Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2016 Pavla Šmitmajerová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Vyšetření hyperkoagulačních stavů se zaměřením na Leidenskou mutaci

Bakalářská práce

Pavla Šmitmajerová

Školitel: MUDr. Ivan Vonke, MBA

České Budějovice 2016

Šmitmajerová P., 2016: Vyšetření hyperkoagulačních stavů se zaměřením na Leidenskou mutaci [Examination hypercoagulable state focusing on Leiden mutation, Bc. Thesis, in Czech] – p. 77, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Abstract:

This work focuses on congenital and inherited defects of hemostatic mechanism behind the increased tendency to develop trombosis of veins and arteries. The most significant and the most abundant inherited thrombophilia is APC resistance, which is caused by mutation of factor v – FV Leiden. My work is focused on this specific form of mutation.

Leiden mutation incidence around the world ranges from 0 to 15 %, incidence in europe is around 5 %, and prevalence in Czech republic specifically is also 5 %.

The aim of my work is to determine the frequency of FV Leiden mutation in oupatients from hermatological laboratory of Nemocnice České Budějovice, a.s. in the year 2015, relation between FV Leiden and ACP and negative prediction of FV Leiden according to ACP.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Písku 16. 4. 2016 …….

Pavla Šmitmajerová

Poděkování:
Na tomto místě bych především ráda poděkovala panu primáři MUDr. Ivanu Vonkemu, MBA za cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou projevoval po celou dobu vedení bakalářské práce. Poděkování za podporu a trpělivost samozřejmě patří i celé mé rodině.

Obsah

1. ÚVOD 1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED 2
2.1 Hemostáza 2
2.1.1 Primární hemostáza 2
2.2 Hemokoagulační systém 2
2.2.1 Koagulační faktory 3
2.2.2 Koagulační kaskáda 5
2.3 Přirozené inhibitory koagulace 6
2.4 Fibrinolýza 7
2.5 Trombofilní stavy 8
2.5.1 Získané trombofilie 9
2.5.2 Vrozené trombofilie 10
2.6 FV Leidenská mutace 10
2.6.1 Klinické projevy tromboembolismu u FV Leidenské mutace 11
2.6.2 Znaky k vyšetření přenašečství FV Leidenské mutace 13
3. CÍLE PRÁCE 15
4. MATERIÁLY A METODIKA 16
4.1 Odběr krve a její zpracování 16
4.2 Hematologie 17
4.3 Laboratoř genetiky 18
5. VÝSLEDKY 20
5.1 Frekvence výskytu FV Leidenské mutace 20
5.2 Vztah FV Leiden a APC a určení negativní predikce FV Leiden 23
6. DISKUZE 24
7. ZÁVĚR 26
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 27
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 28
10. Seznam obrázků, tabulek, grafů 31
11. Přílohy 32

1. ÚVOD

Trombofilie, ať už vrozená či získaná, je porucha hemostatického mechanismu, která je příčinou zvýšeného rizika vzniku trombóz. Nejvíce častým projevem trombofilie je venózní tromboembolie (VTE).

Jednou z nejvýznamnějších a nejčastějších vrozených trombofilií je rezistence APC (aktivovaný protein C), jež je způsobena bodovou mutací v polynukleotidovém řetězci pro faktor V. Právě v tomto místě dochází k záměně v pořadí nukleotidů, konkrétně dusíkaté báze guaninu za adenin na pozici 1691 (G1691A) a právě díky tomu dochází k záměně aminokyseliny argininu za glutamin. Tato záměna způsobuje odolnost aktivního faktoru V vůči proteinu C, který ho má inaktivovat. Tím pádem faktor V zůstává stále prokoagulační a tím se zvyšuje syntéza trombinu a spolu s tím riziko vzniku tromboembolické nemoci.

Riziko vzniku venózní tromboembolické nemoci rozlišujeme podle toho, zda se jedná o homozygotní či heterozygotní formu mutace. U heterozygotů je riziko vzniku tromboembolie 7x vyšší než u jedinců zdravých, zatímco u homozygotních nosičů je toto riziko vyšší až 80krát.

Světový výskyt FV Leidenské mutace se pohybuje v rozmezí 0 až 15%, v České republice je prevalence zhruba 5% a je diagnostikována až u 40% pacientů, u kterých se tromboembolie vyskytla.

Znalostí o nositelství FV Leidenské mutace můžeme značně ovlivnit léčbu i prevenci venózní trombózy, léčbu v případě těhotenských komplikací a mimo jiné i rozhodnutí o užívání hormonální antikoncepce.

Tato práce se věnuje frekvenci výskytu FV Leidenské mutace u pacientů ambulance hematologické laboratoře Nemocnice České Budějovice a.s., vztahu mezi FV Leiden a ACP a určení negativní predikce FV Leiden.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Hemostáza

Hemostázou se rozumí proces, při kterém dochází ke srážení krve. Jde o životně důležitý a přesně regulovaný jev organismu, který dokáže zastavit krvácení v místě poranění cévy a v neporušeném cévním řečišti nadále umožnit plynulý průtok krve. Hemostáza probíhá díky cévní stěně, krevním destičkám a plazmatickým faktorům (Penka, 2001).

2.1.1 Primární hemostáza

Jako první během poranění cév nastane vazokonstrikce neboli zúžení cév, aby došlo k co nejmenší ztrátě krve. Tato reflexní odpověď cévní stěny na ztrátu krve v místě poranění je vyvolána autonomním nervstvem, svalovými buňkami a mediátory – serotoninem, epinefrinem, noradrenalinem a tromboxanem A_2 (Kolde, 2004).

Díky činnosti trombocytů vzniká v místě poranění cévy primární krevní zátka. Krevní destičky se navážou na kolagen, adhezí jsou aktivovány a mění svůj tvar. Působením trombinu, který se v nepatrném množství vytvořil srážením krve, dochází k agregaci destiček (Trojan, 2003).

Na aktivované trombocyty se váže fibrinogen a vzniká výše zmiňovaná primární krevní zátka. Tato zátka se ale stále může rozplynout a odplout krví. Proto je nezbytné, aby vznikla definitivní zátka z nerozpustné fibrinové sítě. K tomu dojde tehdy, když se trombocyty rozplynou a tím uvolnění svůj obsah granul do okolí. Uvolněné látky spustí koagulační kaskádu a nastává proces hemokoagulace (Trojan, 2003).

2.2 Hemokoagulační systém

Hemokoagulace je děj navazující na hemostázu. Hemokoagulaci můžeme také nazvat jako sekundární hemostázu. Jedná se o jev, který je podstatný k vytvoření nerozpustného fibrinu a tedy i pevné fibrinové zátky (Šlechtová, 2007).

