



Původní sdělení | Original research article

Mutační analýza promotorů genů pro iontové kanály u pacientů s ischemickou chorobou srdeční, kteří přežili fibrilaci komor

(Mutation analysis of ion channel genes promoters in ventricular fibrillation survivors with coronary artery disease)

Tomáš Novotný^a, Martina Raudenská^b, Jitka Kadlecová^c, Irena Andršová^a, Alena Floriánová^a, Anna Vašků^b, Milan Kozák^a, Milan Sepši^a, Lubomír Křivan^a, Renata Gaillyová^c, Jindřich Špinar^a

^a Interní kardiologická klinika, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice Brno, Brno, Česká republika

^b Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, Česká republika

^c Oddělení lékařské genetiky, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice Brno, Brno, Česká republika

INFORMACE O ČLÁNKU

Historie článku:

Došel do redakce: 19. 3. 2013

Přepřacován: 19. 6. 2013

Přiját: 24. 6. 2013

Dostupný online: 1. 7. 2013

SOUHRN

Úvod: Existují pádné důkazy pro to, že náhlá srdeční smrt (NSS) je geneticky podmíněna. V naší předchozí studii jsme zjistili, že prevalence vybraných vzácných kódujících variant v pěti genech se vztahem k syndromu dlouhého intervalu QT (LQTS) byla signifikantně vyšší u pacientů s ischemickou chorobou srdeční (ICHS), kteří přežili fibrilaci komor (FK), ve srovnání s kontrolami. V nynější studii jsme provedli mutační analýzu promotorů pěti LQTS genů ve stejné skupině pacientů a v kontrolních populacích.

Metody: Promotory genů *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1* a *KCNE2* byly analyzovány u 45 jedinců s ICHS, kteří přežili FK. Alelické frekvence byly srovnávány s daty z projektu 1000 Genomes Project nebo z lokální DNA banky pacientů s ICHS bez maligních arytmií (141 jedinců).

Výsledky: U 34 (75,5 %) ze 45 jedinců přeživších FK bylo nalezeno devět různých variant promotorů: dvě v promotoru genu *KCNQ1*, jedna v promotoru genu *KCNE1* a šest v promotoru genu *SCN5A*. Statisticky signifikantně se lišily alelické frekvence obou variant promotoru genu *KCNQ1*: 1-182C>T ($p = 0,008$), 1-119G>A ($p = 0,007$). Tyto varianty však v předchozí studii nesegregovaly s LQTS fenotypem. Alelická frekvence varianty 225-1072T>C promotoru genu *SCN5A* u pacientů přeživších FK se signifikantně lišila ve srovnání s daty z 1000 Genomes Project ($p = 0,001$), nikoliv však oproti skupině lokálních kontrol s ICHS.

Závěry: Naše výsledky ukazují, že varianty promotorů genů pro iontové kanály jsou časté jak u pacientů přeživších FK, tak v kontrolních skupinách. Naznačují, že varianty promotorů jsou geograficky specifické a nejsou běžnou příčinou NSS.

Klíčová slova:

Iontový kanál

Ischemická choroba srdeční

Náhlá srdeční smrt

Promotor

© 2013, ČKS. Published by Elsevier Urban and Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

Adresa: MUDr. Tomáš Novotný, Ph.D., Interní kardiologická klinika, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno-Bohunice, e-mail: novotny-t@seznam.cz

DOI: 10.1016/j.crvasa.2013.06.009

ABSTRACT

Introduction: Strong evidence suggests that sudden cardiac death (SCD) is genetically determined. In our previous study we found that the prevalence of selected, rare coding variants in 5 long QT genes was significantly higher in ventricular fibrillation (VF) survivors with coronary artery disease (CAD) than in controls. In the present study we performed mutational analysis of the promoters of 5 LQTS-related myocardial ion channel genes in the same group of patients and in control populations.

Methods: The promoters of *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1* and *KCNE2* genes were analyzed in 45 CAD individuals – survivors of documented VF. The allelic frequencies were compared either to data from the 1000 Genomes Project or from a local DNA bank of patients with coronary artery disease and no malignant arrhythmia (141 individuals).

