anemi Malabsorbsiyon Kolestaz Steatore Gelişim geriliği Safra kesesi disfonksiyonu Koroner arter hastalığı Anevrizma İnme Adrenal kalsifikasyon (tanı kriteri değil) Özofagus varisi
Serum belirteçleri	Artmış total kolesterol Artmış düşük dansiteli lipoprotein kolesterol Azalmış yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol Artmış serum transaminazları
Karaciğer biyopsisi bulguları	Parlak yeşil – sarı renk Genişlemiş lipid yüklü hepatositler ve Kupffer hücreleri Mikroveziküler yağlanma (makroveziküler yağlanma ile karıştırılabilir) Fibrozis Mikronodüler siroz

Genelde etkilenen bebeklerde total plazma trigliseriti ve kolesterol düzeyleri normal olmakla birlikte, bazı vakalarda artmış trigliserit ve VLDL-C seviyeleri ile düşük HDL-C seviyeleri bildirilmiştir (45,48).

LAL-D olan çocuklar genelde tip2a veya tip2b hiperlipidemiye sahiptirler. Artmış total kolesterol, artmış LDL kolesterol, artmış ApoB ve azalmış HDL kolesterol seviyeleri ile karşımıza gelirler (1,56). Dokuz yaşında kaybedilen bir LAL-D hastasında aortik plak gösterilmiş olup, hastalık seyrindeki dislipidemi, ateroskleroz ve erken kardiyovasküler hastalık ile bağlantılı bulunmuştur (40).

LAL-D olan bebekler sıklıkla gelişme geriliği, hepatomegali ve hepatosellüler yetmezliğe hızla ilerleyecek fibrozis ve siroz ile karşımıza çıkarlar. Hasta 2-3 aylık olduğunda, 20 kat büyümüş bir dalakla karşı karşıya kalabiliriz. Hepatomegali ve splenomegali, kolesteril ester depo hastalığı olan çocuklarda %74 ila %99 arasında görülmektedir. Hastalar arasında değişiklik gösterse de, artmış serum alanin aminotransferaz (ALT) ve/veya aspartat aminotransferaz, karaciğer hasarının erken belirteçleri olarak değerlendirilmektedir. Klinik bulguları erken çocuklukta ciddi karaciğer hastalığından (özofageal varisler, karaciğer yetmezliği), ergenlik döneminde asemptomatik düşük dereceli karaciğer hasarına (artmış transaminazlar), siroza sessiz ilerlemeye kadar değişiklik gösterebilir. Biyopside karaciğer makroskopik olarak sarı, turuncu histolojik analiz yapıldığında ise değişen derecelerde perilobuler, portal fibröz ve hepatositlerin lizozomlarında trigliserit ve kolesteril ester birikimine bağlı ağır mikroveziküler yağlanma gözlemlenir (3,4).

Hastalığın karakteristik bir bulgusu, hipertrofik Kupffer hücrelerinin varlığı ve portal alanda periodik asit Schiff (PAS) ile boyanan köpüklü, koyu renkli sitoplazmalı makrofajlardır. Bu vökuollerin membranları PAS ile belirgin boyanmaktadır (Resim 2.1).



Resim 2.1. Hepatositlerdeki mikroveziküler yağlanma (yeşil oklar). Perivenüler alanda PAS pozitif boyanmış köpüksü Kupffer hücreleri (kırmızı kalın ok). (PAS: periodik asit Schiff).

LAL-D olan hastalardan alınan biyopsi materyallerinde çift kırılım gösteren sıvı kolesterol ester kristallerinin birikimi de ayrı bir tanısal ipucudur. Bir başka kullanışlı tanımlayıcı da luminal katepsin D ve lizozomal belirteçlerin (lizozomal ilişkili membran proteini LAMP1, LAMP2 ve lizozomal integral membran protein 2) lipid damlacıkları etrafında immünohistokimyasal olarak görülmesidir (4). Kupffer hücreleri ve parankimal alanda değişen boyutlarda kolesterol ester ve trigliserit damlacıkları görülebilir. Bazı lipid vakuollerinde örneğin hazırlanması sırasında çözünen lipid vakuollerinin yıldızimsı görüntüsü alınan materyale güve yeniği görünümünü verir (14).

İlerleyici lipid depolanması fibrozis (etkilenmiş hastaların 2/3 ü çocukluk ve erişkin yaş grubunda bu şekilde prezente olur) ve sonunda mikronoduler siroza dönüşür. Siroza ilerleyen olgulardaki komplikasyonlar ise portal hipertansiyon, asit, özofageal varisler, gastrointestinal kanama, kaşeksi, koma ve karaciğer yetmezliği ile ölüm olarak sayılabilir (1).

2.5. Kolesterol Ester Depo Hastalığında Ayırıcı Tanı

LAL-D'nin kardiyovasküler, karaciğer üzerine ve metabolik etkileri göz önüne alındığında, hastalığın ayırıcı tanısı oldukça zorlayıcı olmaktadır. Uygun araştırma yapılmadan bu benzerlikler doğrultusunda tanı gecikebilir ve yanlış koyulabilir.

Serum lipid seviyeleri LAL-D olan hastalarda farklılık gösterebilir. Çocuklarda artmış LDL kolesterol ve azalmış HDL seviyeleri görülmektedir (1). Sıklıkla HeFH (Hereditör familial hiperlipidemi), familial ApoB defekti, FCH ve poligenik hiperkolesterolemi tanıları ile karışabilmektedir (17,18). LAL-D'ni bu durumlardan ayırmak, bazı önemli noktalar göz önüne alındığında mümkün olabilmektedir. Öncelikle ayrıntılı bir aile öyküsü ve soy ağacı otozomal dominant bozuklukları saptamaya yardımcı olur (örn. HeFH, FCH ve poligenik hiperkolesterolemi). İkincil olarak total kolesterol ve LDL kolesterol düzeyleri LAL-D'de HeFH kadar yüksek olmaması ile tanınabilir. HDL kolesterol düzeyleri heterozigot familial hiperkolesterolemiye oranla daha düşük olmasına rağmen bazı hastalarda yakın değerler karşımıza çıkabilmektedir. Benzer lipid profilleri

olma ihtimali göz önüne alındığında, heterozigot familial hiperkolesterolemi açısından hastalar değerlendirilirken LAL-D de akılda tutulmalıdır.

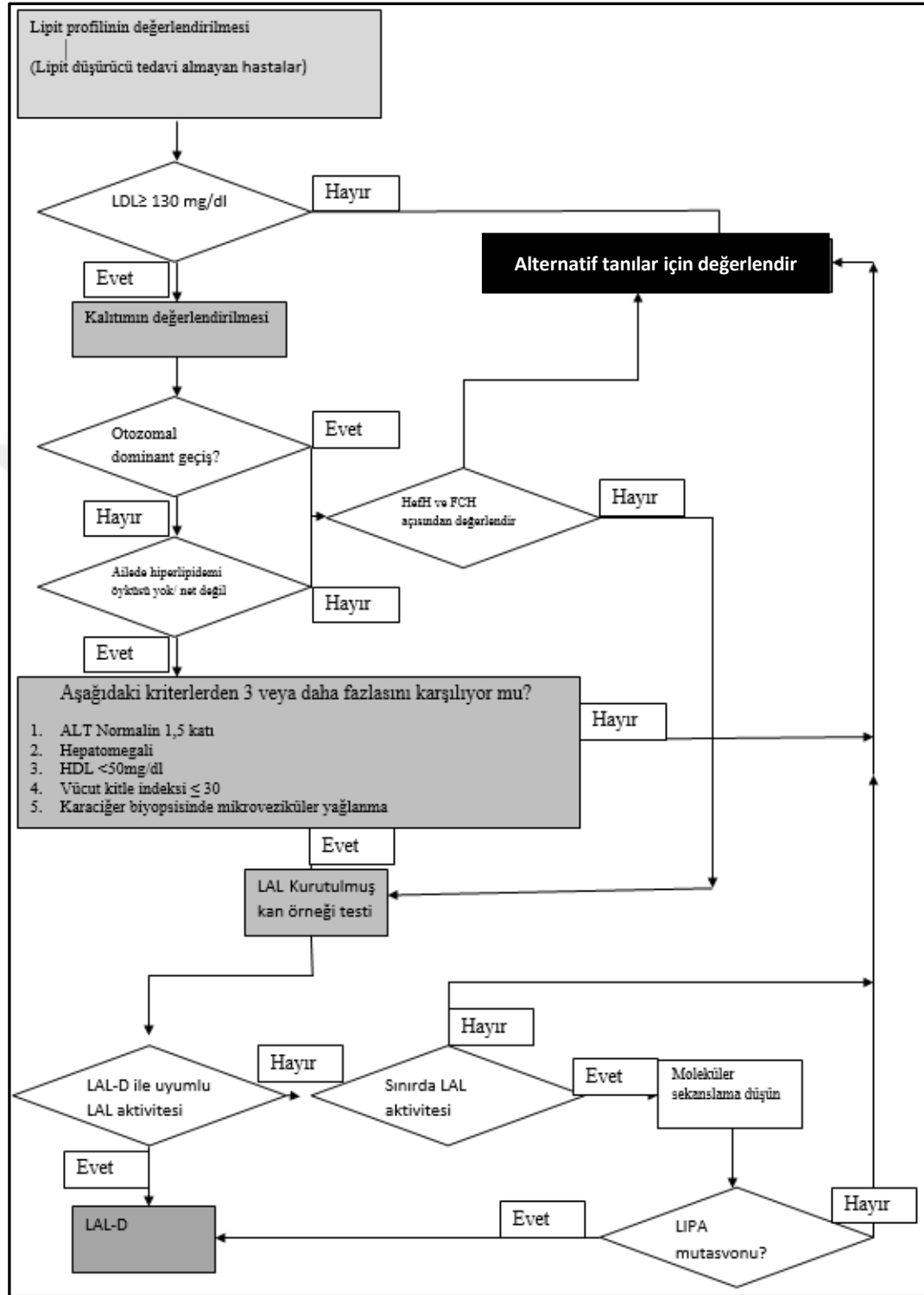
LAL-D’nde görülen anomaliler ve ilerleme her ne kadar niteleyici olsa da, karaciğer hastalığının belirtileri hep aynı şekilde karşımıza çıkmaz. Örneğin hepatomegali, en sık görülmesine rağmen her hastada gözlenen bir bulgu değildir. Bazı hastalarda sadece hafif artmış transaminazlar görülürken bazılarında ise bu enzim düzeyleri normal görülür. Hepatomegali ve artmış transaminazları olan hastalarda tanı, NAFLD (Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı), NASH (Non alkolik steatohepatit) ve kriptojenik siroz ile karışabilir hatta hiçbir tanı konulamayabilir. Dislipidemi, yağlı karaciğer ve artmış karaciğer transaminazları ile birlikte olabilen metabolik sendromlu bireylerin aksine, LAL-D’de hastalar normal kilolu olabilmektedirler. Böylelikle belirtilen karaciğer bulguları ile birlikte gelen hastalarda LAL-D akılda tutulmalıdır.