Látky, které se účastní procesu hemokoagulace, nazýváme koagulačními faktory. Jedná se z velké části o glykoproteiny, u kterých v průběhu krevního srážení dochází k strukturálním změnám (Pecka, 2004).

2.2.1 Koagulační faktory

Většina koagulačních faktorů se vytváří v játrech, některé z nich za spolupůsobení vitamínu K. Kromě tkáňového faktoru, kolují všechny koagulační faktory v krevní plazmě v neaktivní formě (proenzymy, zymogeny) a potřebují ke svému uvedení do činnosti proteolytické štěpení za vzniku koagulačně aktivního enzymu (Pecka, 2004 a Šlechtová, 2007). Faktory značíme římskou číslicí, podle časového sledu jejich objevení. Aktivované formy se následně stanovují indexem a (př. FV → FVa) (Pecka, 2004).

Faktor I – Fibrinogen

Fibrinogen je glykoprotein, který se nachází v plazmě a v granulích destiček. Jedná se o faktor s nejvyšší koncentrací v plazmě. Poločas rozpadu je okolo 100 hodin. Fibrinogen je dimerická molekula, skládající se ze tří různých polypeptidových řetězců (Aα, Bβ, γ). Fibrinogen je štěpen buď trombinem na fibrin nebo plazminem (Matýšková, 1999). Koncentrace fibrinogenu se zvyšuje při poranění, zánětech a v těhotenství.

Faktor II – Protrombin

Relativně stálý faktor s poločasem rozpadu 60 – 96 hodin, tvořící se v játrech. K jeho správné činnosti je nutná přítomnost vitaminu K. Jeho aktivní forma, trombin, má hlavní roli v koagulaci, štěpí fibrinogen na fibrin, aktivuje FXIII a FIX. Ovlivňuje tři skupiny reakcí v koagulační kaskádě, řídící tvorbu krevního koagula, aktivaci buněk, při které se vytvoří povrchy pro koagulační reakce, k podpoře probíhající koagulace a zpevnění koagula a naopak zamezení přílišnému srážení.

Tkáňový faktor

Tkáňový faktor je buněčný kofaktor, vyskytující se na buňkách, které nepřijdou do kontaktu s krví, nevyskytuje se tedy za obvyklých předpokladů na krevních elementech, cévních endoteliích a nekoluje v plazmě. Jedná se o jednořetězový apoprotein o hmotnosti 45 kD. Tento faktor spouští srážení krve vytvořením komplexu s koagulačním FVII a VIIa (Matýšková, 1999).

Faktor V – Proakcelerin

Faktor V, plazmatický kofaktor homologní s faktorem VIII, vzniká v játrech a megakaryocytech a můžeme ho najít v plazmě a granulích trombocytů (Matýšková, 1999). Faktor v Leiden je označení genové mutace, která způsobuje hyperkoagulační stavy s vážnými klinickými důsledky, mezi které hlavně patří hluboká žilní trombóza.

Faktor VI - Akcelerin

Faktor VI byl dříve špatně označován jako FVa, v současnosti ale neexistuje.

Faktor VII – Prokonvertin

Prokonvertin vzniká v játrech, může se vyskytovat v séru. Jedná se o faktor s velice krátkým poločasem rozpadu a to pouhých 4 – 5 hodin. Jeho činnost se zvyšuje v těhotenství a s rostoucím věkem. K jeho uvedení do činnosti dochází díky FIX, kdy vznikne FVIIa, složený z těžkého a lehkého řetězce propojeného disulfidickými můstky (Kisiel, Fujikawa a Dawie, 1977).

Faktor VIII – Antihemofilický globulin

Faktor VIII je syntetizován v játrech. Jedná se o plazmatický glykoprotein o molekulové hmotnosti 330 kDa. v plazmě koluje vázaný nekovalentní vazbou na Von Wilebrandův faktor (VWF) v poměru 1:1. Gen pro jeho syntézu se nachází na chromozomu X. Řadíme ho mezi pozitivní reaktanty akutní fáze zánětu.

Faktor IX – Antihemolitický faktor

Antihemolitický faktor, také známý jako Christmasův faktor, má poločas rozpadu do 30 hodin a jeho molekulová hmotnost je 56 kDa. Faktor IX vzniká v játrech, ale najít ho můžeme také v séru. Množství, které je třeba k zástavě krvácení, se udává v rozmezí 20 – 30 % jeho aktivity. Jeho činnost je spuštěna přítomností FXIa a FVIIa.

Faktor X – Stuart-Prowerův faktor

Faktor, syntetizován v játrech jako dvouřetězový glykoprotein, jehož aktivace je společným uzlem vnější a vnitřní cesty aktivace srážení krve. v zevní cestě je aktivován komplexem FVIIa a TF, naopak ve vnitřní cestě je aktivován za přítomnosti FIXa, FVIIIa, Ca2+ a fosfolipidů (Leytus, 1986). Je třeba kolem 20% jeho činnosti k zastavení krvácení.

Faktor XI

Koagulační faktor XI bývá nazýván jako PTA (plasma tromboplastin antecedent), někdy také jako antihemolitický faktor C. Jedná se o glykoprotein syntetizován v játrech, cirkulující v krvi jako molekula složená ze dvou stejných řetězců navázaná na vysokomolekulární kininogen (HMWK). Je aktivován trombinem nebo FXIIa, u kterého bylo zjištěno, že i při ztrátě FXIIa pořád k jeho aktivaci dochází (Emsley, McEwan, Gailani, 2010).

Faktor XI sám o sobě aktivuje faktor IX, čímž je užíván v zahajující fázi vnitřní aktivace koagulace.

Faktor XII – Hagemanův faktor

Faktor XII, též známý jako Hagemanův faktor, je složen z jednoho lehkého a jednoho těžkého řetězce. Tento faktor lze najít v plazmě i v séru. K jeho aktivaci dochází při kontaktu se subendotelovými strukturami při poranění či s proteázami (Matýšková, 1999). Aktivovaný FXII aktivuje pozitivní zpětnou vazbou prekalikrein na kalikrein, a jako FXIIa dále společně s kininy aktivuje FXI. Vyšší hodnota Hagemanova faktoru se může objevovat u těhotných žen či u žen po menopauze.

Faktor XIII – Faktor stabilizující fibrin

Posledním faktorem koagulační kaskády je faktor XIII – faktor stabilizující fibrin nebo také transglutamináza. v plazmě je navázán na molekulu fibrinogenu, také ho lze najít v játrech a buněčných komponentách. Jeho úkolem je ustálení fibrinové sraženiny. v hemostáze není jeho funkce jediná, podílí se také v hojení ran, důležitou roli dále hraje v udržení těhotenství. Aktivován je trombinem za přítomnosti Ca2+ (Matýšková, 1999).