Results: In 34 (75.5%) of 45 VF survivors 9 different promoter variants were found: 2 in *KCNQ1* gene promoter, 1 in *KCNE1* promoter, and 6 in *SCN5A* promoter. Statistically significant differences were found in the allelic frequencies of both *KCNQ1* gene promoter variants: 1-182C>T ($p=0.008$), 1-119G>A ($p=0.007$). Nevertheless, these variants did not segregate with long QT phenotype in a previous study. While the allelic frequency of the *SCN5A* gene promoter variant 225-1072T>C significantly differed in VF survivors compared to the 1000 Genomes Project ($p=0.001$), this allelic frequency was not different when compared to the group of local CAD controls.

Conclusions: Our findings demonstrated that variants of ion channel gene promoters are common, both in VF survivors and control groups. These results suggest that promoter variants are geographically-specific and are not a common cause of SCD.

Keywords:

Coronary artery disease

Ion channel

Promoter

Sudden cardiac death

Úvod

Existují pádné důkazy pro to, že náhlá srdeční smrt (NSS) je geneticky podmíněná [1–4]. V naší předchozí studii jsme zjistili, že prevalence vybraných vzácných kódujících variant v pěti genech se vztahem k syndromu dlouhého intervalu QT (LQTS) byla významně vyšší u pacientů s ischemickou chorobou srdeční (ICHS), kteří přežili fibrilaci komor (FK), ve srovnání s kontrolami, což potvrzuje mechanistickou roli těchto genů v takto definované podskupině pacientů [5].

Deset let po publikaci výsledků sekvenace lidského genomu je jasné, že kódující sekvence představují jen asi 1,5 % lidského genomu [6]. Zbývající část je buď „DNA junk“ – „odpad“, nebo mnohem pravděpodobněji obsahuje důležité regulační sekvence.

V nynější studii jsme provedli mutační analýzu nekódujících částí genů – promotorů – pět LQTS genů ve stejné skupině pacientů s ICHS s dokumentovanou FK v okamžiku NSS a v kontrolních populacích.

Metody

Vyšetřované subjekty

Skupina pacientů byla identická jako v předchozí studii [5] a byla tvořena 45 bělošskými pacienty (5 žen, 40 mužů) z oblasti jižní Moravy (cca 1,5 milionu obyvatel). Primárním zařazovacím kritériem byla FK dokumentovaná v době oběhové zástavy, která nebyla v souvislosti s akutní fází infarktu myokardu (tj. více než 48 h po příhodě). Takoví jedinci byli identifikováni v registru ICD našeho pracoviště, částečně retrospektivně (1998–2006), od roku 2007 byli noví pacienti zařazováni prospektivně. U dvou pacientů došlo k FK za hospitalizace více než 72 h po akutním infarktu myokardu. Všichni ostatní prodělali oběhovou zástavu mimo nemocnici, FK byla dokumentována posádkou vozu rychlé záchranné pomoci. Pacienti byli úspěšně resuscitováni a poté odesláni na naše pra-

coviště buď přímo, nebo přes regionální nemocnice. Po oběhové stabilizaci a úpravě mentálního stavu všichni pacienti podstoupili podrobné kardiologické vyšetření. U žádného z pacientů nebyly zjištěny známky akutního infarktu myokardu ani podle EKG, ani hodnot troponinu. Ischemická choroba srdeční byla u všech pacientů potvrzena koronarografickým nálezem signifikantních stenóz (> 70 %) nebo chronických uzávěrů. Ejekční frakce levé komory (EFLK) byla hodnocena echokardiograficky. U tří pacientů nebylo možno interval QT hodnotit kvůli přítomnosti blokády levého Tawarova raménka nebo fibrilace síní. Žádný ze zbývajících 42 pacientů nevykazoval významné prodloužení intervalu QT či EKG známky syndromu Brugadových.

