

# Deficit lyzozomální kyselé lipázy – diferenciální diagnostika a možnosti léčby v roce 2022

## Lysosomal acid lipase deficiency – differential diagnosis and treatment options in 2022

Zuzana Urbanová<sup>1</sup>, Věra Malinová<sup>2</sup>, Tomáš Freiburger<sup>4,5</sup>, Lukáš Tichý<sup>3</sup>, Michal Vrablík<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Česká společnost pro aterosklerózu

<sup>2</sup>Centrum preventivní kardiologie, III. interní klinika a Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze

<sup>3</sup>Centrum molekulární biologie a genetiky, Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

<sup>4</sup>Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie Brno

<sup>5</sup>Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN U sv. Anny v Brně

✉ doc. MUDr. Zuzana Urbanová, CSc. | urbanová.zuzana@post.cz | www.athero.cz

Doručeno do redakce | Doručené do redakcie | Received 2. 1. 2022

Přijato po recenzi | Prijaté po recenzii | Accepted 20. 1. 2022

### Abstrakt

Deficit lyzozomální kyselé lipázy (LAL-D) je vzácné autosomálně recesivní střídatavé onemocnění, způsobené mutací v genu *LIPA*. Výskyt je celosvětově odhadován na 1 : 130 000 až 1 : 300 000 živě narozených dětí. Vede ke střídatání cholesteryl esterů a triglyceridů zejména v játrech a k mikrovezikulární steatóze jater v bioptickém nálezu. Forma kojenecká (Wolmanova choroba) je nejprogresivnější, děti vzácně přežívají 6 měsíců a umírají na multiorganové selhání. U starších dětí a dospělých se projevuje dyslipidemií, hepatomegalií, zvýšením hodnot jaterních testů (CESD – Cholesteryl Ester Storage Disease). V laboratorních nálezech je patrné zvýšení celkového a LDL-cholesterolu a snížení HDL-cholesterolu. Kardiovaskulární komplikace se mohou vyskytovat již v mladém věku a u mnoha pacientů dochází k progresi jaterní fibrózy, k cirhóze a jaternímu selhání. Lipidogram je velmi podobný jako u familiární hypercholesterolemie a předpokládá se, že toto onemocnění je v klinické praxi velmi nedostatečně diagnostikováno. Tento článek upozorňuje na tuto problematiku a na současné možnosti diagnostiky a léčby s ohledem na vývoj enzymové substituční terapie enzymem sebelipázou alfa – rekombinantní humánní lyzozomální kyselou lipázou a je aktualizací článku z roku 2019 s doplněním podrobnějších informací o možnostech genetického vyšetření.

**Klíčová slova:** deficit lyzozomální kyselé lipázy – dyslipidemie – hepatomegalie – cholesteryl ester storage disease – Wolmanova choroba

### Abstract

Lysosomal acid lipase deficiency (LAL-D) is a rare autosomal recessive lysosomal storage disease caused by deleterious mutations in the *LIPA* gene. Occurrence is worldwide estimated to be 1 : 130 000 to 1 : 300 000 live births. Patients presenting in infancy have the most rapidly progressive disease, developing signs and symptoms in the first weeks of life and rarely surviving beyond 6 months of age (Wolman disease). Children and adults typically present with some combination of dyslipidemia, hepatomegaly, elevated transaminases, and microvesicular hepatosteatois on biopsy – cholesteryl ester storage disease (CESD). Liver damage with progression to fibrosis, cirrhosis and liver failure occurs in a large proportion of patients. Elevated low-density lipoprotein cholesterol levels and decreased high-density lipoprotein cholesterol levels are common features, and cardiovascular disease may manifest as early as childhood. The lipid profile is very similar as we can see in familial hypercholesterolemia, so it is not surprising that LAL-D is under-recognized in clinical practice. This article provides practical guidance to lipidologists, on how to recognize individuals with this disease and, current management options are reviewed in light of the development of enzyme replacement therapy with sebelipase alfa, a recombinant human lysosomal acid lipase enzyme and is an update of a 2019 article with the addition of more detailed information on genetic testing options.