2.2.2 Koagulační kaskáda

Koagulační kaskádu, také známou jako plazmatický koagulační systém, lze rozdělit podle způsobu aktivace, a to na vnější a vnitřní systém (Matýšková, 1999). Tyto systémy se navzájem propojují, proto je nelze od sebe stroze separovat (Penka, 2009).

Záměrem tohoto systému je přeměna fibrinogenu na fibrin, který upevňuje destičkový trombus a tvoří ve spolupráci s krevními buňkami konečný červený trombus. Tato transformace vzniká díky sledu na sebe navazujících enzymatických reakcí (Kubisz, 2006).

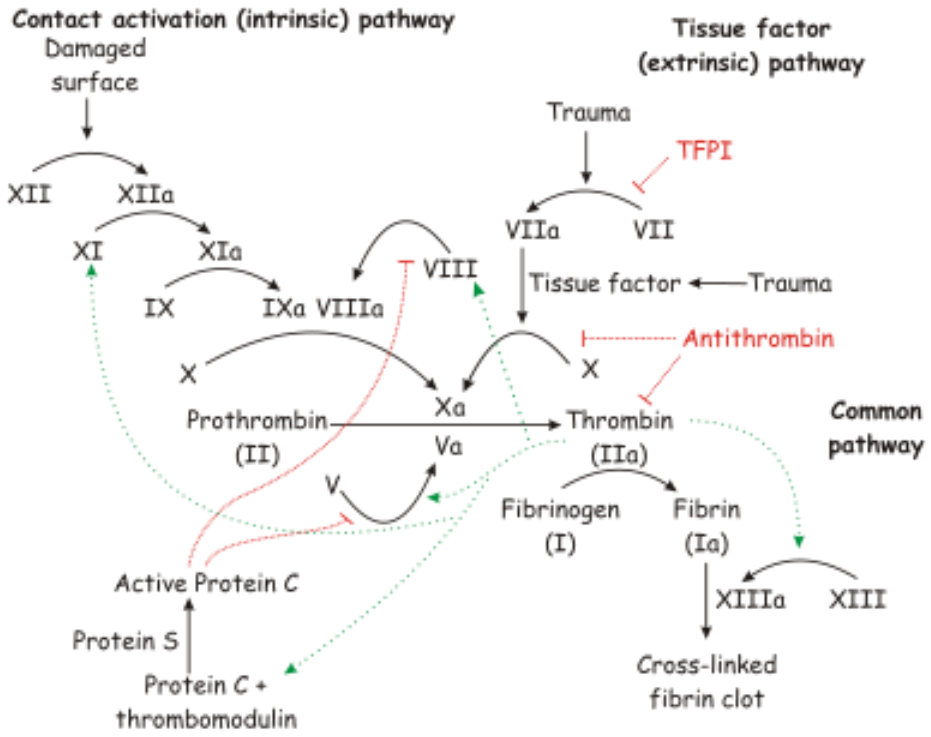
K aktivaci vnější koagulační cesty dochází díky tkáňovému faktoru, který je uvolňován z poraněné tkáně (Kittnar, 2011). Tkáňový faktor na sebe váže FVII, který za pomoci Ca2+ iontů jako kofaktoru rozštěpí a dále aktivuje na FVIIa. Tkáňový faktor spolu s FVIIa aktivuje přeměnu FX na FXa, který dále katalyzuje přeměnu FII na FIIa ve společné cestě (Kolde, 2004).

Vnitřní koagulační cesta začíná kontaktem záporně nabitého povrchu, například kolagen ze subendotelu, s faktorem XII, který je tímto aktivován na FXIIa. Aktivovaný

FXIIa katalyzuje přeměnu faktoru XI na jeho aktivovanou formu FXIa, jež společně s Ca2+ionty ovlivňují přeměnu FIX na jeho aktivovanou formu FIXa. FIXa, Ca2+ionty, FVIIIa společně s destičkovým faktorem 3 tvoří tzv. tenázový komplex, jež slouží jako přímý aktivátor FX, takže jeho aktivovaná forma FXa tímto vstupuje do společné koagulační cesty

Společná koagulační cesta nastává ve chvíli, kdy FXa spolu s FV za účasti vápenatých iontů štěpí protrombin na trombin. Trombin dále přeměňuje fibrinogen na fibrin a k tomu aktivuje faktor V, VIII a XIII. Na rozpustný fibrin působí FXIIIa, čímž se vytvoří pevné kovalentní příčné vazby mezi jednotlivými vlákny a vznikne trojrozměrná síť stabilního, nerozpustného fibrinu. Fibrin tím upevní primární destičkové koagulum a dojde ke vzniku pevné krevní sraženiny. Tímto je uzavřen vlastní proces krevního srážení. Schéma koagulační kaskády je zobrazeno na obrázku č. 1 níže.

Obrázek č. 1: Schéma koagulačního systému



Zdroj: http://www.tumblr.com/tagged/coagulation%20cascade

2.3 Přirozené inhibitory koagulace

Ve chvíli, kdy je hemostáza u konce, je nutné, aby došlo k zneškodnění aktivovaných koagulačních faktorů a zamezit tím tak masivnímu srážení krve, které by následně mohlo

zapříčinit ucpání cév a smrt. Systém přirozených inhibitorů koagulace se starají o to, aby nedocházelo k nadměrnému srážení krve a nevznikaly krevní sraženiny.

Inhibitory se rozlišují dle různých znaků, nejčastějším rozdělením je však podle místa výskytu. Mezi inhibitory plazmatické patří antitrombin, protein C a protein S, mezi inhibitory působící na povrchu endotelu můžeme zařadit inhibitor cesty tkáňového faktoru TFPI (tissue factor pathway inhibitor) a trombomodulin (Marek, 2010).

Antitrombin (AT) je látka chránící lidský organismus před utvořením krevní sraženiny. Je syntetizován v játrech a v endotelových buňkách. Antitrombin inaktivuje trombin a FXa, ale také inhibuje účinek FVIIa, FIXa, FXIa a FXIIa. K zesílení funkce antitrombinu až tisícinásobně dochází při vazbě antitrombinu s heparinem. Heparin, strukturou podobný heparsulfanátu nacházejícího se na cévním endotelu, se naváže do specifického místa na antitrombinu, čímž nastává změna prostorového uspořádání atomů v molekule AT a ta má poté větší afinitu k trombinu (Baker and Murray 2001). v případě nepřítomnosti antitrombinu by neměla léčba heparinem smysl. Deficit antitrombinu je tedy považován za rizikový faktor vzniku trombózy (Šlechtová, 2007).