Jako kontrolní soubor byla využita data z 1000 Genomes Project, v rámci kterého jsou sekvenovány genomy velkého počtu osob a jehož účelem je vytvoření zevrubného zdroje informací o lidských genetických variacích. V současné době databáze obsahuje data o genetických variacích v 1 092 lidských genomech z různých populací [7].

V případech, kdy data z 1000 Genomes Project nebyla k dispozici, byla použita kontrolní skupina 141 pacientů s ICHS, kteří byli hospitalizováni na našem pracovišti pro akutní koronární syndrom. U všech pacientů byla diagnóza ICHS potvrzena koronarografií. Všichni pacienti měli sníženou EFLK a přežívali minimálně čtyři roky po příhodě. Je tedy možno je považovat za jedince s nízkým rizikem NSS. Klinickou charakteristiku obou skupin shrnuje tabulka 1.

Po získání informovaného souhlasu byl u všech jedinců proveden odběr periferní krve k izolaci DNA. Protokol studie byl schválen etickou komisí FN Brno a je v souladu s etickými doporučeními Helsinské deklarace z roku 1975.

Genomické DNA vzorky a polymerázová řetězová reakce

Genomická DNA všech pacientů přeživších FK byla analyzována na přítomnost mutací v promotorových oblastech genů *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1* a *KCNE2*. Genomická DNA byla extrahována ze vzorků periferní krve podle

standardního protokolu s využitím DNA BloodSpin kitu a klasické metody ethanolové progrese.

Promotorové sekvence genů *KCNQ1*, *KCNH2* a *KCNE1* (GenBank přístupová čísla NG008935.1, NG008916.1, NG009091.1) byly amplifikovány multiplexní polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Byly navrženy a použity následující páry primerů: sedm párů primerů pro *KCNQ1* promotor, šest párů primerů pro *KCNH2* promotor a jeden pár primerů pro *KCNE1* promotor. Při PCR amplifikacích byl použit HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). Každá PCR byla prováděna ve 200 μl tenkostěnných PCR zkumavkách v celkovém reakčním objemu 25 μl za využití Verity Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

K amplifikaci promotorové oblasti genu *SCN5A* (GenBank přístupové číslo AY313163) bylo navrženo celkem 12 párů primerů. Pomocí programu Web Promoter Scan Service (verze 1.7) byl promotor genu *KCNE2* predikován do oblasti párů bází 7481–7746 sekvenční DQ784804. Tato oblast byla amplifikována pomocí jednoho páru primerů s využitím Taq DNA polymerázy (Fermentas, Inc., Glen Burnie, MD, USA) a HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). Každá PCR byla prováděna ve 200 μl tenkostěnných PCR zkumavkách v celkovém reakčním objemu 25 μl za využití Verity Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), SensoQuest Labcycler (Progen Scientific, Ltd., Mexborough, Spojené království) a Perkin Elmer 2400 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

DNA sekvenace

DNA sekvenace byla prováděna na přístroji ABI 3130 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) s cílem nalézt varianty promotorů genů *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE2* a *KCNE1*, a to za použití forward i reverse primerů.

Amplifikované vzorky byly přečištěny pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). Sekvenace byla prováděna za využití Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). DyeEx2.0 Spin Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) byl použit pro přečištění po sekvenaci.

Výsledné sekvenace analyzovaných promotorů genů *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE2* a *KCNE1* byly srovnávány s „wild-type“ sekvencemi uloženými v NCBI (GenBank přístupová čísla NG008935.1, NG008916.1, NG009091.1, AY313163, DQ784804). Číslování bylo odvozeno podle Yanga a spol. [8] a alelické frekvence byly srovnávány s daty z 1 000 Genomes Project [7]. V případě, že nalezená varianta nebyla v tomto projektu popsána, sekvenovaly se oblasti obsahující sekvenční varianty v kontrolní skupině 141 pacientů s ICHS bez arytmií (popsáno výše).