**Key words:** cholesteryl ester storage disease – dyslipidemia – hepatomegaly – lysosomal acid lipase deficiency – Wolman disease

## Základní informace

Defekt lyzozomální kyselá lipázy (Lysosomal Acid Lipase Deficiency – LAL-D) je vzácné autosomálně recesivní lyzozomální stádatavé onemocnění charakterizované progresivní akumulací cholesteryl esterů a triglyceridů v játrech, slezině a ostatních orgánech. Typickým nálezem je dyslipidemie a dochází k časnému vývoji aterosklerózy. Odhadovaný výskyt v ČR 1 : 350 000, ale od roku 1975 bylo u nás diagnostikováno jen 24 pacientů s Cholesteryl Ester Storage Disease (CESD) a 1 pacient s Wolmanovou chorobou [1,2,3,4].

Lze předpokládat, že je toto onemocnění stále nedostačtěně diagnostikováno a že je mnoho pacientů sledováno pod diagnózou zejména familiární hypercholesterolemie (FH), protože laboratorní nálezy jsou podobné. Ovšem typickým klinickým projevem LAL-D je hepatomegalie s progresivním postižením jater i postižením dalších orgánů (slezina, lymfatické uzliny a nadledviny), což není pro diagnózu FH typické a mělo být impulzem pro důkladnější vyšetření.

V minulosti se jednalo o aktivně neléčitelné onemocnění. K dispozici byla pouze symptomatická léčba, která příliš nezlepšovala prognózu pacientů, a ti umírali v mladém věku na progredující hepatopatii a komplikace aterosklerózy. V současnosti je k dispozici jednoduchá a dostupná diagnostika v poslední době rozšířená o možnost genetického vyšetření v rámci molekulárně genetické diagnostiky hypercholesterolemie. Od roku 2015, kdy byla schválena FDA (U.S. Food and Drug Administration) a EMA (European Medicines Agency), je k dispozici i specifická enzymová substituční léčba – sebelipáza alfa (rekombinantní humánní lyzozomální kyselá lipáza).

To všechno jsou závažné důvody, pro které na tuto problematiku opět po 3 letech upozorňujeme v aktualizaci článku z roku 2019 [20] doplněné novými spoluautory o podrobnější informace o možnostech genetického vyšetření.

## Patogeneze LAL-D

Molekulárně genetická podstata tohoto onemocnění spočívá v mutaci v *LIPA*-genu, který kóduje lyzozomální kyselou lipázu (LAL), která hraje klíčovou roli v lipidovém metabolismu. Zabezpečuje hydrolyzu cholesteryl esterů a triglyceridů v lysosomech [5].

Cholesteryl estery a triglyceridy derivované z LDL-cholesterolu (LDL-C) jsou degradovány pomocí LAL na neesterifikovaný cholesterol a volné mastné kyseliny, které jsou důležitými mediátory homeostázy nitrobuněčného cholesterolu.

Pokud je aktivita LAL snížena nebo zcela potlačena, cholesteryl estery a triglyceridy nejsou degradovány a akumulují se v lysosomech buněk různých orgánů, nejvíce v játrech. Vlivem zvýšení koncentrace cholesterolu a up-regulace HMG-CoA-reduktázy může LAL zpětně inhibovat aktivitu LDL-receptorů a snižovat clearance LDL-C z cirkulace. V laboratorních vyšetřeních nacházíme typicky zvýšení hodnot LDL-C, snížení hodnot HDL-C, hodnoty triglyceridů mohou (ale nemusí) být také zvýšeny [6].

## Klinické projevy LAL-D

LAL-D je heterogenní onemocnění s různými klinickými projevy. Průměrný věk, v němž se nemoc projevuje, je 5 let, ale byl popsán i rozvoj prvních příznaků u muže ve věku 44 let a u ženy ve věku 68 let.