Protein C (PC) je glykoprotein syntetizován v játrech a endoteliálních buňkách a to pouze za výskytu vitaminu K. Na povrchu endotelií dochází k nejúčinnější aktivaci proteinu C, a to díky spolupůsobení vápenatých iontů a trombinu, který je vázán na trombomodulin (Penka a Tesařová, 2011). Aktivovaný protein C (APC) společně s proteinem S a trombomodulinem tvoří tzv. systém proteinu C. Tento systém má dále za úkol inaktivovat aktivované faktory v a VIII.

Protein S (PS) je glykoprotein tvořen v játrech, megakaryocytech, endotelu a Leydigových buňkách a stejně jako protein C je K-dependentní. v plazmě najdeme protein S ve dvou formách, kdy jedna je volná a druhá je navázána na C4bBP (vazný protein C4 složky komplementu). Protein S ve formě vázané na C4bBP se vyskytuje zhruba v 60% (Marek, 2010). K činnosti jako inhibitor koagulace je dostupný pouze volný protein S, vázaná forma nemá pro koagulaci žádný význam.

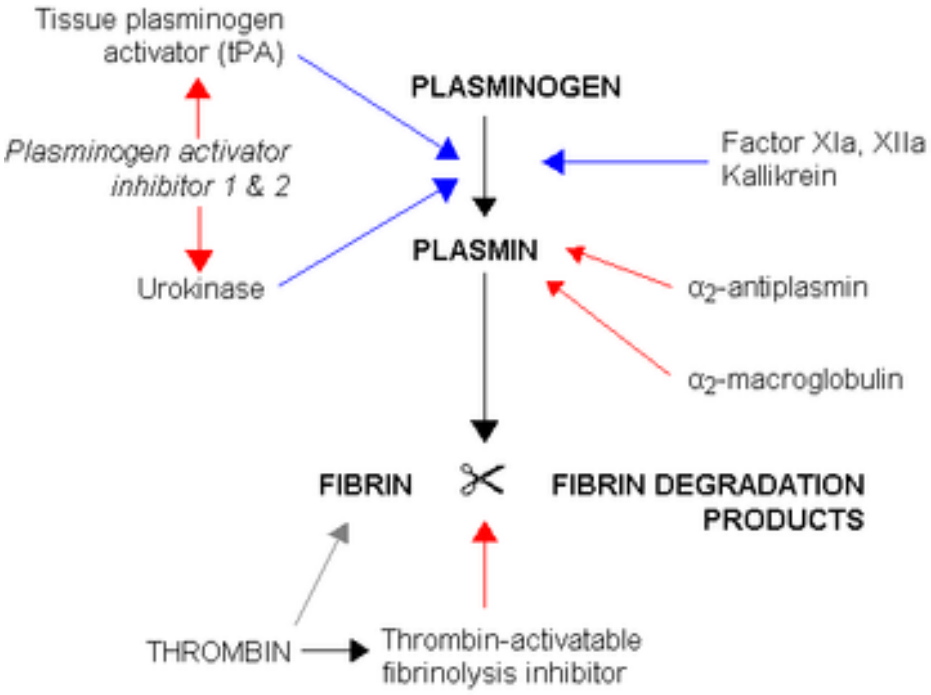
2.4 Fibrinolýza

Fibrinolýza je konečným a nejdelším krokem hemostázy. Délka trvání se pohybuje v rozmezí 48 až 72 hodin (Penka, 1994). Fibrinolýzou rozumíme fyziologické odstranění

vytvořené krevní sraženiny, které vede k iterovanému zprůchodnění cévy. Za rozpouštěním koagula stojí jediný enzym – plazmin, který vzniká aktivací proenzymu plazminogenu. Plazmin dokáže degradovat fibrin na fibrin degradační produkty (FDP) a konečné produkty D-dimery. Plazmin kromě fibrinu štěpí i faktor v a faktor VIII, proto má antikoagulační účinky (Šlechtová, 2007).

Zvýšená fibrinolýza může zapříčinit krvácivé stavy, naopak trombofilní stavy mohou nastat při fibrinolýze snížené, a proto je třeba fibrinolýzu řídit. Tento proces regulují přirozené inhibitory fibrinolýzy. To, aby fibrinolýza probíhala pouze v místě poranění, podněcují α2-antiplazmin a inhibitor aktivátoru plazinogenu (PAI). Jako další je trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI), který štěpí fibrin a tím zredukuje počet vazebných míst pro plazminogen a tkáňový aktivátor plazminogenu (tPa) (Šlechtová, 2007).

Obrázek č. 2: Schéma fibrinolýzy



Zdroj: *https://en.wikipedia.org/wiki/File:Fibrinolysis.png*

2.5 Trombofilní stavy

Trombofilie, tzv. hyperkoagulační stav, je vrozená či získaná porucha hemostatického mechanismu, která stojí za zvýšeným sklonem ke vzniku trombóz v žilách

nebo arteriích (Penka, 2009). Trombofilie bývá zjištěna u zhruba poloviny pacientů s trombózou.

V dnešní době známe několik faktorů, jak vrozených tak i získaných. Tyto faktory samozřejmě riziko trombózy zvyšují. Z výskytu rizikových faktorů u člověka ale nevyplývá, že ji musí nutně prodělat. Většina lidí s trombofilií za celý život trombózu neprodělá, zatímco v některých rodinách dochází k mnohanásobným trombózám a to bez výskytu známé poruchy. Z tohoto důvodu je výhodnější sdělovat definici tzv. klinické trombofilie, která vybere pacienty, u kterých je možné uvážit vyšetření na výskyt trombofilní mutace (Heit, 2007).

Abychom mohli mluvit o trombofilii, musí pacient mít alespoň dva z těchto aspektů:

- trombóza v mladším věku
  - – žilní před 40. – 45. rokem
  - – tepenná před 30. – 35. rokem
- podstatně pozitivní anamnéza (výskyt trombóz u přímých příbuzných)
- trombózy arteriální i žilní
- atypická, migrující nebo mnohočetná lokalizace
- opakující se ztráty plodu (tři a více následných spontánních potratů před 10. týdnem gravidity, popřípadě jedno a více úmrtí morfologicky normálního plodu po 10. týdnu gravidity), rizikové těhotenství

2.5.1 Získané trombofilie

Získané rizikové faktory, jež způsobují trombofilii, jsou věk, obezita, kouření, těhotenství a šestinedělí, chirurgický zákrok, krátkodobé či dlouhodobé znehybnění, trauma, stav po prodělané trombóze, částečná ztráta hybnosti končetin, malignita, křečové žíly dolních končetin, hormonální antikoncepce a léčba estrogeny (Urbánková, 2002).