2.6. Lizozomal Asit Lipaz Tarama ve Lizozomal Asit Lipaz Eksikliği Tanı Koyma Yöntemleri

LAL-D’nin tanısında zaman içerisinde otörlerin klinik deneyimi temel alınarak tanısasal bir algoritma geliştirilmiştir (Tablo 2.2).

Hastalığın heterojenik fenotipi göz önüne alındığında tanı konulması için yukarıda söz edilen ölçütlerin hepsini karşılamak durumunda değildir. Bu noktada ölçütlerden üç ya da daha fazlasının karşılanması durumunda hasta LAL-D açısından değerlendirilmelidir. Hiperlipidemi açısından aile öyküsü olmaması otozomal resesif geçişi desteklemekle birlikte, heterozigot familial hiperlipidemi açısından genetik mutasyonun olmama olasılığını güçlendirir. Her ne kadar tanı için karaciğer biyopsisi önerilmese de, biyopsi yapılan hastalarda karşılaşılan mikroveziküler yağlanma LAL-D açısından değerlidir. Akılda tutulması gereken bir durum da LDL kolesterol düzeylerinin normal değerleridir. Her ne kadar çocukluk yaş grubunda deneyim sınırlı olsa da, tanı atlamamak açısından yaşına ve cinsiyetine göre 95. persentilin üzerinde lipit değerleri olan hastalar dikkatle incelenmelidir.

Tablo 2.2. LAL-D şüphesi olan hastaya algoritmik yaklaşım.



LAL-D lizozomal asit lipaz enziminin eksikliği veya LIPA geninde mutasyon göstererek saptanabilir (1). Biyopsi ve radyolojik bulgular tanısal olarak kullanılmaz fakat LAL-D şüphesini desteklemeye yardımcı olur. LAL-D karaciğer dokusunda, periferik kandaki lökositlerde bulunan fibroblastlarda enzim aktivitesi ölçülerek doğrulanabilir. Bu çalışmalarda substrat LAL enzimine spesifik olmayabileceğinden (örn. 4-nitrofenil palmitat), teorik olarak yalancı negatif sonuç ile karşılaşmak mümkündür. LAL aktivitesini kurutulmuş kan örneklerinde ölçmek üzere geliştirilmiş yeni bir yöntem etkilenen hasta grubunu bulmak için kullanılmaktadır (66). LAL aktivitesi, 4-metillumbeliferil palmitatı substrat olarak kullanarak ölçülmektedir. Kandaki diğer lipazlar LAL ile etkileşebileceğinden, bir LAL enzim inhibitörü kullanılarak ölçüm yapılmaktadır. Lalistat-2, Niemann-Pick hastalığı için potansiyel teröpatik bir ajan olarak geliştirilmesine rağmen LAL enziminin spesifik bir inhibitörüdür (68). Lalistat-2 varlığında ölçülen ile total lipaz aktivitesinin karşılaştırılması bize LAL enzim aktivitesini vermektedir. Bu metodla ortalama LAL aktivitesi gösterenler ile sağlam çocukların veya hastalıktan etkilenmiş bireylerin ayırt edilebilmesi mümkündür. Bu yöntem LAL taramaları için kullanılabilir olup, geniş popülasyonlara uygulanabilir olup, yenidoğan taramalarına uyarlanabilir.

Kurutulmuş kan örnekleri ile LAL aktivitesi ölçmenin birçok avantajı mevcuttur; çok az miktar örnek alınarak oda sıcaklığında özel laboratuvarlara transfer edilebilir. Örnek oda sıcaklığında 7 gün kaldıktan sonra LAL enzim aktivitesinde %15'lik bir düşüş olmaktadır. Uygun transport ile kurutulmuş kan örneği ile LAL enzim aktivitesi değerlendirmede kullanılabilir. Uzun dönemde 20°C sıcaklıkta, 100 gün %87 enzim aktivitesini korumaktadır (66). LIPA bölgelerini kodlayan genlerin full sekansının değerlendirilmesi LAL-D şüphesi olan hastaların genetik yapısını göstermede kullanılabilir (15). LAL-D bulunan çocuk ve erişkinlerde en sık görülen mutasyon E8SJM'dir. En çok etkilenen hasta grubu homozigot ya da kompozit heterozigot LIPA mutasyonu barındıran hastalar olmakla birlikte, intronik mutasyonları olan hastalar rutin genetik taramada gözden kaçabilir. Bu bilgiler ışığında gen sekanslamasının yerine ucuz ve güvenilir sonuçlar veren kuru kan örneğinden enzim aktivitesi çalışılması yöntemi kullanılabilir.

Karaciğer anomalilerini göstermede en güvenilir yöntem biyopsidir. Fakat biyopsinin beraberinde getirdiği maliyet, morbidite ve mortalite riskleri geniş bir uygulama alanı sunmamaktadır. Ayrıca örnek alımındaki hatalar, tanısal zorluklara yol açabilmektedir. Mevcut rehberler, diğer noninvaziv testlerle anlamlı bir sonuç alınamayan hastalarda karaciğer biyopsisini önermektedirler (70). LAL-D'de görülen mikroveziküler karaciğer yağlanması hastalığına özgün olmayıp tanıyı doğrulamada histolojik bulgulara gereksinim duyulmaktadır. Hipertrofik Kupffer hücreleri ve portal makrofajlarda köpüksü, koyu renkli sitoplazma görülmesi, kolesterol ester depo hastalığı için karakteristik bir bulgudur. Parafinli materyallerde lipid vakuolleri çevresinde luminal ve membran lizozomal markerlarının bulunması LAL-D'ni gösterir ayrıca parafinsiz örneklerde kolesterol ester kristallerinin gösterilmesi, hastalık açısından patognomonik bulgudur (4). LAL-D'nde olan hepatik lipid birikimini göstermede hepatik manyetik rezonans spektroskopisi kullanışlı bir non invaziv yöntemdir (71). Bu yöntem hastalığın tanı ve takibi açısından tekrarlayan biyopsiye göre oldukça uygun bir alternatiftir.

2.7. Kolesterol Ester Depo Hastalığının Yönetimi ve Gelişen Tedaviler

2.7.1. Lipid düşürücü tedaviler

Statinler (HMG-CoA- redüktaz inhibitörleri) kalp-damar ile ilgili riski azaltmak adına LDL kolesterol düşürücü bir etken olarak iyi tolere edilmektedir. Her ne kadar artışlar gözlemlense de, kolesterol ester depo hastalığı olan çocuklarda monoterapi yahut kombine tedavinin bir parçası olarak statinler kullanılabilirler (5,17,32). Yeni yapılan gözlemsel bir çalışmada LAL-D olan hastalarda lipid düşürücü tedavi almasına rağmen dislipideminin devam ettiği gösterilmiştir (33). Kolesterol ester depo hastalığı tanısı olan bazı hastalarda statinlerin fibroblastlarda endojen kolesterol sentezini azalttığı gösterilmiştir (32). Başka bir çalışmada ise, ApoB içeren lipoproteinlerin karaciğerde üretiminin azalmasına bağlı plazma LDL kolesterol seviyelerinde azalmanın olduğu gösterilmiştir (36). Her ne kadar statin tedavisi, kalp-damarlar ile ilgili riski azaltsa LDL kolesterolün plazma düzeyini düşürerek azaltsa da, tedaviye karşın LAL-D olan hastalarda karaciğer hasarı oluştuğuna dair bilgi mevcuttur (1,36).

Statinlerle tedavi olan bir grup hastada karaciğer boyutlarının azaldığı görülmüştür (36). Fakat her koşulda uzun dönem izlenen birçok hastanın karaciğer sirozuna ilerlediği gösterilmiştir (1,15). Benzer bir çalışmada, statin tedavisi alan 12 LAL-D olan hastanın karaciğer histolojik bulgularında bir düzelme saptanamadığı gösterilmiştir (1). Takip eden biyopsilerde 12 hastanın hepsinde de LAL-D'nin doğal karaciğer etkilenme bulgularını gösteren ilerleme görülmüştür. Bu gruptaki altı hasta transplantasyon geçirmiş veya karaciğer yetmezliğinden kaybedilmiştir (1). Bu konuda ileri araştırma gerekmektedir. Ezetimib (kolesterol absorpsiyon inhibitörü)'in 15 yaşında LAL-D olan bir hastada 6 aylık tedavi sonrası LDL kolesterol düzeylerini (%25-30 düzeylerinde) düşürdüğü ve karaciğer transaminazlarını normale getirdiği rapor edilmiştir (78). Bir yıl ezetimib tedavisi sonrası, artmış serum sitokin ve oksidatif stres parametrelerinin normale döndüğü görülmüştür (78).

2.7.2. E vitamini

İn vitro bir çalışmada, tokoferol ile kombine edilmiş E vitamini alan Niemann-Pick Tip 1'li ve LAL-D olan bebeklerde lizozomal ekzositozun arttığı ve fibroblastlarda lipid birikimin azaldığı görülmüştür (79). Ne yazık ki E vitamininin hızlı oksidasyonu nedeniyle, hayvan veya hasta uygulamaları açısından in vivo testlerin sonuçları yüz güldürücü değildir.

2.7.3. Hematopoetik kök hücre ve karaciğer transplantasyonu

Hematopoetik kök hücre nakli LAL-D olan bir kaç bebekte uygulanmıştır (13,80). Toksisite ve dokuların engraftman sorunları göz önünde bulundurulduğunda, hastalığın multi sistem bulguları ile birlikte sınırlı bir başarısı olmaktadır (80). Bazı LAL-D hastalarında karaciğer nakli sonrası beş yıl sağ kalım görülmüş olup, uzun dönem sonuçları ve komorbid durumlar açısından bulgular sınırlıdır (83,84).

2.7.4. Enzim replasman tedavisi

Sebelipaz alfa (Kanuma, KanumaTM) dünya çapında farklı ülkelerde (Avrupa Birliği, Amerika, Japonya) onay almış ve uzun dönem enzim replasman tedavisi olarak kullanılan ilk rekombinant insan lizozomal asit lipaz enzimidir. Enzim transgenik tavuk yumurtalarının beyazından saflaştırılmış olup, insan LAL enzimi ile aynı aminoasit dizilimine sahiptir. Eksik LAL enzimi yerine geçerek kolesterol esterlerinin ve trigliseritlerin serbest yağ asitlerine hidrolizini katalize eder ve lizozomal lipid birikimini engelleyerek LAL-D olanlarda karaciğer anomalisi ve dislipidemide düzelme sağlar. Devam eden çalışmalardan birine göre LAL-D tanısı almış sebelipaz alfa kullanılan dokuz bebekte bir yıllık yaşamda kalım oranı önceki hasta gruplarına göre belirgin derecede artış göstermiştir. Hastalık aktivitesinde ve iki yaşında mortalitede azalma saptanmıştır. Kolesterol ester depo hastalığı olan 66 çocuk ve erişkinde yapılan 20 haftalık bir başka çift kör çalışmada sebelipaz alfanın karaciğer ve lipid anomalilerini plasebo ile karşılaştırınca daha fazla azalttığı görülmüştür. Açık etiketli bir çalışmada 76. hafta ve 2. yılda dislipidemi ve karaciğer hasarı belirteçlerinde gelişim saptanmıştır. Sebelipaz alfa iyi tolere edilmekle birlikte anaflaksi en ciddi yan etkisi olarak kayıtlara geçmiştir.