Statistika

Distribuce alelických frekvencí a jejich rozdíly byly kalkulovány pomocí χ^2 testu. Odds ratio (OR) a 95% interval spolehlivosti (confidence interval – CI) byl kalkulován k odhadu rizika spojeného s nalezeným polymorfismem. K hodnocení významnosti nebo OR byl použit Fisherův přesný test. Všechny statistické analýzy byly prováděny v programu Statistica v. 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Výsledky

U 34 (75.5%) ze 45 pacientů přeživších FK bylo nalezeno devět různých variant DNA sekvenace: dvě v promotoru genu *KCNQ1*, jedna v promotoru genu *KCNE1* a šest v promotoru genu *SCN5A*. V promotorech genů *KCNH2* a *KCNE2* nebyly detekovány žádné varianty. U šesti pacientů byly přítomny varianty v promotorech více než jednoho genu, vícečetné varianty v promotoru stejného genu byly nalezeny u 16 pacientů.

Varianty promotoru genu *KCNQ1*

V promotoru genu *KCNQ1* byly nalezeny varianty c. 1-182C>T u 15 pacientů a c. 1-119G>A u tří pacientů. Ve všech třech případech segregoval polymorfismus c. 1-119G>A společně s c. 1-182C>T. Data o těchto variantách byla k dispozici z 1000 Genomes Project.

Varianty promotoru genu *KCNE1*

Varianta c. 1-107insG byla nalezena v promotoru genu *KCNE1* u tří pacientů. Data o této variantě nebyla k dispozici z 1000 Genomes Project a její alelická frekvence byla testována ve skupině kontrol s ICHS.

Varianty promotoru genu *SCN5A*

V promotoru genu *SCN5A* bylo nalezeno šest variant u 22 pacientů. Více než jedna varianta promotoru genu *SCN5A* byla přítomna u 13 pacientů. Z nalezených variant byly v rámci 1000 Genomes Project popsány následující: c. -225-2038G>T, c. -225-1823C>T, c. -225-834T>C, c. -225-1744G>C, c. -225-1072T>C. Data o variantě c. -225-775T>A nebyla k dispozici z 1000 Genomes Project a její alelická frekvence byla testována ve skupině kontrol s ICHS.

Statistické výsledky

Alelické frekvence všech promotorových variant u pacientů přeživších FK a u kontrolních skupin shrnuje tabulka 2. Statisticky signifikantní rozdíly byly nalezeny u obou variant v promotoru genu *KCNQ1*: c. 1-182C>T (OR = 2,57,

Tabulka 1 – Klinická charakteristika vyšetřovaných jedinců

	Pacienti přeživší FK (n = 45)	Kontroly s ICHS (n = 141)	p
Muži/ženy	40/5	129/12	0,8181
Věk	68,6 ± 9,5	66,7 ± 10,7	0,2885
Ejekční frakce levé komory	40 ± 12 %	42 ± 9 %	0,35238
Anamnéza infarktu myokardu	32 (71 %)	127 (90 %)	0,2718

FK – fibrilace komor; ICHS – ischemická choroba srdeční.

CI = 1,18–5,57 pro C alelu u pacientů přeživších FK ve srovnání s kontrolami s ICHS, $p = 0,008$) a c. 1-119G>A (OR = 7,76, 95% CI = 1,06–56,77 pro G alelu u pacientů přeživších FK ve srovnání s kontrolní skupinou, $p = 0,007$). Alelická frekvence variant c. 225-1072T>C promotoru genu *SCN5A* se signifikantně lišila u pacientů přeživších FK ve srovnání s daty z 1000 Genomes Project (OR = 7,28, 95% CI = 1,00–53,28 pro T alelu u pacientů přeživších FK ve srovnání s kontrolní skupinou, $p = 0,001$), mezi pacienty přeživšími FK a kontrolami s ICHS však nebyl zjištěn signifikantní rozdíl.