Nejfulminantnější a také nejprogresivnější forma se projevuje v prvních týdnech po narození. Tato forma byla poprvé popsána v roce 1956 neurologem M. Wolmanem [7] a dalšími a posléze klasifikována jako nozologická jednotka Wolmanova choroba (MKN-10: E75.5). O několik let později popsal Fredrickson případ 12letého chlapce se závažnou hypercholesterolemií, hepatomegalii a akumulací cholesterol esterů z nálezu jaterní biopsie. Tato pozdní forma byla popsána jako cholesteryl ester storage disease (CESD) [8].

Různorodost a závažnost projevů je ovlivněna typem mutace a stupněm zbytkové aktivity enzymu.

## Wolmanova choroba

Při této variantě nacházíme nulovou aktivitu LAL a klinicky se toto onemocnění projevuje v prvních týdnech života neprosíváním, zvracením, distenzí břicha a průjmy. Typická je hepatosplenomegalie a hepatopatie vedoucí k selhání jater. Ke stádatání cholesteryl esterů může docházet i ve slezině, lymfatických uzlinách a nadledvinách, v nichž nacházíme v 50 % případů kalcifikace, dítě postupně kachektizuje a umírá zpravidla do 6. měsíce života na multiorgánové selhání. Onemocnění se může projevit dokonce i v těhotenství ascitem plodu a polyhydramniem [9].

## Cholesteryl ester storage disease

U dětí a dospělých se LAL-D projevuje méně fulminantně, někdy jen poruchami metabolismu lipidů, dále bývá přítomna asymptomatická hepatosplenomegalie v 1. dekádě (nebo až v dospělosti) a progresivní hepatopatie s elevací jaterních testů, steatóza jater, periportální fibróza, cirhóza a tumory jater [12].

## Klinické projevy LAL-D

- hepatomegalie/hepatosplenomegalie – adrenální kalcifikace – jícnové varixy
- bolesti břicha – zvracení – průjem
- anémie – malabsorpce – cholestáza – steatorea
- neprosívání – žlučnickové obtíže
- ischemická choroba srdeční – iktus

## Diagnostika a diferenciální diagnostika

Výše uvedené klinické a laboratorní nálezy mohou být přítomny i u jiných poruch metabolismu lipidů – nejčastěji u FH, familiárního defektu apolipoproteinu B a u kombinované a polygenní hypercholesterolemie [10,11].

Hladiny LDL-C bývají u pacientů s deficitem kyselá lipázy méně výrazně zvýšené než u pacientů s FH, nebývá zjištěna hepatopatie (zejména u dětí), avšak hepatopatie nemusí být přítomna u všech pacientů s LAL-D, někteří pacienti mohou mít také jen mírně zvýšené nebo normální hodnoty transamináz.

U dospělých je nutné uvažovat také o nealkoholové steatoze, steatohepatitidě a alkoholové hepatopatii.

### Vyšetření vedoucí k diagnóze LAL-D

Důležitá je podrobná osobní i rodinná anamnéza, která nás může vést k prvnímu podezření, že se nejedná o FH.

Rodiče pacientů s LAL-D mají typicky normální nebo mírně patologický lipidogram a v rodině často není závažná kardiovaskulární zátěž.

Při fyzikálním vyšetření nacházíme hepatosplenomegalii, která je opět v rozporu s diagnózou FH, zejména u dětí.

### Laboratorní vyšetření

V biochemickém vyšetření nacházíme elevaci jaterních testů (ALT, AST, GGT), hypercholesterolemii, zvýšení hodnot LDL-cholesterolu a v některých případech i triglyceridů a snížení hodnot HDL-cholesterolu.

### Zobrazovací techniky

Vyšetření ultrasonografií (USG) a nukleární magnetickou rezonancí (NMR) prokazují hepatosplenomegalii, zvětšení nadledvin a jejich kalcifikaci. V poslední době je k dispozici 3T-magnetická rezonance jako méně invazivní metoda než jaterní biopsie.