Hastalığın nadir görülmesine bağlı olarak bu çalışmalar sınırlı sayıda hasta gruplarıyla yapılabilmektedir. Buna rağmen veriler sebelipaz alfanın daha önceden destekleyici tedaviler (örn. kolesterolün düşürülmesi, hematopoetik kök hücre nakli ve karaciğer nakli) almak durumunda kalan LAL-D tanısı almış bireylerde etkili bir hastalığa özgü tedavi olduğunu göstermektedir (91).

2.8. Kolesterol Ester Depo Hastalığında İzlem ve Prognoz

Hastalığın ilerleyici yapısı dikkate alındığında LAL-D olan hastalar, ilerleyişi değerlendirmek amacıyla belli aralıklarla taranmalıdırlar. Önerilenler; karaciğer fonksiyon testleri, tam kan sayımı, lipid profili ve plazma kitotriozidaz (birçok lizozomal depo hastalığında artan kitinaz) düzeyi ölçümüdür (1). Karaciğer ve dalak boyutlarını değerlendirmek üzere periodik olarak görüntüleme yapılmalıdır. Hepatik yağ içeriğini görüntülemek üzere MR spektroskopisi kullanılabilir (71). Karaciğer fibrozisi, portal hipertansiyon ve varis kanaması

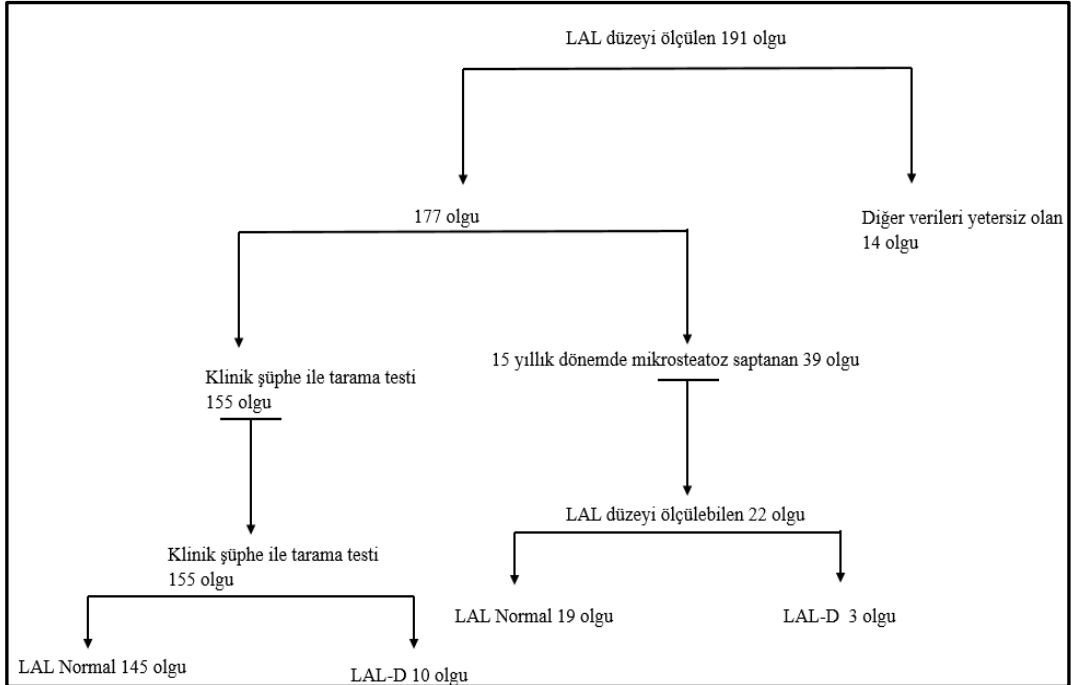
riski açısından görüntüleme çalışmaları, hastanın kliniği değerlendirilerek yapılmalıdır.

Hastalığın ilerleyişi ve yaşam kalitesi üzerine etkileri, kişiden kişiye değişmektedir. Bazı çocuklar erken dönemde karaciğer yetmezliğine girip karaciğer nakline gereksinim duyarlar. Kardiyovasküler açıdan ise, LAL-D olanlar koroner arter hastalığı, anevrizma ve inme ile karşılaşabilirler. Kuşkusuz bu ciddi bulgu ve belirtiler yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedirler. Fakat LAL-D için yaşam standartlarını içeren ölçülebilir bir yaşam kalitesi değerlendirmesi yapılmamıştır. Erken kardiyovasküler olay veya ani ölümle karşılaşmayan bireyler tanı almadan yahut yanlış tanı alarak izlenebilir.

3. HASTALAR VE YÖNTEM

Çalışmamıza, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına herhangi bir nedenle başvurmuş obez olmayan (beden kitle indeksi yaş ve cinsiyete göre 95. persentilin altında olan veya ulusal gelişim çizelgesine göre kilosu 95. persentilde ve altında olan 0-18 yaş arası hastalar içerisinde başvuru veya takibinde karaciğer fonksiyon testlerinde yükseklik ve/veya LDL değerinde yükseklik, HDL’de düşüklük saptanmış ve/veya açıklanamayan hipertransaminazemi nedeni ile incelenip izlenen olgular (n:155) çalışma grubunun bir bölümünü oluşturdu. Ayrıca 2002-2017 yılları arasında herhangi bir dönemde karaciğer biyopsisi yapılmış ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı tarafından değerlendirilip mikroveziküler yağlanma tesbit edilmiş 0-18 yaş arası hastalar (n:22) bir diğer grup olarak çalışmaya dahil edildi.

Tablo 3.1. Çalışma grubu hasta dağılımı.



Klinik, laboratuvar veya patolojik verileri açıklayabilecek hepatit C, otoimmün hepatit, Wilson hastalığı, kistik fibrozis, glikojen depo hastalığı yahut kanıtlanmış genetik ve/veya metabolik hastalığı olan olgular çalışma dışı bırakıldı.

Hastaların daha önceden istenmiş hemoglobin, lökosit, trombosit, alanin amino transferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), gama glutamil transferaz (GGT), direk bilirubin, total bilirubin, trigliserit, total kolesterol, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL) değerleri derlendi.

Çalışma öncesinde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul'undan onay alındı (Karar Tarihi; 30 Aralık 2016, Karar Sayısı; 70904504/619). Çalışmaya dahil edilen hasta ve velisinden aydınlatılmış onam alındı.

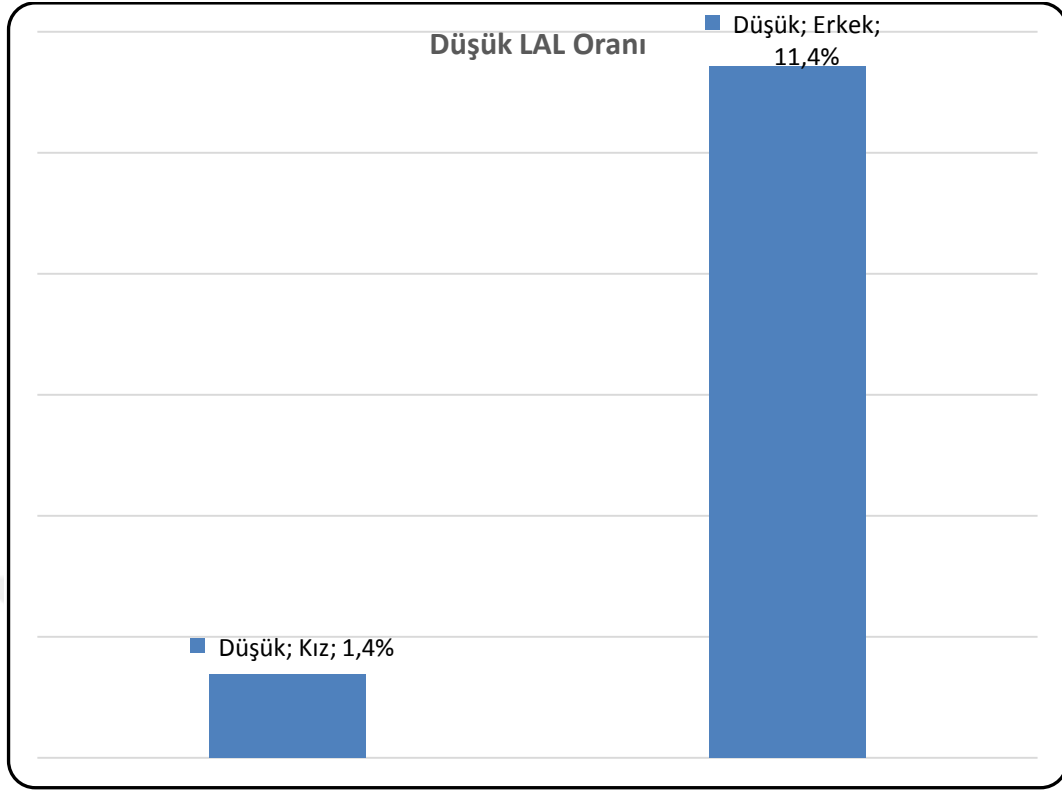
Hastalardan alınan kan örneği kurutma kağıdına damlatılarak Queen Elizabeth University Hospital Biochemistry Department United Kingdom adresinde bulunan biyokimya laboratuvarına LAL enzim düzeyi çalışılmak üzere kargo ile gönderildi. Hasta gizlilik ilkesi gereği sonuçlar öncelikle elektronik posta yoluyla gönderen hekimin elektronik posta adresine geldi, sonrasında resmi olarak posta yoluyla tarafımıza ulaştı.