Diskuse

V předkládané studii jsme provedli mutační analýzu promotorů pěti genů pro srdeční iontové kanály u pacientů s ICHS, kteří přežili FK. Cílem bylo testovat hypotézu, že polymorfismy v těchto oblastech jsou častější u jedinců přeživších FK než v kontrolních populacích. Šlo o rozšíření naší předchozí studie, ve které jsme zjistili, že frekvence výskytu vzácných kódujících variant těchto genů byla signifikantně vyšší u pacientů přeživších FK (8/45, 17,8 %) než u kontrol s ICHS (3/141, 2,2 %, $p = 0,001$). V promotorových oblastech stejných genů jsme našli devět různých variant DNA sekvence. Alelické frekvence tří z těchto variant se signifikantně lišily oproti datům z 1000 Genomes Project, který byl použit jako primární kontrolní soubor pro jeho statistickou sílu umožňující detekovat většinu genetických variant s frekvencí nejméně 1 %. Hlavním cílem 1000 Genomes Project je identifikace více než 95 % jednonukleotidových polymorfismů s 1% frekvencí v širokém souboru populací a do dnešního dne zahrnuje data o genetických variacích v 1 092 lidských ge-

nomech ze 14 populací z Evropy, východní Asie, subsaharské Afriky a obou Amerik [7].

Data o prevalenci polymorfismů promotorů genů pro iontové kanály u arytmiických pacientů jsou velmi omezená [9]. Varianty, které jsme našli v promotoru genu *KCNQ1*, byly popsány i v rámci 1000 Genomes Project a výskyt obou polymorfismů nalezených v promotoru tohoto genu se signifikantně lišil u pacientů přeživších FK ve srovnání s 1000 Genomes Project. Informace o možném funkčním vlivu těchto polymorfismů chybí: v naší předchozí práci jsme tyto konkrétní varianty našli i u pacientů s klinickou diagnózou LQTS, kdy však v žádné z rodin nesegregovaly s LQTS fenotypem [10]. Z toho vyplývá, že jejich možný funkční efekt je málo pravděpodobný.

Varianta námi nalezená v promotoru genu *KCNE1* dosud nebyla v literatuře popsána [11] a její alelická frekvence se nelišila v souborech pacientů přeživších FK a ICHS pacientů bez maligních arytmíí.

Promotor genu *SCN5A* je velmi polymorfní, čemuž odpovídá i fakt, že v naší studii bylo v tomto promotoru identifikováno šest různých polymorfismů. S výjimkou c. -225-1072T>C byly všechny další varianty předmětem studie Yanga a spol. [8], kteří zjistili, že pouze varianta c. -225-775 T>A signifikantně snižovala promotorovou aktivitu v srdečních myocytech. Taková varianta může modlovat fyziologické chování sodíkového kanálu v zátěžové situaci, kterou může být například právě ischemie myokardu. Nicméně alelické frekvence této varianty se nelišily v souborech pacientů přeživších FK a kontrol s ICHS, což naznačuje, že možnost jejího významného funkčního efektu je limitována.

Pro variantu c. -225-1072T>C nejsou k dispozici žádná funkční data. Zatímco alelické frekvence této varianty se významně lišily u pacientů přeživších FK ve srovnání s daty

Tabulka 2 – Alelické frekvence variant promotorů

Gen	Varianta	Pacienti přeživší FK (n = 45)	1000 Genomes Project	ICHS kontroly (n = 141)	p
<i>KCNQ1</i>	c. 1-182C>T	C = 0,823 T = 0,177	C = 0,643 T = 0,357	–	0,008
	c. 1-119G>A	G = 0,967 A = 0,033	G = 0,850 A = 0,150	–	0,007
<i>SCN5A</i>	c. -225-2038G>T	G = 0,86 T = 0,14	G = 0,864 T = 0,136	–	NS
	c. -225-1823C>T	C = 0,87 T = 0,13	C = 0,859 T = 0,141	–	NS
	c. -225-1744G>C	G = 0,97 C = 0,03	G = 0,993 C = 0,007	–	NS
	c. -225-1072T>C	C = 0 T = 1	C = 0,142* T = 0,86	C = 0,003+ T = 0,997	*0,001 +NS
	c. -225-834T>C	T = 0,87 C = 0,13	T = 0,883 C = 0,117	–	NS
	c. -225-775T>A	T = 0,98 A = 0,02	–	T = 1 A = 0	NS
<i>KCNE1</i>	c. 1-107insG	Alela – = 0,956 insG = 0,044	–	Alela – = 0,933 insG = 0,067	NS