Mezi další získané rizikové faktory zahrnujeme autoimunitní choroby, závažná respirační onemocnění, chronické střevní záněty, antifosfolipidový syndrom, nefrotický syndrom, sekundární trombocytózu, paroxyzmální oční hemoglobinurii, myeloproliferativní onemocnění, srdeční nedostatečnost NYHA III a IV (Kessler, 2006).

2.5.2 Vrozené trombofilie

Jako nejvýznačnější a také nejhojnější vrozená trombofilie je APC rezistence, jež vzniká vlivem mutací faktoru v - FV Leiden či FV Cambridge. Mezi další geneticky podmíněné trombofilie řadíme deficit proteinu C nebo S, deficit antitrombinu, srpkovitou anémii, dysfibrinogenemii, homozygotní homocystinurii, dále pak také mutaci protrombinu 20210A či sticky platelet syndrom (Kvasnička, 2003).

Jsou ale i trombofilie, které nemůžeme zařadit ani do jedné z těchto skupin, proto se značí jako trombofilie smíšené. Do této skupiny tedy patří hyperhomocsteinemie podmíněna mutací methylentetrahydrofolatreduktázy, nedostatek vitaminu B6, B12 nebo nedostatek kyseliny listové. Dále sem lze zařadit zvýšenou hladinu faktoru VIII. Také zvýšená hladina fibrinogenu a faktoru IX patří do skupiny smíšených trombofilií (Poul, 2006).

2.6 FV Leidenská mutace

Název Leidenská mutace je podle místa objevu, města Leiden v Nizozemsku (Penka a Tesařová, 2011) a jde o autozomálně kodominantně dědičnou formu rezistence na aktivní protein C. v bělošské populaci je mutace faktoru V považována za nejznámější a nejčastější genetický defekt a také za vrozený rizikový faktor trombózy (Procházka 2004) a je diagnostikována až u 40 % pacientů, u kterých se tromboembolie vyskytla (Wilmer, Stocker, Kolde, 2004).

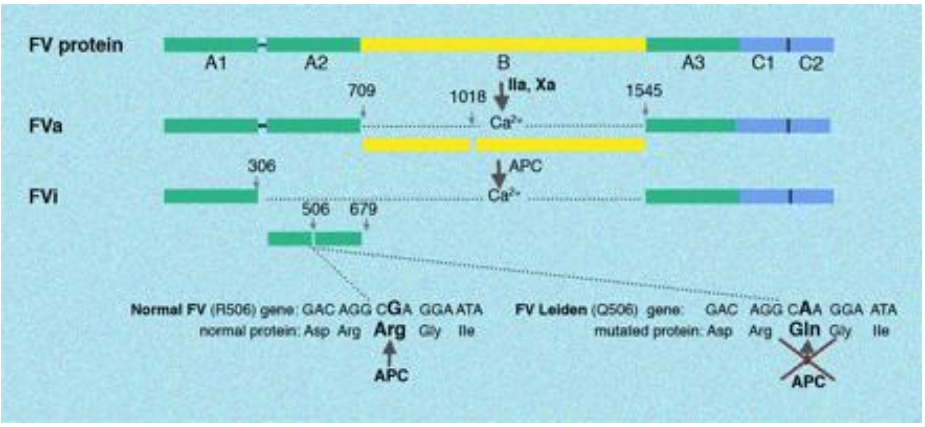
Výskyt Leidenské mutace ve světě je v rozmezí 0 – 15 % (Kreidy, 2012). Zatímco v evropské populaci je výskyt okolo 5 %, v africké a asijské populaci se prakticky nevyskytuje. Nejvyšší prevalence je ve východním středomoří, konkrétně v Řecku 13,4 %, v Sýrii 13,6 % a v Jordánsku 12,3 %. Absolutně nejvyšší výskyt Leidenské mutace byl nalezen v Libanonu, a to 14,4 % (Kreidy, 2012). U afroameričanů je výskyt cca 3 % (Lockwood a Wendel, 2010). v České republice je prevalence okolo 5 % (Poul, 2006).

Dahlback společně s kolektivem v roce 1993 popsal rezistenci na aktivovaný protein C (APC rezistence APC-R), kterou vyvolává bodová mutace v polynukleotidovém řetězci genu pro faktor v (Raušová, 2005).

Gen faktoru v se nachází na prvním chromozomu 1q21 – q25, zahrnuje 25 exonů a 24 intronů (Penka a Tesařová, 2011). v genu pro faktor v dochází k substituci guaninu za adenin na pozici 1691 (exon 10) a právě díky tomu dochází k záměně aminokyseliny argininu za glutamin v peptidickém řetězci (Raušová, 2005). Tato záměna dále způsobuje

ztrátu štěpného místa Arg 506 v aktivovaném faktor V, čímž způsobuje obtíže následných štěpení v místech 306 a 679 (Penka a Tesařová, 2011) To zobrazuje obrázek č. 3 níže. Další příčinou je oslabení funkce faktoru v jako kofaktoru aktivovaného proteinu C při štěpení faktoru VIIIa (Penka, 2009), z čehož vyplývá, že faktor v se stává odolnějším oproti proteinu C, který ho má inaktivovat a rozpad je pomalejší až 10x (Penka a Tesařová, 2011). Právě kvůli tomu se dále syntetizuje trombin a dochází ke zvýšenému riziku vzniku treomboembolismu (Penka, 2009).

Obrázek č. 3: Aktivace a degradace faktoru v a faktoru v Leiden



Zdroj: http://www.pathologyoutlines.com/topic/coagulationsuperpage.html

Podle toho, zda se jedná o heterozygotního či homozygotního nosiče, riziko zrodu žilního tromboembolismu se odlišuje. U heterozygotů je riziko 7x vyšší, u homozygotů je až 80x vyšší (Urbánková, 2002).

Doposud jsou ještě popsány další mutace, které vedou k APC rezistenci. Patří mezi ně faktor v Cambridge a faktor v Hong Kong (Penka, 2009).

2.6.1 Klinické projevy tromboembolismu u FV Leidenské mutace

Jak už bylo výše zmíněno, ne u všech jedinců s FV Leidenskou mutací se musí trombóza objevit. Na klinické projevy působí řada faktorů:

Počet alel faktoru V Leiden

Jak už bylo výše zmíněno, u heterozygotů je riziko vzniku tromboembolie 7 x vyšší než u jedinců zdravých, zatímco u homozygotních nosičů je toto riziko až 80 x vyšší. U homozygotních nosičů je dalším vyšším rizikem mladší věk (Kujovich, 2010).