Veriler SPSS (version 23,0) (SPSS Inc. Chicago, USA) paket programı ile analiz edilmiştir. Normallik varsayımı Shapiro Wilk Testi ile kontrol edilmiştir. İki grubun sayısal verisi Mann Whitney U Testi ile karşılaştırılmıştır. Ölçümler arasındaki ilişkiler Spearman Korelasyon Testi ile analiz edilmiştir. $P<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamıza 191 hasta LAL enzim düzeyleri çalışılarak dâhil edildi. Hastaların 14'ünün sadece LAL enzim düzeyi verisi olması çalışma öncesinde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi veri tabanında çalışılmış hemoglobin, lökosit, trombosit, alanin amino transferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), gama glutamil transferaz (GGT), direk bilirubin, total bilirubin, trigliserit, total kolesterol, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL) değerlerinin hiçbirisi bulunmadığı için analizden çıkarıldı. Dahil edilen 177 hastadan 72'si kız, 105'i erkek olup, hastaların ortalama yaşı 9,3 ($\pm 8,7$) yıldır. En büyük hastanın yaşı 18 yıl olup, en küçük hastanın 0,3 yıl idi. Hastalar LAL enzim düzeyinin Queen Elizabeth University Hospital Biochemistry Department'ın lizozomal asit lipaz enzimi için referans değerleri 0.37-2.30 nmol/punch/hr baz alınarak analiz yapılmıştır. Araştırmamıza katılan çocuk ve ergenlerden LAL enzim düzeyi düşük bulunanların hiçbirine kolesteril ester depo hastalığı veya Wolman Hastalığı tanısı konulmadı. LAL enzim düzeyi ortalaması 0.756 ($\pm 1,14$) nmol/punch/hr olarak bulundu. 0.37 nmol/punch/hr'den düşük saptanan 13 olguda (%7.3) LAL düzeyleri düşük olarak kabul edildi. Bu noktada belirtmek gerekir ki, referans laboratuvar (Department of Biochemistry, Queen Elizabeth University Hospitals, Glasgow, United Kingdom 0,10 nmol/punch/hr'in altındaki değerleri kolesteril ester depo hastalığı açısından pozitif kabul etmekle birlikte, 0,3 nmol/punch/hr düzeyinin altını klinik ilgileşim var ise Wolman hastalığı ile uyumlu kabul etmektedir.

LAL enzim düzeyinin cinsiyete göre dağılımı değerlendirildiğinde 72 kız hastanın 1'inde, 93 erkek hastanın ise 12'sinde 0.37 nmol/punch/hr'nin altında LAL düzeyi saptanmıştır. Bu bulgular ışığında erkeklerdeki düşük LAL oranı kadınlara göre daha yüksek ve anlamlı bulunmuştur ($p = 0.012$).



Şekil 4.1. Kız (n:1) ve erkek (n:12) hastalardaki düşük LAL (<0.37 nmol/punch/hr) oranı.

Tablo 4.1. Kız ve erkek hastaların LAL enzim düşük ve yüksekliğine göre dağılımı.

			Grup		Toplam
			Normal 0.37-2.30 nmol/punch/hr	Düşük LAL <0.37 nmol/punch/hr	
Cinsiyet	Kız	Sayı	71	1	72
		% Cinsiyet	98,6%	1,4%	100%
		% Grup	43,3%	7,7%	40,7%
	Erkek	Sayı	93	12	105
		% Cinsiyet	88,6%	11,4%	100%
		% Grup	56,7%	92,3%	59,3%
Toplam		Sayı	164	13	177
		% Cinsiyet	92,7%	7,3%	100%
		% Grup	100%	100%	100%

Tek değişkenli analizde p değeri 0,2'den düşük olan değişkenler çok değişkenli analize dahil edilmiştir. Gruplar oluşturularak bağımsız risk faktörleri açısından değerlendirilmek üzere yapılan lojistik regresyon analizinde erkek cinsiyetin düşük LAL görölme göreceli olasılığı oranı, kız çocuklarına göre 8,74 kat daha yüksek ve anlamlı bulunmuştur.

Hepatomegalisi olan hastaların LAL enzim düzeylerine göre dağılımı değerlendirildiğinde, 96 hastanın hepatomegalisi olmayıp LAL enzim düzeyi normal sınırlar içerisinde bulunmuş, hepatomegalisi olmayan 6 hastanın ise enzim düzeyi referans aralığın altında saptanmıştır. Karaciğer büyüklüğü saptanan 75 hastanın ise 68'inde LAL enzim düzeyi normal aralıkta iken 7'sinde düşük LAL saptanmıştır. Bu noktada hepatomegalisi olanlarla olmayanlar arasında LAL değerleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır. (p = 0,254)

Tablo 4.2. Hepatomegalisi olan ve olmayan hastaların LAL enzim düzeyi düşük ve normal olması açısından karşılaştırılması.

			Grup		Toplam
			Normal 0.37-2.30 nmol/punch/hr	Düşük LAL <0.37 nmol/punch/hr	
Hepatomegali	Yok	Sayı	96	6	102
		% Hepatomegali	95,0%	5,0%	100%
		% grup	58%	42%	57,4%
	Var	Sayı	68	7	75
		% Hepatomegali	90,7%	9,3%	100%
		% Grup	42%	58%	42,6%
Toplam		Sayı	164	13	177
		% Hepatomegali	93,2%	6,8%	100%
		% Grup	100%	100%	100%

Splenomegali ve LAL enzim düzeyi açısından karşılaştırılmasında; splenomegalisi olan 53 hastanın 48'inde LAL düzeyi normal sınırlar içerisinde saptanmış olup 5 hastada 0.37 nmol/punch/hr'in altında bulunmuştur. Splenomegalisi olan hastalar ile olmayanlar arasında LAL enzim düzeyi açısından anlamlı fark bulunamamıştır (p= 0,534).

Tablo 4.3. Splenomegalisi olan ve olmayan hastaların LAL enzim düzeyi düşük ve normalliği açısından karşılaştırılması.

			Grup		Toplam
			Normal 0.37-2.30 nmol/punch/hr	Düşük LAL <0.37 nmol/punch/hr	
Splenomegali	Yok	Sayı	116	8	124
		% Splenomegali	93,5%	6,5%	100%
		% Grup	70,7%	61,5%	70,1%
	Var	Sayı	48	5	53
		% Splenomegali	90,6%	9,4%	100%
		% Grup	29,3%	38,5%	29,9%
Toplam		Sayı	164	13	177
		% Splenomegali	92,7%	7,3%	100%
		% Grup	100%	100%	100%

Analize alınan 177 hastanın, 22'sinde karaciğer biyopsi örneklerinde mikrosteatoz saptanmış olup bu grubun 3'ünde LAL enzim düzeyi düşük bulunmuş olup kalan 19 hastada normal olarak saptamıştır. Mikrosteatoz saptanan hastalar ile LAL enzim düzeyi arasında anlamlı bir ilişileşim saptanmamıştır (p= 0.208).

Tablo 4.4. Mikrosteatozu olan ve olmayan hastaların LAL enziminin düşük ve normal düzeyleri açısından karşılaştırılması.

			Grup		Toplam
			Normal 0.37-2.30 nmol/punch/hr	Düşük LAL <0.37 nmol/punch/hr	
Mikrosteatoz	Yok	Sayı	145	10	155
		% Mikrosteatoz	93,5%	6,5%	100%
		% Grup	88,4%	76,9%	87,6%
	Var	Sayı	19	3	22
		% Mikrosteatoz	86,4%	13,6%	100%
		% Grup	11,6%	23,1%	12,4%
Toplam		Sayı	164	13	177
		% Mikrosteatoz	92,7%	7,3%	100%
		% Grup	100%	100%	100%

Çalışma grubu farklı hemogram parametreleri açısından da analiz edilmiş olup, hastaların hemoglobin düzeyleri değerlendirildiğinde 88 anemik hastanın, 83'ünde LAL enzim düzeyleri normal çıkmakla birlikte 4 hastada düşük LAL düzeyi saptanmıştır. Anemisi olmayan 89 hastanın ise 9'unda düşük LAL düzeyi bulunmuş olup, anemisi olanlar ile olmayanlar arasında LAL enzim düzeyi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,162$).

Lökosit sayısı açısından değerlendirildiğinde; 29 lökopenik hastanın 2'sinde, lökositozu olan 54 hastanın yine 2'sinde, normal lökosit sayısına sahip 93 hastanın ise 9'unda düşük LAL seviyesi saptanmış olup, lökosit düzeyleri ile LAL enzim seviyesi arasında anlamlı bir ilişim saptanamamıştır ($p=0,408$).

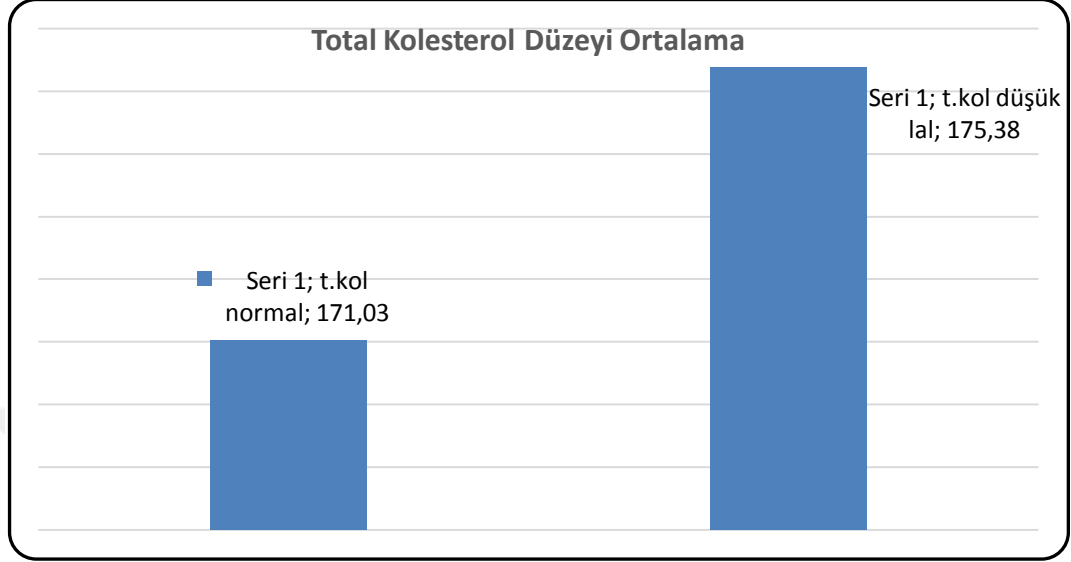
Trombosit sayısı düşük olanlarla normal olanlar LAL enzim düzeyi açısından karşılaştırıldığında, 30 trombositopenik hastanın 2'sinde, normal trombosit sayısına sahip 147 hastanın 11'inde LAL enzim seviyesi düşük saptanmış olup, anlamlı fark görülmemiştir ($p=1$).

Bilirubin düzeyleri dikkate alınarak yapılan değerlendirmede; total bilirubin düzeyi yüksek olan 32 hastanın 3'ünde düşük LAL düzeyi saptanmış, direk bilirubinemi olan 75 hastanın ise 7'sinde düşük LAL seviyesi bulunmuştur. Fakat hiperbilirubinemi olanlar ile olmayan hastalar arasında LAL enzim düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Total bilirubin için $p=0,713$, direk bilirubin için $p=0,462$ 'dir.

Transaminazlar açısından yapılan değerlendirmede ALT'si yüksek 81 hastanın 6'sında, AST yüksek 101 hastadan 6'sında, GGT yüksek 54 hastanın ise 5'inde düşük LAL düzeyi saptanmış olup, transaminazları yüksek olanlarla normal olan hastalar arasında LAL enzim seviyesi açısından anlamlı fark bulunmamıştır. ALT için $p=0,992$, AST için $p=0,381$, GGT için $p=0,759$ olup, anlamlı değildir.