### Měření LAL-aktivity

Pro screening CESD a Wolmanovy choroby se využívá stanovení aktivity LAL v suché krevní kapce (DBS – Dried Blood Spot) fluorimetrickou metodou. Z důvodu nutnosti eliminovat vliv interferujících lipáz přítomných ve vzorcích DBS je nutné stanovení aktivity LAL provádět souběžně v přítomnosti a bez přítomnosti inhibitoru LAL lalistatu [13].

Tato metoda je relativně jednoduchá, ale jedná se o vyšetření orientační, které může být ovlivněno nesprávným provedením odběru DBS (např. vlivem použité dezinfekce, nedostatečně usušených vzorků) a vést k falešně zjištěnému deficitu LAL.

Pro potvrzení diagnózy LAL-D (CESD a Wolmanovy choroby) se vždy stanovuje aktivita lyzozomální kyselých lipáz v buněčném materiálu, nejčastěji v leukocytech izolovaných z periferní krve. Na stanovení aktivity LAL se používá fluorogenní substrát 4-metylbelloferyl-palmitát. Inhibitor LAL lalistat není při stanovení aktivity LAL v leukocytech potřebný.

### Jaterní biopsie

V současné době se biopsie provádí pouze v případě, že ostatní vyšetření nevedou k diagnóze. V bioptickém materiálu se nachází mikrovезikulární steatóza v jaterních lobulech, akumulace lipidů v hepatocytech, pěnové buňky (makrofágy) s vysokým obsahem ceroidu lokalizovaným periferně a ztráta lipopigmentu (lipofuscinu) v hepatocytech. Imunohistochemické barvení na lyzozomální markery katepsin D, LAMP1, LAMP2 (Lysosomal Associated Membrane Protein 1, Lysosomal Associated Membrane Protein 2) je pozitivní.

### Genetické vyšetření

Podkladem LAL-D je mutace genu *LIPA* na chromosomu 10q23.2, který má 10 exonů a je přibližně 45 kb dlouhý [14]. LAL-D je autosomálně recesivně dědičná choroba, nemocní jsou tedy typicky homozygoti nebo složení heterozygoti. Dosud bylo popsáno více než 40 ztrátových mutací, přičemž nejzávažnější alterace (nonsense nebo bodové mutace) ústí v zařazení stop kodonu a klinicky se manifestují v časném dětství, zatímco mutace méně závažné v pokročilejším věku [15]. U více než poloviny postižených jedinců bývá defekt exonu 8 (E8SJM c.894G > A) ústící v delecii exonu 8 v mRNA a reziduální aktivitu LAL V poslední době bylo vyšetření genu *LIPA* zařazeno do panelu pro masivní paralelní sekvenování neboli sekvenování nové generace (NGS – Next Generation Sequencing) využívané pro rutinní vyšetřování příčiny familiární hypercholesterolemie. Metoda NGS umožňuje sekvenovat úseky nukleových kyselin až celých genomů podstatně rychleji a cenově výhodněji než ostatní sekvenační metody. Do sekvenační reakce vstupují vzorky v souboru, tzv. knihovně. Jejich příprava zahrnuje proces přípravy templátu, tvorbu vlastní knihovny, která je amplifikována, purifikována a analyzována. Podstatou je zpracovávání až milionů sekvencí současně v jednom běhu, což má za následek produkci obrovského množství výstupních dat.

Z těchto dat je následnou analýzou získána informace o bodových mutacích, malých delecích, inzercích, případně malých duplikacích. Díky dostatečnému počtu čtení každé jednotlivé pozice v cílové oblasti je možné provést CNV-analýzu (Copy Number Variation), která dokáže odhalit rozsáhlé intragenové přestavby.