Společný výskyt genetických abnormalit

Jsou-li přítomny s mutací faktoru V Leiden ještě další vrozené trombofilie, rizika tromboembolií jsou mnohem vyšší. Například heterozygot FV Leiden spolu s heterozygotem protrombin 20210A spadá mezi nejčastější mutace a zesiluje tak riziko vzniku trombózy až dvacetinásobně (Emmerich, 2001).

V rodině, kde se trombóza vyskytla, je riziko VTE 3x větší u pacientů s FV Leidenskou mutací, pětinásobně pak u pacientů, v jejichž rodině se trombóza vyskytla před dosažením 50 let. v rodině, kde se trombóza vyskytla u dvou a více příbuzných je riziko vyšší až osmnáctinásobně (Kujovich, 2010).

Získané trombofilní poruchy

Mezi získané rizikové predispozice pro vznik trombózy se řadí spousta různých faktorů a stavů. Tyto faktory a stavy většinou samy o sobě srážení krve nezpůsobují, lze je ale připojit k vrozeným trombofiliím, kde pak zvyšují riziko nemoci až několikanásobně. Nadále se ještě toto riziko zvyšuje s počtem přidružených získaných stavů. Nejvíce ovlivněné získanými faktory jsou ženy, jelikož ve svém životě jsou častokrát několika specifickým situacím vystaveny, jako jsou například těhotenství, hormonální změny a užívání hormonální antikoncepce.

Těhotenství

U těhotných žen se díky zvětšujícímu se plodu zvyšuje tlak na okolní žíly, čímž dochází ke zpomalení toku krve a k tomu se dále přidává fyziologická těhotenská hyperkoagulace (Kvasnička, 2003). Těhotenská hyperkoagulace je ovlivňována estrogenem, který zvyšuje hladinu některých koagulačních faktorů, zároveň přispívá k vzrůstu koncentrace inhibitorů fibrinolýzy a dále také dochází k snížení hladiny proteinu C a proteinu S (Urbánková, 2002). Dokonce i placenta podporuje svou syntézou zvýšení hladiny některých inhibitorů (Kvasnička, 2003).

Tyto změny využívá tělo těhotné ženy k tomu, aby ho fyziologicky ochránilo před zvýšenou ztrátou krve při porodu (Urbánková, 2002). U žen, které mají dědičně podmíněnou trombofilii, může těhotenství znamenat vyšší riziko trombotické příhody, kterou kromě žilního tromboembolismu mnohdy doprovází i závažné komplikace, jako jsou například spontánní potrat, porod mrtvého plodu, předčasné odloučení placenty, retardace nitroděložního růstu, nebo časný rozvoj preeklampsie (Poul, 2006).

Nebezpečí vzniku venózního tromboembolismu (VTE) je u gravidních žen 6x až 10x vyšší než u netěhotných žen stejného věku. VTE postihuje 1 ženu z 1000 těhotných pacientek (Kessler, 2006). Nejobvyklejší příčinou mortality v těhotenství či šestinedělí jsou plicní embolie (Poul, 2006). Na riziko vzniku venózního tromboembolismu má dále vliv věk, etnika, obezita a také vrozené hyperkoagulační stavy (Kessler, 2006).

Hormonální antikoncepce

K životu snad každé mladé dívky či ženy neodmyslitelně patří antikoncepce. Existuje spousta antikoncepčních metod, nejznámější a u nás nejpoužívanější je hormonální antikoncepce neboli hormonální kombinovaná antikoncepce (COC), která spadá mezi nejvíce diskutované rizikové faktoru tromboembolické nemoci (Koliba, 2007). Užívání hormonální antikoncepce zvyšuje riziko vzniku tromboembolické nemoci čtyřnásobně, v případě, kdy se k tomu přidá heterozygotní forma FV Leiden, zvýší se riziko až 30tinásobně, u homozygotek může být riziko až 100násobné (Grody, 2007). U 20 – 60 % nosiček heterozygotní formy Leidenské mutace, které užívají hormonální antikoncepci, se žilní tromboembolie vyskytne (Kujovich, 2010).

Dle současných odhadnutí užívá hormonální antikoncepci více než 100 milionů žen po celém světě (Dulíček, 2002). v České republice je užívána zhruba 34 procenty žen v plodném období života (Koliba, 2007). Spojitost COC se zvýšeným rizikem vzniku VTE je nám známa už přes 40 let (Dulíček, 2002). Poprvé tuto spojitost popsal pan Jordan u pacientky, u které se po nasazení hormonální antikoncepce projevila plicní embolie. Tyto obtíže byly přikládány velkému množství estrogenu EED (ethinylestradiol) v přípravcích (Dulíček, 2002). Následné pokusné snižování estrogenu v preparátech až na koncentraci 50µg EED opravdu vedlo ke snížení rizika vzniku venózního tromboembolismu a dalším snižováním koncentrace EED už nebyl tento jev dále sledován (Hadačová, 2012).

2.6.2 Znaky k vyšetření přenašečství FV Leidenské mutace

Vyšetření na mutaci faktoru v Leiden je doporučováno v těchto případech:

- každá žilní trombóza ve věku pod 50 let,
- žilní trombóza v nezvyklých místech (jaterní, mezentrické, mozkové cévy),
- trombóza u těhotných žen nebo u žen užívajících hormonální antikoncepci,

- žilní trombóza a silná rodinná anamnéza trombotického onemocnění,
- příbuzní osob s žilní trombózou ve věku pod 50 let,
- infarkt myokardu u žen kuřaček ve věku pod 50 let.

Jsou také indikace, které by měly být zváženy specialistou. Patří mezi ně:

- žilní trombóza ve věku nad 50 let, kromě případů s přítomností maligního onemocnění,
- příbuzní osob, u kterých je známa přítomnost FV Leidenské mutace, plánují-li těhotenství či užívání hormonální antikoncepce,
- ženy s opakujícími se potraty, s nevysvětlitelnou těžkou preeklampsií, odloučením placenty, nitroděložním zpomalením růstu nebo narozením mrtvého dítěte (Grody, 2007).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je stanovit frekvenci výskytu FV Leidenské mutace u pacientů ambulance hematologické laboratoře Nemocnice České Budějovice a.s. Dílčím cílem této práce je pak stanovení vztahu mezi FV Leiden a ACP a určení negativní predikce FV Leiden.

4. MATERIÁLY A METODIKA

4.1 Odběr krve a její zpracování

K tomu, aby nedošlo k ovlivnění výsledku měření, je třeba při odběru biologického materiálu dodržet základní pravidla. i přes dodržení základních pravidel je možné, že výsledek bude zkreslený, a to jevy, jako jsou stav pacienta, chyby při zpracování vzorku nebo také například chybná interpretace výsledků.