Dikkat çekici bir nokta ise, hasta grubunun kolesterol ile LAL enzim düzeyleri beraber değerlendirildiğinde LAL seviyesi ile total kolesterol ve LDL arasında negatif yönde zayıf bir ilişim saptandı. LDL için $r=-0,195$, $p=0,009$ iken total kolesterol için $r=-0,170$, $p=0,025$ olarak bulunmuş ve anlamlı kabul edilmiştir. Bu noktada yüksek total kolesterol düzeyli hastalarla, normal olanların

LAL değerleri arasında anlamlı fark bulunmuş olup, yüksek olanların LAL değeri düşük bulunmuştur (p= 0,009).

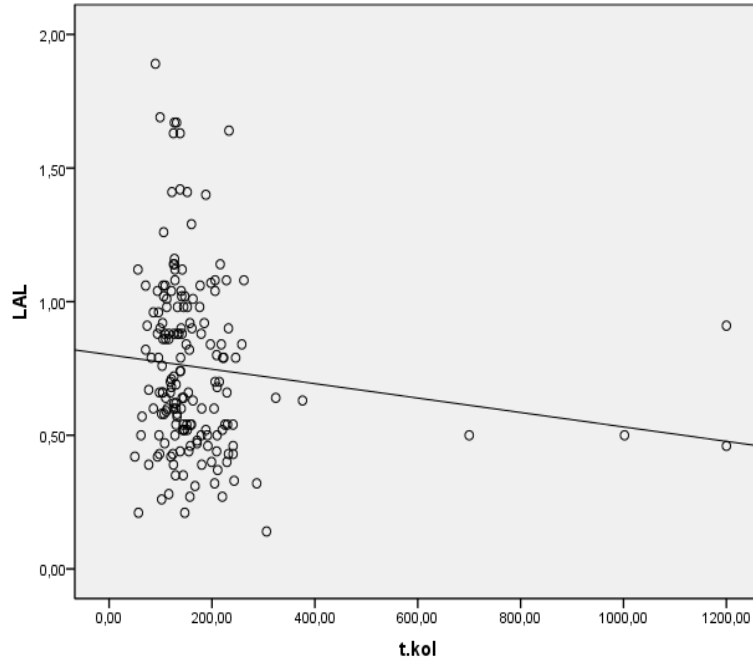


Şekil 4.2. LAL enzimi düşük (n:13) veya normal (n:164) gelen hastalarda total kolesterol düzeyi ortalamaları.

Tablo 4.5. LAL enzim düzeyi ve çalışmaya dahil edilen hematolojik, biyokimyasal, patolojik parametrelerin kategorik olarak analizi.

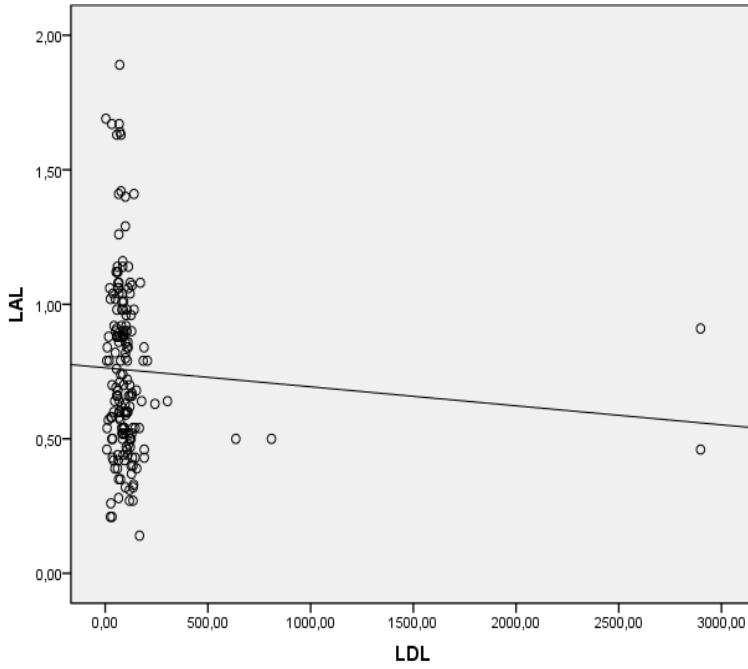
LAL	LAL	YAŞ	HB	WBC	PLT	TB	DB	ALT	GGT	T. KOL	TG	AST	HDL	LDL
Correlation Coefficient	1,000	,034	,053	,032	,054	-,085	-,016	,017	-,135	-,170*	-,027	,030	,050	-,195**
Sig. (2-tailed)	.	,654	,487	,675	,473	,272	,838	,824	,083	,025	,720	,692	,509	,009
N	177	177	176	176	176	170	170	176	165	175	176	175	175	176

HB: hemoglobin, WBC: lökosit, PLT: trombosit, TB: total bilirubin, DB: direk bilirubin, T.KOL: total kolesterol, TG: trigliserit)



Şekil 4.3. LAL enzim düzeyleri ve total kolesterol (T. kol) seviyeleri arasındaki korelasyona ait serpilme.

LDL değeri yüksek olanlarla normal olanların LAL değerleri arasında da anlamlı fark bulunmuş olup, LDL'si yüksek olan hastaların LAL değeri düşük bulunmuştur ($p= 0,025$).



Şekil 4.4. LAL enzim düzeyleri ve LDL seviyeleri arasındaki korelasyona ait serpilme.

Lipid düzeyleri açısından yapılan analizlerde hastalar trigliserit ve HDL düzeyleri açısından da değerlendirilmiş olup, kategorik veya sayısal değer açısından, LAL düzeyleri ile TG düzeyleri normal veya yüksek olan hastalar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p= 0,558$). Buna ek olarak düşük HDL düzeyi olan hastalar ile normal HDL'si olan hastalar arasında LAL enzim düzeyi bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p= 0,339$).



5. TARTIŞMA

LAL-D lizozomal asit lipaz (LIPA) genindeki mutasyona bağılı ortaya çıkan nadir bir otozomal resesif lizozomal depo hastalığıdır. Bu mutasyon kolesterol esterlerinin ve daha az oranda olmak üzere trigliseritlerin azalmış lizozomal asit lipaz aktivitesine bağılı olarak karaciğer, dalak, adrenal bezler, lenf nodları, bağırsak mukozası, damar endoteli ve iskelet kasları gibi birçok dokuda birikimine yol açar (75,76). LAL-D tanısı almış bebeklerin yüzde ellisinde adrenal kalsifikasyon mevcuttur (77,78). Lizozomal asit lipaz serbest kolesterol ve yağ asitleri oluşturmak üzere reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine alınmış kolesterol esterlerinin ve trigliseritlerin hidrolizini katalize eder (84,85). Enzim düzeyi, aktivitesi ve LIPA gen mutasyonundaki farklılıklara bağılı olarak LAL-D değişik klinik fenotiplerle karşımıza gelebilir. Buna ek olarak çevresel etkenler de hastalık progresyonu üzerine etki etmektedir.

2013 yılında Muntoni ve arkadaşları CESD'nın önde gelen mutasyonu olan Exon 8 kırılma mutasyonunu (c.894 G > A, E8SJM) barındıran hastalarda yaptığı bir çalışmada hem erkek hem de kızlarda belirgin lipid yüksekliğine rastlamıştır. Ek olarak erkek hastaların LDL seviyelerinde daha belirgin artış saptanmıştır. Buna ek olarak yine Muntoni ve arkadaşları çocukluk ve ergenlik döneminde ortaya çıkan LAL-D açısından hem kızların hem de erkeklerin eşit sayılarda etkilendiğini vurgulamaktadır (27). Bizim çalışmamızda ise erkek hastalardaki düşük LAL enzim düzeyi oranı kızlara göre daha yüksek ve anlamlı saptanmıştır. Çok değişkenli analize alınan gruplar üzerinden yapılan lojistik regresyon analizinde de erkek çocuklarda düşük LAL görülme göreceli olasılıklar oranı, kız hastalara göre 8.74 kat daha yüksek bulunmuş olup, erkek cinsiyete LAL enzim düşüklüğü açısından bir bağımsız risk faktörü olarak işaret etmektedir. Bu bulgumuz bize göstermektedir ki, LAL-D açısından klinisyende şüphe uyandıran erkek hastalar daha yakından izlenmelidir. Erkek cinsiyetin bu enzim düşüklüğü açısından bir risk faktörü olduğu kanısındayız.

LAL-D semptomları hastalar arasında değişiklik gösterebilir. En sık karşılaşılan klinik bulgular dislipidemi, hepatomegali, artmış serum transaminazlar, fibrozis, siroza ilerleyebilen karaciğer hücre hasarı ve bunlara ek

(daha az sıklıkla) metabolik – kardiyovasküler problemler olarak karşımıza çıkar. Shteyer ve arkadaşlarının ilerlemiş karaciğer hastalığı ile düşük LAL korelasyonunu değerlendirdiği bir çalışmaya dahil edilen LAL enzim düzeyi 0.5 in altında olan 22 hastanın 8'inde (%36) hepatomegali saptanmış iken (27), Burton ve arkadaşlarının yaptığı LAL eksikliği olan çocuk ve erişkinlerdeki karaciğer hastalığı ilerleyişinin değerlendirildiği başka bir çalışmada analize alınan 32 hastanın 27'sinde (%84) hepatomegaliye rastlanmıştır (86). Bernstein ve arkadaşlarının 135 CESD tanısı almış hasta ile yaptığı çalışmada ise %99.3'ünde hepatomegali, %74'ünde ise splenomegali saptanmış (1). Bizim çalışmamızda riskli gruba dahil edip LAL enzim düzeyi çalışılan hasta grubunun 75'inde (%42) hepatomegali olup, bu hastaların 7'sinde düşük LAL değeri saptanmıştır. LAL-D açısından hasta popülasyona ulaşılmaması bu sonucu doğrulmuş, enzim düzeyi düşük olsa da hepatomegaliye yol açmayacak kadar işlevini yerine getirdiği düşünülmektedir.

Polimeni ve arkadaşlarının non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan bireylerde LAL aktivitesi ile dalak boyutlarının ilişkisini değerlendirdiği 425 hasta grubu ile yapılmış bir çalışmada splenomegalisi olan 56 hasta LAL aktivitesi düşük olarak değerlendirilmiş olup, anlamlı bulunmuş (87). Çalışmamıza alınan hasta grubunun 53 (%29)'ünde splenomegali saptanmış olup, bunlarında 5'inde LAL düzeyi düşük bulunmuştur. Yukarıda bahsedilen çalışmada ortalama yaş 56,2 olup, bizim çocukluk yaş grubunda yaptığımız bu çalışmada hastalarımızın hastalığın, özellikle CESD açısından erken evrelerinde olması yahut enzim düzeyinin parsiyel eksikliği olması nedeniyle henüz splenomegali gelişmemiş olduğunu düşünmekteyiz.