Zatím takto bylo v České republice vyšetřeno dohromady 235 pacientů s fenotypem familiární hypercholesterolemie (150 mužů, 85 žen). Mezi nimi bylo touto metodikou identifikováno 62 heterozygotních nositelů kauzálních mutací v genu pro LDL-receptor (medián LDL-C 6,3 mmol/l). U ostatních vyšetřených neodhalila analýza monogenní příčinu hypercholesterolemie (medián LDL-C 6,0 mmol/l). U žádného z vyšetřených nebyla identifikována mutace genu *LIPA*.

### Sledování pacientů s LAL-D

Pacienti by měli být sledováni ve specializovaných metabolických centrech zaměřených na léčbu lyzozomálních chorob. Vzhledem k progresivnímu charakteru onemocnění by měli být pacienti 1krát ročně kontrolováni (jaterní funkce, krevní obraz, lipidový profil). Zobrazovacími metodami by se měla pravidelně měřit velikost jater a sleziny. Magnetická rezonanční spektroskopie umožňuje sledovat obsah tuku v játrech a progresi jaterní fibrózy. Z hlediska rizikových faktorů aterosklerózy by se k pacientům s LAL-D mělo přistupovat jako k vysoce rizikovým.

### Léčba pacientů s LAL-D

Dříve byla k dispozici pouze symptomatická léčba. Dieta a hypolipidemika sice snížily hladiny lipidů, ale ani podávání statinů, případně v kombinaci s ezetimibem nezastavily progresi jaterního postižení. Transplantace kmenových buněk

a transplantace jater byly zatíženy velkým rizikem a dlouhodobá prognóza nebyla dobrá.

## Substituční enzymová léčba

Specifickou substituční enzymovou léčbu (ERT – Enzyme Replacement Therapy) představuje v současnosti účinný terapeutický postup. Cílem ERT je zvýšit aktivitu kyselých jaterních lipáz, zabránit hromadění cholesteryl esterů a triglyceridů v buňkách, a tím docílit zlepšení funkce postižených orgánů. Sebelipáza alfa způsobuje pokles hodnot jaterních transamináz, celkového, LDL-C i triglyceridů a zvýšení hodnot HDL-C. Sebelipázu podáváme formou nitrožilních infuzí v intervalu 2 týdnů [16–18].

Byla provedena řada klinických studií dokumentujících účinky substituční terapie na hladiny transamináz i plazmatických lipidů. V dlouhodobém sledování za 144 týdnů autoři při podávání sebelipázy alfa eskalované u části pacientů do dávky 3 mg/kg/1krát týdně dokumentovali pokles ALT o 32,0 % a AST o 34,2 % ve srovnání s hodnotami před zahájením léčby. Průměrné změny LDL-C, triglyceridů a non-HDL-C od výchozího stavu do 144. týdne -31,2 %, -19,1 %, resp. -30,3 %. Bylo pozorováno zvýšení hodnot HDL-C s průměrným procentuálním zvýšením o 39,7 %.

## Závěr

Prognóza pacientů s LAL-D je velmi individuální, od těžkého jaterního postižení v kojeneckém věku, vyžadujícího transplantaci jater, až po těžké kardiovaskulární komplikace v dospělém věku, průběh může být i mírný [19]. V každém případě je důležitá časná diagnostika, aby mohla být včas zahájena specifická léčba, která může zabránit vývoji organových změn. Dyslipidemie je nejčastějším prvním nálezem u dětí a dospělých s LAL-D a mnoho pacientů může být odesláno do lipidologických ambulancí s diagnózou FH.

Proto je důležité o diagnóze LALD uvažovat, zvláště je-li přítomna hepatomegalie a hepatopatie, protože nemocní s FH tyto příznaky nemají. Včasnou diagnostiku LAL-D umožňuje vyšetření metodou suché kapky, která je dobře dostupná pro všechny lipidology a lékaře, kteří se touto problematikou zabývají. Nově se genetické vyšetření mutací v genu *LIPA*, které jsou zodpovědné za manifestaci LAL-deficience, stalo součástí rutinního vyšetření genetické příčiny u nemocných s familiární hypercholesterolemií. Zatím v ČR touto metodikou nebyl odhalen žádný nositel mutace v genu *LIPA*.