Nejčastěji ke zkreslení výsledků dochází v preanalytické části odběru vzorku, proto je důležité, aby pacienti, kteří se odběru účastní, byli dostatečně informováni. Je nezbytné pacientům doporučit, aby na odběry přicházeli nalačno a nejlépe v ranních hodinách. Nedoporučuje se hladovění či dehydratace, stejně tak není vhodné den před odběrem konzumovat tučná jídla. v tučných jídlech jsou totiž obsaženy tuky, které způsobují přítomnost tukových částic v séru nebo v plazmě a právě kvůli tomu by mohlo také dojít ke zkreslení výsledků.

Nejzásadnější vliv mají úkony vykonané během odběru. Mezi ně například patří poloha pacienta během odběru, použití dezinfekčních přípravků nebo samotný způsob odběru vzorku. Dalším příkladem může být situace při nabírání krve do jehly, kdy je třeba nutně předejít nadměrnému podtlaku, jež by mohlo způsobit tzv. mechanickou hemolýzu, čímž by byl výsledek výrazně zkreslen (Racek, 2006). K hemolýze vzorku také může dojít i při špatném poměru antikoagulačního činidla, a to při užití velmi silné jehly nebo při uchování vzorku při špatné teplotě (Kopřivová, 2013). Takto špatně odebrané vzorky ani kolikrát není možné vyšetřit a je třeba udělat odběry nové.

Vzorky krve se odebírají do připravených zkumavek, které podle daného vyšetření rozlišujeme barvou uzávěru. v nemocnici v Českých Budějovicích se k odběrům využívá tzv. systém Becton Dickinson Vacutainer.

Vzorek krve, potřebný ke zjištění poruch srážlivosti krve vedoucí k hyperkoagulačním stavům, je odebírán do vakuových zkumavek, ve kterých je obsažen 3,8% citrát sodný jako antikoagulační činidlo. Toto protisrážlivé činidlo váže vápenaté ionty a tím zabraňuje nechtěné koagulaci. Při odběru krve do zkumavek s protisrážlivým činidlem je nutné dodržovat předepsaný poměr odebrané krve k objemu roztoku antikoagulantu. v našem případě je poměr krve a citrátu sodného 9 : 1, tedy 9 dílů krve a 1 díl citrátu. Dále je

po odběru třeba několikerým otočením obsah zkumavky promíchat. Jestliže dojde k nesprávnému poměru krve a protisrážlivého činidla nebo k náběru krve do jiné zkumavky, jedná se o velmi závažnou chybu, které by se zdravotní pracovník neměl dopustit.

Po odběru musí být vzorek krve nejpozději do dvou hodin zcentrifugována podle typu vyšetření. Centrifugace způsobuje oddělení frakce krvinek od dekalcifikované plazmy. Poté je plazma odpipetována, správně označena a určena k následnému stanovení.

4.2 Hematologie

Mezi základní hemokoagulační vyšetření patří stanovení APC rezistence, Lupus antikoagulant, dále také funkční hladiny proteinu C a proteinu S a antitrombinu III. K těmto vyšetření i screeningové testy protrombinového času (PT) a aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT).

APC rezistence

Jedná se o obměnu aPTT testu. Princip tohoto testu je měření aktivovaného parciálního tromboplastinového času za přítomnosti APC a bez přítomnosti aktivovaného proteinu C. Odstraněním rušivých vlivů v koagulační kaskádě se zvyšuje síla a specifita a právě toho je docíleno tím, že je přidána insuficientní plazma pro faktor v do plazmy vyšetřované.

Následně je vzorek plazmy inkubován při teplotě 37°C společně s hadím jedem. Během prvního měření se spouští koagulace přidáním APC s vápenatými ionty, které jsou obsaženy v $CaCl_2$. Při druhém měření se přidávají jen vápenaté ionty. Ve chvíli, kdy se koagulace spustí, je měřen čas až do chvíle vzniku prvního fibrinového vlákna. Výsledek vyjadřujeme časem potřebným k utvoření prvního fibrinového vlákna či výpočtem poměru dvou měření: APC rezistence = čas aPTT s APC / čas aPTT bez APC. Jako pozitivní výsledek můžeme považovat buď čas pod 90 sekund, s tím, že šedá zóna je ohraničena v rozmezí 90 – 110 sekund, nebo hodnotu poměru $\leq 1{,}2$. Šedou zónou máme na mysli rozmezí, které je individuální pro každou laboratoř. v šedé zóně se neobjevují patologické hodnoty, ale vyskytuje se zde zvýšená pravděpodobnost záchytu dědičného deficitu a právě proto jsou i tyto vzorky posílány na genetické vyšetření.

4.3 Laboratoř genetiky

Často využívané metody ke zjištění bodové mutace FV Leiden a mutace pro protrombin vycházejí ze zvýšení specifického cílového místa DNA polymerázovou řetězovou reakcí. K tomuto stanovení je nutné, aby DNA byla čistá.

V laboratoři genetiky se využívá metoda Genomic DNA Mini Kit. Proces této metody je jednoduchý a účinný k získání purifikované DNA ze vzorku a izolace spočívá ve snadném procesu lýzy buněk a uchycení DNA na kolonce.

V lyzačním roztoku jsou obsaženy chaotropní soli, které porušují intramolekulární vodíkové vazby mezi dusíkatými bázemi DNA a tím ji denaturují. K tomu, aby se vyřadily bílkoviny, přidává se do vzorku 96% etanol, který zajistí jejich precipitaci, dále tomuto procesu ještě pomůže centrifugace a inkubace. Promývajícím pufrem jsou z roztoku odstraněny znečišťující látky. Poté je možné už čistou DNA uvolnit elučním pufrem do nové mikrozkumavky. Takto zpracovaná DNA má okolo 20 – 30 kb a je vhodná k využití v PCR (Geneaid, 2008).

PCR je cyklická reakce, která slouží k zvýraznění určitého úseku molekuly DNA. Provádí se v mikrozkumavce, která obsahuje vzorek templátové dsDNA s cílovou sekvencí. Dále se do mikrozkumavky přidává roztok SuperHot master mix, který obsahuje DNA polymerázu, PCR pufr, čtyi druhy dNTP a kofaktor MgCl2. Roztok se dále doplní směsí specifických primerů a sond. Pro FV Leidenskou mutaci se využívá směs dvou primerů o délce 22 nukleotidů.