FK – fibrilace komor; ICHS – ischemická choroba srdeční; * – pacienti přeživší FK ve srovnání s 1000 Genomes Project; + – pacienti přeživší FK ve srovnání s ICHS kontrolami; NS – není signifikantní.

z 1000 Genomes Project, rozdíl nebyl významný při srovnání se souborem lokálních kontrol s ICHS. Tyto výsledky naznačují, že tato varianta může být regionálně specifická a pravděpodobně nepředstavuje funkční polymorfismus.

Limitace

Naše studie má několik limitací, z nichž nejdůležitější je malý počet vyšetřených jedinců. Důvodem je incidence NSS a kapacita individuálních center provádějících rutinní genetické metody. Větší soubor by mohl vzniknout jen v rámci multicentrické studie. Vzhledem k malému počtu žen nebylo možné hodnotit žádné pohlavně podmíněné asociace. Alelické frekvence variant nalezených u pacientů přeživších FK byly srovnávány s daty z 1000 Genomes Project, tedy s nesespecifickou populací. V případě *KCNQ1* variant byly chybějící funkční studie nahrazeny analýzou korelací genotypu s fenotypem u LQTS subjektů.

Závěr

I když varianty promotorů genů pro iontové kanály jsou časté jak u pacientů přeživších FK, tak v kontrolních skupinách, naše výsledky naznačují, že varianty promotorů nejsou běžnou příčinou NSS.

Výzkum byl podpořen granty NS/10429-3 a NT/13767 Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky a projektem specifického výzkumu Masarykovy univerzity SVMUNIIA/0811/2011.

Literatura

- [1] Y. Friedlander, D.S. Siscovick, S. Weinmann, et al., Family history as a risk factor for primary cardiac arrest, *Circulation* 97 (1998) 155–160.
- [2] X. Jouvan, M. Desnos, C. Guerot, P. Ducimetière, Predicting sudden death in the population: the Paris Prospective Study I, *Circulation* 99 (1999) 1978–1983.
- [3] K.S. Kaikkonen, M.L. Kortelainen, E. Linna, H.V. Huikuri, Family history and the risk of sudden cardiac death as a manifestation of an acute coronary event, *Circulation* 114 (2006) 1462–1467.
- [4] L.R. Dekker, C.R. Bezzina, J.P. Henriques, et al., Familial sudden death is an important risk factor for primary ventricular fibrillation: a case-control study in acute myocardial infarction patients, *Circulation* 114 (2006) 1140–1145.
- [5] T. Novotny, J. Kadlecova, M. Raudenska, et al., Mutation analysis of ion channel genes in ventricular fibrillation survivors with coronary artery disease, *Pacing and Clinical Electrophysiology* 34 (2011) 742–749.
- [6] E.S. Lander, Initial impact of the sequencing of the human genome, *Nature* 470 (2011) 187–197.
- [7] The 1000 Genomes Consortium. An integrated map of genetic variation from 1092 human genomes, *Nature* 491 (2012) 56–65.
- [8] P. Yang, T.T. Koopmann, A. Pfeufer, et al., Polymorphisms in the cardiac sodium channel promoter displaying, *European Journal of Human Genetics* 16 (2008) 350–357.
- [9] X. Luo, J. Xiao, H. Lin, et al., Genomic structure, transcriptional control, and tissue distribution of *HERG1* and *KCNQ1* genes, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 294 (2008) H1371–H1380.
- [10] T. Novotny, J. Kadlecova, M. Raudenska, et al., Mutation analysis of ion channel genes promoters in patients with malignant arrhythmias – pilot study, *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 22 (Suppl 1) (2011) S9.
- [11] Z. Mustapha, L. Pang, S. Nattel, Characterization of the cardiac *KCNE1* gene promoter, *Cardiovascular Research* 73 (2007) 82–91.

Z anglického originálu přeložil autor.