## Literatura

1. Elleder M, Poupětová H, Ledvinová J et al. Deficit kyselých (lyzozomální) lipáz: přehled českých pacientů. Čas Lék Česk 1999; 138(23): 719–724.

2. Elleder M, Chlumská A, Hyánek J et al. Subclinical course of cholesteryl ester storage disease in an adult with hypercholesterolemia, accelerated atherosclerosis, and liver cancer. J Hepatol 2000; 32(3): 528–534.
3. Hulková H, Elleder M. Distinctive histopathological features that support a diagnosis of cholesterol ester storage disease in liver biopsy specimens. Histopathology 2012; 60(7): 1107–1113. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04164.x>> .
4. Wilson DP, Patni N. Lysosomal Acid Lipase Deficiency. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A et al (eds). Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.: 2000. Dostupné z WWW: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK395569/>>.
5. Reiner Ž, Guardamagna O, Nair D et al. Lysosomal acid lipase deficiency – An under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. Atherosclerosis 2014; 235(1): 21–30. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.003>> .
6. Fouchier SW, Defesche JC. Lysosomal acid lipase A and the hypercholesterolaemic phenotype. Curr Opin Lipidol 2013; 24 (4): 332–338. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/MOL.0b013e328361f6c6>>.
7. Abramov A, Schorr S, Wolman M. Generalized xanthomatosis with calcified adrenals. AMA J Dis Child 1956; 91(3): 282–286. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1001/archpedi.1956.02060020284010>>.
8. Fredrickson DS. Newly recognized disorders of cholesterol metabolism. Ann Intern Med 1963; 58(4): 718. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-58-4-718\\_1](http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-58-4-718_1)>.
9. Grabowski GA, Du H, Charnas L. Lysosomal acid lipase deficiencies: the Wolman disease/cholesteryl ester storage disease spectrum. In: Valle D (ed), Beaudet AL, Vogelstein B et al. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw Hill 2006. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1036/ommbid.172>>.
10. Strebinger G, Müller E, Feldman A et al. Lysosomal acid lipase deficiency – early diagnosis is the key. Hepat Med 2019; 11: 79–88. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.2147/HMER.S201630>>.
11. Valle D, Beaudet L, Vogelstein B (eds) et al. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw Hill 2006. Dostupné z WWW: <<https://ommbid.mhmedical.com>> .
12. Chatrath H, Keilin S, Attar BM. Cholesterol ester storage disease (CESD) diagnosed in an asymptomatic adult. Dig Dis Sci 2009; 54(1): 168–173. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10620-008-0310-2>>.
13. Malinová V, Honzík T. Lyzozomální onemocnění – současné možnosti diagnostiky a terapie. Pediatr Praxi 2013; 14(2): 99–103.
14. 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 et al (eds). Scriver's online metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw Hill: New York 2012.
15. Saito S, Ohno K, Suzuki T et al. Structural bases of Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. Mol Genet Metab 2012; 105(2): 244–248. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.11.004>> .
16. Burton BK, Balwani M, Feillet F et al. A Phase 3 Trial of Sebelipase Alfa in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. N Engl J Med 2015; 373(11): 1010–1020. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1501365>>.
17. Pastores GM, Hughes DA. Lysosomal Acid Lipase Deficiency: Therapeutic Options. Drug Des Devel Ther 2020; 14: 591–601. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S149264>>.
18. SPC přípravku Kanuma. Dostupné z WWW: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kanuma-epar-product-information\\_cs.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kanuma-epar-product-information_cs.pdf).
19. Bernstein DL, Hulková H, Bialer MG et al. Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. J Hepatol 2013; 58(6): 1230–1243. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.014>>.
20. Urbanová Z, Malinová V. Deficit lyzozomální kyselých lipáz v diferenciální diagnostice familiární hypercholesterolemie. AtheroRev 2019; 4(1): 30–33.