LAL-D'nin tanısında karaciğer biyopsisi önerilmese de, biyopsi yapılan hastalarda karşılaşılan mikroveziküler yağlanma, hastalık açısından değerlidir. Karaciğer makroskobik olarak sarı, turuncu, histolojik analiz yapıldığında ise değişen derecelerde perilobuler, portal fibröz ve hepatositlerin lizozomlarında trigliserit ve kolesterol ester birikimine bağlı ağır mikroveziküler yağlanma gözlemlenir (4). Bernstein ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı bir çalışmada 135 CESD tanısı almış hastanın 112'sinin karaciğer biyopsilerinde fibrozis, mikronoduler siroz ve karaciğer yetmezliğine ilerleyici mikroveziküler yağlanma

saptanmış, hepatik hücrelerde kolesterol ester kristalleri veya kalıntılarının patognomonik görünümü izlenmiştir (1). Araştırma grubumuzun 22'sini (%12,4) karaciğer biyopsisinde mikroveziküler yağlanma tesbit edilen hastalar oluşturdu. Bu hasta grubunun 3'ünde düşük LAL düzeyi saptandı. Çalışmanın tümünde düşük LAL saptanan hasta grubuna oranlandığında mikroveziküler yağlanma tespit edilmiş düşük LAL enzim düzeyi saptanan hastalar %23'lük bir oranla karşımıza çıktılar. Normal LAL düzeyi olan hasta grubunun ise %11,6'sını mikroveziküler yağlanması olan hasta grubu oluşturdu. 0,05 hata payı ile 0.80 güç ile yapılan bir çalışmada alınması gereken hasta sayısı 374 olup, daha geniş çalışma grubunda yapılacak çalışmalarda düşük LAL düzeyi ile mikroveziküler yağlanma arasında bir ilişki bulunması muhtemeldir.

LAL-D ile izlenen hasta grubunun da üçte biri ciddi ishal, kusma, karın ağrısı, malabsorbsiyon ve steatore gibi ciddi sindirim sistemi belirtilerinin yanında kolestaz ve büyüme gelişme geriliği bildirilmiştir. Bu bulgulara ek olarak hastaların nutrisyonel açıdan anemik olmaları beklenen bir bulgudur. Shteyer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hasta grupları LAL düşüklüğü ile hematolojik (hemoglobin, hematokrit) ve biyokimyasal (sodyum, ALT, AST, alkalen fosfataz, total bilirubin, direk bilirubin, fosfor, üre, trigliserit, LDL, HDL ve total kolesterol) parametrelerin ilişkisi de araştırılmış olup, anlamlı bir fark bulunamamış (86). Tovoli ve arkadaşlarının yaptığı ve Nisan 2017'de yayımlanan bir çalışmada ise özellikle portal hipertansiyon gelişmiş pansitopenili hastalarda LAL aktivitesinin trombosit ve lökosit sayıları ile korele olduğu gösterilmiştir (88). Bizim çalışmamızdaki 87 anemik hastadan dördünde, trombositopenik olan 30 hastadan ikisinde, lökopenik olan 29 hastanın ikisinde, lökositozu olan 54 hastanın ikisinde, direk bilirubin yüksekliği olan 75 hastanın yedisinde, total bilirubin yüksekliği olan 32 hastanın ise üçünde LAL seviyesi düşük bulunmuş olup, bu parametreler ile LAL enzim düzeyi arasında pozitif veya negatif anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Ayrıca bu değerlerin düşük olduğu veya yüksek olduğu durumlarda ölçülen LAL düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Tovoli ve arkadaşlarının çalışması dışında bu bulgular literatürle uyumludur.

Bernstein ve arkadaşlarının yayınladığı kolesterol ester depo hastalığı tanısı almış 135 hastalık bir çalışmanın derlemesinde, 78 hastada AST, 73 hastada ALT

düzeyi yüksek bulunmuş (1). Baratta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada LAL aktivitesi ortalamanın altında bulunan non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı tanısı almış erişkin hastalarda ALT, AST ve GGT yi anlamlı derecede artmış bulmuş (89). Bizim çalışma analizimizde transaminazlar açısından değerlendirme yapıldığında ALT'si yüksek 81 hastanın altısında, AST'si yüksek 101 hastanın altısında, GGT'si yüksek 54 hastanın ise beşinde LAL enzim seviyesi düşük bulunmuş. Fakat yüksek transaminaz (ALT, AST, GGT) düzeyleri olan riskli hastalar ile normal transaminaz düzeyi olan hastalar arasında LAL düzeyi açısından anlamlı fark bulunamamıştır. LAL-D eksikliğinin sık görülen bulgularından biri olan transaminaz yüksekliğinin bizim çalışmamızda saptanamamasının sebebi analize aldığımız riskli grubun hasta sayısı sınırlı ve bu çalışmanın tek merkezli gerçekleştirilmiş olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

LAL-D olan hastalar düşük yüksek dansiteli lipoprotein, artmış trigliseritler, artmış serum total kolesterolü, yüksek LDL-C şeklinde dislipidemi ile karşımıza çıkarlar (17). Total kolesterol ve trigliserit düzeyinde artış, LDL-C ve VLDL-C gibi ApoB içeren lipoproteinlerin plazmaya geçişine bağlıdır (36). Pullinger ve arkadaşlarının lizozomal asit lipaz eksikliği olan hastaların metabolik profilini tanımlamaya yönelik yaptığı bir çalışmada genetik tanı almış 4 LAL-D hasta grubunun total kolesterol ortalama düzeyi 388 mg/dl bulunmuştur (90). Bernstein'in 135 hastalık kolesteril ester depo hastalığı derlemesinde ise 110 hastada artmış total kolesterol seviyelerine rastlanmış (1). Bizim çalışmamızda da total kolesterol düzeyi ile LAL enzim seviyesi arasında negatif yönde zayıf ama anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. ($p=0.025$, $r:-0.170$). Ayrıca düşük LAL (<0.37 nmol/punch/hr) saptanan hastalardaki total kolesterol ortalaması 175 mg/dl iken, riskli gruba dahil edilip normal LAL düzeyi saptanan hastalarda bu ortalama 171 mg/dl olarak saptandı. Total kolesterol düzeyi yüksek olanlarla normal olanların LAL değerleri arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuş olup literatürdeki bilgilerle paralellik göstermektedir.

LAL-D olan çocuklar genelde tip2a veya tip2b hiperlipidemiye sahiptirler. Artmış total kolesterol, artmış LDL kolesterol, artmış ApoB ve azalmış HDL kolesterol seviyeleri ile karşımıza gelirler (1,56). Pullinger ve arkadaşlarının

tamamladığı bir çalışmada LAL-D olan hastaların LDL ortalaması 320 mg/dl bulunmuş. Baratta ve arkadaşlarının non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı tanısı almış hastalarda düşük LAL aktivitesini araştırdığı çalışmada ise, ortalamanın altında LAL aktivitesi olan hastalarda LDL seviyesini anlamlı bir şekilde artmış olarak bulmuş (89). Bernstein ve arkadaşlarının çalışmasındaki 135 hastadan lipid düzeyleri rapor edilen hastaların 43'ünde (%79) artmış LDL kolesterol seviyeleri (>200 mg/dl) saptanmış. Bizim çalışmamızda ise, literatür bilgileri ile uyumlu olarak, LDL kolesterol değerleri ile LAL enzim düzeyleri arasında negatif yönde zayıf ama anlamlı bir korelasyon saptandı ($p= 0.009$, $r= -0.195$) Ayrıca LDL değeri yüksek olanlarla normal olanların LAL değerleri arasında anlamlı fark bulunmuş, yüksek serum LDL değerleri olan hastalarda anlamlı derecede düşük LAL seviyeleri saptanmıştır.

LAL-D non alkolik karaciğer yağlanması ayırıcı tanıları arasında yer almaktadır. LAL enzim eksikliği olan hastalar saptanırken klinisyenin şüphesi ön plandadır. Fizik muayenenin yanı sıra hastaların laboratuvar bulguları hekimler açısından yol gösterici olabilmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda saptadığımız üzere LAL-D açısından riskli grup gözden geçirilirken erkek çocuklar özellikler izlenmeli, artmış plazma total kolesterol ve LDL seviyeleri olanlar gözden kaçırılmamalıdır. Bu noktada bu farkındalık hastaların saptanmasına ve tedaviye ulaşmasına kolaylık sağlayacaktır. Bunun yanında çalışmamızda bahsettiğimiz üzere LAL enzimi düşük saptanan hastaların hiçbirinde CESD veya Wolman Hastalığı tanısı konulmamıştır. Fakat bu hastaların LIPA gen mutasyonu açısından genotipleri bilinmemektedir. Enzim düzeyleri referans aralığının altında olan fakat eksiklik sayılamayacak enzim aktivitesi gösteren hastaların genetik açıdan taranmasının, hastalığın daha iyi anlaşılmasına, bu “sınırdaki düşük” olarak tanımlanan hasta grubuna klinik sınıflama, tedavi gereksinimlerinin karşılanması ve prognoz açısından daha net yaklaşılmasını sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izleme alınan 0 - 18 yaş arası çocuk ve ergenleri kapsamaktadır. Non obez, yağlı karaciğer hastalığı, hipertransaminazemi, dislipidemi (LDL yüksekliği, HDL düşüklüğü) nedeniyle incelenip izlenen 155 çocuk ve ergen, 15 yıllık sürede karaciğer biyopsisinde mikroveziküler yağlanma saptanmış 0-18 yaş arası çocuk ve ergenlerden çalışmaya katılmayı kabul eden 22, toplam 177 çocuk ve ergende kurutulmuş kan örneğinde Glasgow Kraliçe Elizabeth Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Bölümünde lizozomal asit lipaz (LAL) enzim düzeyi çalışıldı.

177 kan örneğinin hiçbirinde kolesterol ester depo hastalığı veya Wolman Hastalığı tanısı koyduracak derecede bir lizozomal asit lipaz eksikliği (LAL-D) saptanmadı. 177 kan örneğinin 13'ünde (%7.3) LAL-D saptandı. Laboratuvarın tanımladığı referans değerler olan 0.37-2.30 nmol/punch/hr aralığının altında kalan LAL düzeyi bulunan bu olgular ile referans aralığında bulunan 164 olgunun verileri analiz edildi.

LAL-D erkeklerde kızlardan anlamlı daha düşük bulundu ($p=0.012$).

LAL düzeyi ile total kolesterol ve LDL düzeyleri arasında zayıf ama anlamlı bir negatif bağıntı bulundu ($r:-0.170$, $p=0.025$ ve $r:-0.195$, $p=0.009$).

LAL-D saptanan enzim düzeyi “sınırdan düşük” olguların genetik incelemesi, bu grubun daha iyi tanınmasına ve incelenmesine olanak sağlayacaktır.

7. ÖZET

Riskli Pediatrik Hastalarda Kolesterol Ester Depo Hastalığı Taraması

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, ayırıcı tanısında birçok hastalığın yer aldığı karaciğer yetmezliğine kadar ilerleyebilen ciddi ve yaygın bir metabolik sendromdur. Dislipideminin çocuklarda prevalansı belirgin olarak artmakla beraber, yağlı karaciğer hastalığı çocuklarda en yaygın görülen karaciğer hastalığı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına başvurmuş risk grubundaki hastaları tarayarak, CESD tanısı alanların saptanması, tedaviye ulaşmasını sağlamaktır.

Hastanemiz Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına başvuran non obez çocuk ve ergen hastalardan hipertransaminazemi, dislipidemi nedeniyle incelenip izlenen olgulara ek olarak, son onbeş yıl içerisinde hastanemizde karaciğer biyopsisi yapılmış ve mikroveziküler yağlanma saptanmış hastalardan Glasgow Kraliçe Elizabeth Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Bölümünde LAL enzim düzeyi çalışıldı.

13 hastada LAL enzim düzeyi referans değerler altında geldi. Hastaların hiçbirinde CESD veya Wolman Hastalığı tanısı konulmadı. Hastaların LAL düzeyleri, cinsiyet, hemoglobin, lökosit, trombosit, alanin amino transferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), gama glutamil transferaz (GGT), direk bilirubin, total bilirubin, trigliserit, total kolesterol, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL), hepatomegali, splenomegali, mikroveziküler yağlanma parametreleri göz önüne alınarak analiz edildi.

Erkeklerdeki düşük LAL oranı kadınlara göre daha yüksek ve anlamlı bulundu ($p= 0.012$). Erkek çocuklarda düşük LAL görülme göreceli olasılıklar oranı kız çocuklarına göre 8.74 kat daha yüksek bulundu. Erkek cinsiyetin LAL-D için bağımsız bir risk faktörü olabileceği saptandı.

LAL değeri ile LDL ve total kolesterol düzeyleri arasında negatif yönde zayıf ama anlamlı korelasyon saptandı (sırasıyla $p=0.009$, $r: -0.195$ $p=0.025$, $r:-0.170$).

Sonuç olarak, LAL-D açısından artmış plazma total kolesterol ve/veya LDL seviyeleri olan erkek çocukların gözden kaçırılmamalıdır. CESD veya Wolman tanısı almamakla birlikte LAL-D saptanmış olguların genetik araştırması ve klinik izlemi yeni bir araştırmaya konu olmalıdır.

Anahtar Kelimeler: LAL-D, CESD, Mikroveziküler yağlanma, LDL, Total kolesterol



8. ABSTRACT

Screening of Cholesteryl Ester Storage Disease in Risky Pediatric Patients

Nonalcoholic fatty liver disease which has a number of disorders in differential diagnosis is a common and severe metabolic syndrome that can progress to liver failure. With the increasing prevalence of dyslipidemia, fatty liver disease has become the most common liver disease in children. This research aims to determine cholesteryl ester storage disease among children in risk groups admitted to Akdeniz University Department of Pediatrics, then supply a treatment who diagnosed with cholesteryl ester storage disease.

Dried blood samples were sent to Queen Elizabeth University Hospital Department of Biochemistry in Glasgow, United Kingdom for studying LAL enzyme activity from non-obese children and adolescents who have been investigated for hypertransaminasemia, dyslipidemia in our department, beside children with microvesicular steatosis in liver biopsy which performed in our hospital between 2002 and 2017.

A 13 patients were determined with low serum LAL enzyme level. None of these patients has been diagnosed with cholesteryl ester storage disease or Wolman Disease. The LAL levels of patients analysed with considering gender, hemoglobin, white blood cell count, platelet count, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamil transferase (GGT), direct bilirubin, total bilirubin, triglyceride, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), hepatomegaly, splenomegaly, microvesicular steatosis data.

Low LAL enzyme rate is determined significantly higher in boys compared to girls ($p = 0.012$). A low lysosomal acid lipase odds ratio in boys is found 8.74 times higher than girls. It is determined that male gender is an independent risk factor for LAL-D.

We determined a weak but significant negative correlation between LAL enzyme levels with LDL and total cholesterol levels (consecutively $p = 0.009$, $r = -0.195$ $p=0.025$, $r:-0.170$).

As a result; the boys who has a high plasma total cholesterol and/or high LDL levels should be awared of the aspect of LAL-D. A genetic investigation and clinical observation of the LAL-D patients should be subject to a new research.

Key Words: LAL-D, CESD, Microvesiculer steatosis, LDL, Total cholesterol



9. KAYNAKLAR

1. Bernstein DL, Hulkova H, Bialer MG, Desnick RJ. Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. *J Hepatol* 2013; 58: 1230-43.
2. Elleder M, Chlumska A, Hyanek J, Poupetova H, Ledvinova J, Maas S, et al. Subclinical course of cholesteryl ester storage disease in an adult with hypercholesterolemia, accelerated atherosclerosis, and liver cancer. *J Hepatol* 2000; 32: 528-34.
3. Elleder M, Chlumska A, Ledvinova J, Poupetova H. 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* 2000; 436: 82-7.
4. Hulkova H, Elleder M. Distinctive histopathological features that support a diagnosis of cholesterol ester storage disease in liver biopsy specimens. *Histopathology* 2012; 60: 1107-13.
5. Gasche C, Aslanidis C, Kain R, Exner M, Helbich T, Dejaco C, et al. A novel variant of lysosomal acid lipase in cholesteryl ester storage disease associated with mild phenotype and improvement on lovastatin. *J Hepatol* 1997; 27: 744-50.
6. Chatrath H, Keilin S, Attar BM. Cholesterol ester storage disease (CESD) diagnosed in an asymptomatic adult. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 168-73.
7. Abramov A, Schorr S, Wolman M. Generalized xanthomatosis with calcified adrenals. *AMA J Dis Child* 1956; 91: 282-6.
8. Fredrickson DS. Newly recognized disorders of cholesterol metabolism. *Ann Intern Med* 1963; 58: 718.
9. Burke JA, Schubert WK. Deficient activity of hepatic acid lipase in cholesterol ester storage disease. *Science* 1972; 176: 309-10.

10. Aslanidis C, Ries S, Fehringer P, Buchler C, Klima H, Schmitz G. Genetic and biochemical evidence that CESD and Wolman disease are distinguished by residual lysosomal acid lipase activity. *Genomics* 1996; 33: 85-93.
11. Pagani F, Pariyarath R, Garcia R, Stuani C, Burlina AB, Ruotolo G, et al. New lysosomal acid lipase gene mutants explain the phenotype of Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. *J Lipid Res* 1998; 39: 1382-8.
12. Patrick AD, Lake BD. Deficiency of an acid lipase in Wolman's disease. *Nature* 1969; 222: 1067-8.
13. Stein J, Garty BZ, Dror Y, Fenig E, Zeigler M, Yaniv I. Successful treatment of Wolman disease by unrelated umbilical cord blood transplantation. *Eur J Pediatr* 2007; 166: 663-6.
14. Boldrini R, Devito R, Biselli R, Filocamo M, Bosman C. Wolman disease and cholesteryl ester storage disease diagnosed by histological and ultrastructural examination of intestinal and liver biopsy. *Pathol Res Pract* 2004; 200: 231-40.
15. Grabowski GA, Charnas L, Du H. Lysosomal acid lipase deficiencies: the Wolman disease/cholesteryl ester storage disease spectrum. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, editors. *Scriver's online metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw Hill; [accessed 28.10.13] http://www.ommbid.com/OMMBID/the_online_metabolic_and_molecular_bases_of_inherited_disease/b/abstract/part16/ch142.
16. Jones SA, Bernstein DL, Bialer MG, Dhawan A, Hendriksz JC, Whitley CB, et al. Severe and rapid disease course in the natural history of infants with lysosomal acid lipase deficiency. *Mol Genet Metab* 2014; 111: S57-8.
17. Fouchier SW, Defesche JC. Lysosomal acid lipase A and the hypercholesterolaemic phenotype. *Curr Opin Lipidol* 2013; 24: 332-8.
18. Zhang B, Porto AF. Cholesteryl ester storage disease: protean presentations of lysosomal acid lipase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 56: 682-5.

19. Reynolds T. Cholesteryl ester storage disease: a rare and possibly treatable cause of premature vascular disease and cirrhosis. *J Clin Pathol* 2013; 66: 918-23.
20. Saito S, Ohno K, Suzuki T, Sakuraba H. Structural bases of Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. *Mol Genet Metab* 2012; 105: 244-8.
21. Muntoni S, Wiebusch H, Jansen-Rust M, Rust S, Seedorf U, Schulte H, et al. Prevalence of cholesteryl ester storage disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1866-8.
22. Lohse P, Maas S, Elleder M, Kirk JM, Besley GT, Seidel D. Compound heterozygosity for a Wolman mutation is frequent among patients with cholesteryl ester storage disease. *J Lipid Res* 2000; 41: 23-31.
23. Scott SA, Liu B, Nazarenko I, Martis S, Kozlitina J, Yang Y, et al. Frequency of the cholesteryl ester storage disease common LIPA E8SJM mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups. *Hepatology* 2013; 58: 958-65.
24. Stitzel NO, Fouchier SW, Sjouke B, Peloso GM, Moscoso AM, Auer PL, et al. Exome sequencing and directed clinical phenotyping diagnose cholesterol ester storage disease presenting as autosomal recessive hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 2909-14.
25. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *J Am Med Assoc* 1999; 281: 249-54.
26. Valles-Ayoub Y, Esfandiarifard S, No D, Sinai P, Khokher Z, Kohan M, et al. Wolman disease (LIPA p.G87V) genotype frequency in people of Iranian-Jewish ancestry. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011; 15: 395-8.
27. Muntoni S, Wiebusch H, Jansen-Rust M, Rust S, Schulte H, Berger K, et al. Heterozygosity for lysosomal acid lipase E8SJM mutation and serum lipid concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013; 23: 732-6.
28. Goldstein JL, Dana SE, Faust JR, Beaudet AL, Brown MS. 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* 1975; 250: 8487-95.

29. Jeon TI, Osborne TF. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 65-72.
30. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109: 1125-31.
31. Cummings MH, Watts GF. Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in cholesteryl ester storage disease. *Clin Chem* 1995; 41: 111-4.
32. Ginsberg HN, Le NA, Short MP, Ramakrishnan R, Desnick RJ. Suppression of apolipoprotein B production during treatment of cholesteryl ester storage disease with lovastatin. Implications for regulation of apolipoprotein B synthesis. *J Clin Invest* 1987; 80: 1692-7.
33. Quinn AG, Burton B, Deegan P, Di Rocco M, Enns GM, Guardamagna O, et al. Sustained elevations in LDL cholesterol and serum transaminases from early childhood are common in lysosomal acid lipase deficiency. *Mol Genet Metab* 2014; 111: S89.
34. Garver WS, Jelinek D, Meaney FJ, Flynn J, Pettit KM, Shepherd G, et al. The National Niemann_Pick type C1 disease database: correlation of lipid profiles, mutations, and biochemical phenotypes. *J Lipid Res* 2010; 51: 406-15.
35. Ramirez CM, Liu B, Aqul A, Taylor AM, Repa JJ, Turley SD, et al. Quantitative role of LAL, NPC2, and NPC1 in lysosomal cholesterol processing defined by genetic and pharmacological manipulations. *J Lipid Res* 2011; 52: 688-98.
36. Levy R, Ostlund Jr RE, Schonfeld G, Wong P, Semenkovich CF. Cholesteryl ester storage disease: complex molecular effects of chronic lovastatin therapy. *J Lipid Res* 1992; 33: 1005-15.

37. Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev* 2005; 85: 1343-72.
38. Boadu E, Bilbey NJ, Francis GA. Cellular cholesterol substrate pools for adenosine-triphosphate cassette transporter A1-dependent high-density lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 270-6.
39. Bowden KL, Bilbey NJ, Bilawchuk LM, Boadu E, Sidhu R, Ory DS, et al. Lysosomal acid lipase deficiency impairs regulation of ABCA1 gene and formation of high density lipoproteins in cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem* 2011; 286: 30624-35.
40. Beaudet AL, Ferry GD, Nichols Jr BL, Rosenberg HS. Cholesterol ester storage disease: clinical, biochemical, and pathological studies. *J Pediatr* 1977; 90: 910-4.
41. Eto Y, Kitagawa T. Wolman's disease with hypolipoproteinemia and acanthocytosis: clinical and biochemical observations. *J Pediatr* 1970; 77: 862-7.
42. vom Dahl S, Harzer K, Rolfs A, Albrecht B, Niederau C, Vogt C, et al. Hepatosplenomegalic lipidosis: what unless Gaucher? Adult cholesteryl ester storage disease (CESD) with anemia, mesenteric lipodystrophy, increased plasma chitotriosidase activity and a homozygous lysosomal acid lipase -1 exon 8 splice junction mutation. *J Hepatol* 1999; 31: 741-6.
43. Drebber U, Andersen M, Kasper HU, Lohse P, Stolte M, Dienes HP. Severe chronic diarrhea and weight loss in cholesteryl ester storage disease: a case report. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2364-6.
44. Haller W, Sharif K, Millar AJ, Brown RM, McKiernan PJ. Gallbladder dysfunction in cholesterol ester storage disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 50: 555-8.
45. Schaub J, Janka GE, Christomanou H, Sandhoff K, Permanetter W, Hubner G, et al. Wolman's disease: clinical, biochemical and ultrastructural studies

- in an unusual case without striking adrenal calcification. *Eur J Pediatr* 1980; 135: 45-53.
46. Wallis K, Gross M, Kohn R, Zaidman J. A case of Wolman's disease. *Helv Paediatr Acta* 1971; 26: 98-111.
 47. Kyriakides EC, Filippone N, Paul B, Grattan W, Balint JA. Lipid studies in Wolman's disease. *Pediatrics* 1970; 46: 431-6.
 48. Marshall WC, Ockenden BG, Fosbrooke AS, Cumings JN. Wolman's disease. A rare lipidosis with adrenal calcification. *Arch Dis Child* 1969; 44: 331-41.
 49. Kostner GM, Hadorn B, Roscher A, Zechner R. Plasma lipids and lipoproteins of a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Inherit Metab Dis* 1985; 8: 9-12.
 50. Decarlis S, Agostoni C, Ferrante F, Scarlino S, Riva E, Giovannini M. Combined hyperlipidaemia as a presenting sign of cholesteryl ester storage disease. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32(Suppl. 1): 11-3.
 51. Gaddi A, Cicero AF, Odoo FO, Poli AA, Paoletti R. Practical guidelines for familial combined hyperlipidemia diagnosis: an up-date. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3: 877-86.
 52. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, et al. ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: the task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2011; 32: 1769-818.
 53. Cortner JA, Coates PM, Gallagher PR. Prevalence and expression of familial combined hyperlipidemia in childhood. *J Pediatr* 1990; 116: 514-9.
 54. Guardamagna O, Restagno G, Rolfo E, Pederiva C, Martini S, Abello F, et al. The type of LDLR gene mutation predicts cardiovascular risk in children with familial hypercholesterolemia. *J Pediatr* 2009; 155: 199-204.

55. van der Graaf A, Avis HJ, Kusters DM, Vissers MN, Hutten BA, Defesche JC, et al. Molecular basis of autosomal dominant hypercholesterolemia: assessment in a large cohort of hypercholesterolemic children. *Circulation* 2011; 123: 1167-73.
56. Guardamagna O, Abello F, Anfossi G, Pirro M. Lipoprotein(a) and family history of cardiovascular disease in children with familial dyslipidemias. *J Pediatr* 2011; 159: 314-9.
57. Pisciotta L, Fresa R, Bellocchio A, Pino E, Guido V, Cantafora A, et al. Cholesteryl Ester Storage Disease (CESD) due to novel mutations in the LIPA gene. *Mol Genet Metab* 2009; 97: 143-8.
58. The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2011; 43: 339-44.
59. The IBC 50K CAD Consortium. Large-scale gene-centric analysis identifies novel variants for coronary artery disease. *PLoS Genet* 2011; 7: 1002260.
60. Wild PS, Zeller T, Schillert A, Szymczak S, Sinning CR, Deiseroth A, et al. A genome-wide association study identifies LIPA as a susceptibility gene for coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2011; 4: 403-12.
61. Wolman M, Sterk VV, Gatt S, Frenkel M. Primary familial xanthomatosis with involvement and calcification of the adrenals. Report of two more cases in siblings of a previously described infant. *Pediatrics* 1961; 28: 742-57.
62. Freudenberg F, Bufler P, Ensenauer R, Lohse P, Koletzko S. Cholesteryl ester storage disease: an easily missed diagnosis in oligosymptomatic children. *Z Gastroenterol* 2013; 51: 1184-7.
63. Miltiados G, Cariolou MA, Elisaf M. HDL cholesterol levels in patients with molecularly defined familial hypercholesterolemia. *Ann Clin Lab Sci* 2002; 32: 50-4.

64. Iverson SA, Cairns SR, Ward CP, Fensom AH. Asymptomatic cholesteryl ester storage disease in an adult controlled with simvastatin. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 433-6.
65. Guardamagna O, Cagliero P, Abello F. Management of inherited atherogenic dyslipidemias in children. *Ther Apher Dial* 2013; 17: 150-61.
66. Hamilton J, Jones I, Srivastava R, Galloway P. A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1207-10.
67. Mukherjee M. Human digestive and metabolic lipases a brief review. *J Mol Catal B Enzym* 2003; 22: 369-76.
68. Rosenbaum AI, Cosner CC, Mariani CJ, Maxfield FR, Wiest O, Helquist P. Thiadiazole carbamates: potent inhibitors of lysosomal acid lipase and potential Niemann-Pick type C disease therapeutics. *J Med Chem* 2010; 53: 5281-9.
69. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55: 2005-23.
70. Vajro P, Lenta S, Socha P, Dhawan A, McKiernan P, Baumann U, et al. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: position paper of the ESPGHAN Hepatology Committee. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54: 700-13.
71. Thelwall PE, Smith FE, Leavitt MC, Canty D, Hu W, Hollingsworth KG, et al. Hepatic cholesteryl ester accumulation in lysosomal acid lipase deficiency: non-invasive identification and treatment monitoring by magnetic resonance. *J Hepatol* 2013; 59: 543-9.
72. Reiner Z. Statins in the primary prevention of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 2013; 10: 453-64.

73. Tarantino MD, McNamara DJ, Granstrom P, Ellefson RD, Unger EC, Udall Jr JN. Lovastatin therapy for cholesterol ester storage disease in two sisters. *J Pediatr* 1991; 118: 131-5.
74. Tadiboyina VT, Liu DM, Miskie BA, Wang J, Hegele RA. Treatment of dyslipidemia with lovastatin and ezetimibe in an adolescent with cholesterol ester storage disease. *Lipids Health Dis* 2005; 4: 26.
75. Yokoyama S, McCoy E. Long-term treatment of a homozygous cholesteryl ester storage disease with combined cholestyramine and lovastatin. *J Inherit Metab Dis* 1992; 15: 291-2.
76. McCoy E, Yokoyama S. Treatment of cholesteryl ester storage disease with combined cholestyramine and lovastatin. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 623: 453-4.
77. Leone L, Ippoliti PF, Antonicelli R. Use of simvastatin plus cholestyramine in the treatment of lysosomal acid lipase deficiency. *J Pediatr* 1991; 119: 1008-9.
78. Abello F, Guardamagna O, Baracco V, Bonardi R. The treatment of cholesteryl storage disease (CESD) by ezetimibe monotherapy. *Atheroscler Suppl* 2010; 11: 28.
79. Xu M, Liu K, Swaroop M, Porter FD, Sidhu R, Firnkes S, et al. d-Tocopherol reduces lipid accumulation in Niemann-Pick type C1 and Wolman cholesterol storage disorders. *J Biol Chem* 2012; 287: 39349-60.
80. Tolar J, Petryk A, Khan K, Bjoraker KJ, Jessurun J, Dolan M, et al. Long-term metabolic, endocrine, and neuropsychological outcome of hematopoietic cell transplantation for Wolman disease. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 21-7.
81. Gramatges MM, Dvorak CC, Regula DP, Enns GM, Weinberg K, Agarwal R. Pathological evidence of Wolman's disease following hematopoietic stem cell transplantation despite correction of lysosomal acid lipase activity. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44: 449-50.

82. Yanir A, Allatif MA, Weintraub M, Stepensky P. Unfavorable outcome of hematopoietic stem cell transplantation in two siblings with Wolman disease due to graft failure and hepatic complications. *Mol Genet Metab* 2013; 109: 224-6.
83. Ambler GK, Hoare M, Brais R, Shaw A, Butler A, Flynn P, et al. Orthotopic liver transplantation in an adult with cholesterol ester storage disease. *JIMD Rep* 2013; 8: 41-6.
84. Ferry GD, Whisennand HH, Finegold MJ, Alpert E, Glombicki A. Liver transplantation for cholesteryl ester storage disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12: 376-8.
85. Grabowski GA. Therapy for lysosomal acid lipase deficiency: replacing a missing link. *Hepatology* 2013; 58: 850-2.
86. Shteyer E. Low Serum Lysosomal Acid Lipase Activity Correlates with Advanced Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2016; 17(3): 312.
87. Polimeni L. Spleen dimensions are inversely associated with lysosomal acid lipase activity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Intern Emerg Med* 2017. doi: 10.1007/s11739-017-1746-1
88. Tovoli F. A Relative Deficiency of Lysosomal Acid Lipase Activity Characterizes Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(6). pii: E1134. doi: 10.3390/ijms18061134
89. Baratta F. Reduced Lysosomal Acid Lipase Activity in Adult Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *EBioMedicine* 2015; 2(7): 750-4.
90. Pullinger CR. Identification and metabolic profiling of patients with lysosomal acid lipase deficiency. *J Clin Lipidol* 2015; 9(5): 716-26.
91. Frampton JE. Sebelipase Alfa: A Review in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *Am J Cardiovasc Drugs* 2016; 16(6): 461-8.