Tato reakční směs se připravuje přesně na počet vzorků a navíc 2 pozitivní kontroly a jedna negativní kontrola amplifikace, jež kontrolují citlivost reakce. Jako pozitivní kontroly jsou vybírány DNA pozitivních pacientů na FV Leidenskou mutaci nebo pro protrombin. První kontrola obsahuje mutantního homozygota, druhá obsahuje DNA heterozygota (Fialová, 2012). Amplifikace a detekce probíhá v přístroji Rotor-Gene Q, kde je vzorek opakovaně vystaven měnícím se teplotám.

Přístroj Rotor-Gene Q obsahuje software, který dokáže automaticky rozpoznat fluorescenci amplikonů. Díky kanálům Yellow a Green jsou rozpoznávány 3 typy – wild type, mutovaný homozygot a heterozygot. Každá analýza je následně zkontrolována a vyhodnocena kvalifikovaným pracovníkem, výsledky jsou uloženy na disku, zapsány do

laboratorního systému, vytištěny a samozřejmě předány genetikovi ke klinické interpretaci (Scheinost, 2012).

5. VÝSLEDKY

5.1 Frekvence výskytu FV Leidenské mutace

Ke zjištění frekvence výskytu FV Leidenské mutace bylo analyzováno celkem 1013 vzorků. Z toho bylo 610 vzorků od žen a 403 vzorků od mužů. Všechny vzorky pochází z ambulance hematologické laboratoře Nemocnice České Budějovice a.s. z roku 2015.

U žen byl nejčastější výskyt heterozygotní formy FV Leidenské mutace ve věku 44 – 53 let, o něco méně pak ve věkovém rozmezí 14 – 23 let a 34 – 43 let. Nejnižší prevalence heterozygotní formy této mutace je pouze 1 žena z 18 a to ve věku nad 74 let (konkrétně u této ženy to byl věk 75 let). Homozygotní forma FV Leidenské mutace byla zaznamenána ve dvou případech, konkrétně u žen ve věku 48 let a 64 let (Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Výskyt heterozygotní a homozygotní formy FV Leidenské mutace žen v závislosti na jejich věku

	Wild type	Heterozygot	Homozygot
14 – 23 let	86	22	0
24 – 33 let	83	18	0
34 – 43 let	117	23	0
44 – 53 let	97	26	1
54 – 63 let	48	9	0
64 – 73 let	49	12	1
74 a více let	17	1	0
Celkem	497	111	2

Zdroj: Vlastní šetření.

U mužů je největší výskyt heterozygotní formy mutace ve věku 54 – 63 let, o něco nižší pak v rozmezí 34 – 43 let a také 44 – 53 let. Nejnižší výskyt heterozygotní formy FV

Leidenské mutace u mužů je ve věku nad 74 let a to konkrétně 2 muži z 19 tohoto věku. Na rozdíl od žen, u mužů se vyskytlo i pár případů s homozygotní formou FV Leidenské mutace, a to dokonce 5 případů. Jedná se o 3 muže ve věku 34 – 43 let a 2 muže ve věku 64 – 73 let. Výsledky zobrazuje tabulka č. 2.

Tabulka č. 2: Výskyt heterozygotní a homozygotní formy FV Leidenské mutace mužů v závislosti na jejich věku

	Wild type	Heterozygot	homozygot
14 – 23 let	35	10	0
24 – 33 let	37	14	0
34 – 43 let	56	17	3
44 – 53 let	61	17	0
54 – 63 let	67	18	0
64 – 73 let	37	10	2
74 a více let	17	2	0
Celkem	310	88	5

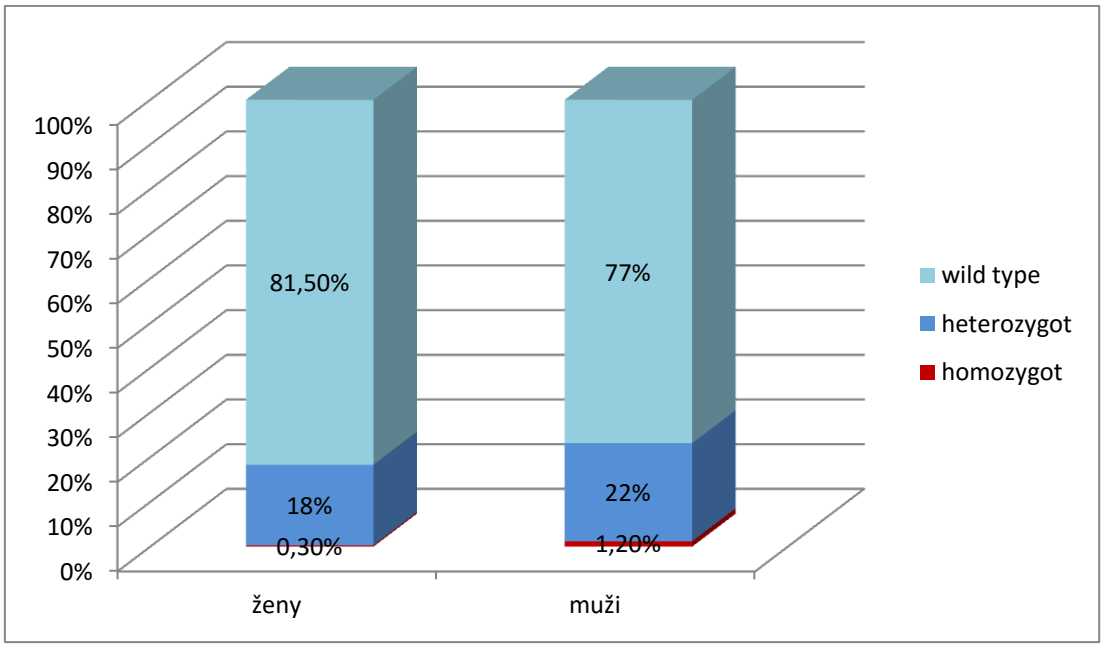
Zdroj: Vlastní šetření.

Z celkem 610 vzorků od žen bylo zjištěno 111 heterozygotních stavů mutace, což odpovídá zhruba 18%. Homozygotní formu mutace z celkového počtu vzorků žen byla zaznamenána ve dvou případech, tedy 0,3 %.

U mužů, z celkového počtu 403 vzorků, jsme zjistili 88 heterozygotních stavů FV Leidenské mutace, jež odpovídá 22 % a homozygotní formy této mutace bylo u mužů zjištěno 5 případů, tedy 1,2 %.

Z výsledků nelze vyvodit, že by mělo na prevalenci FV Leidenské mutace vliv pohlaví. Z následujícího grafu lze vyčíst, že frekvence genotypů FV Leidenské mutace jsou u žen téměř totožné jako u mužů (Graf 1).

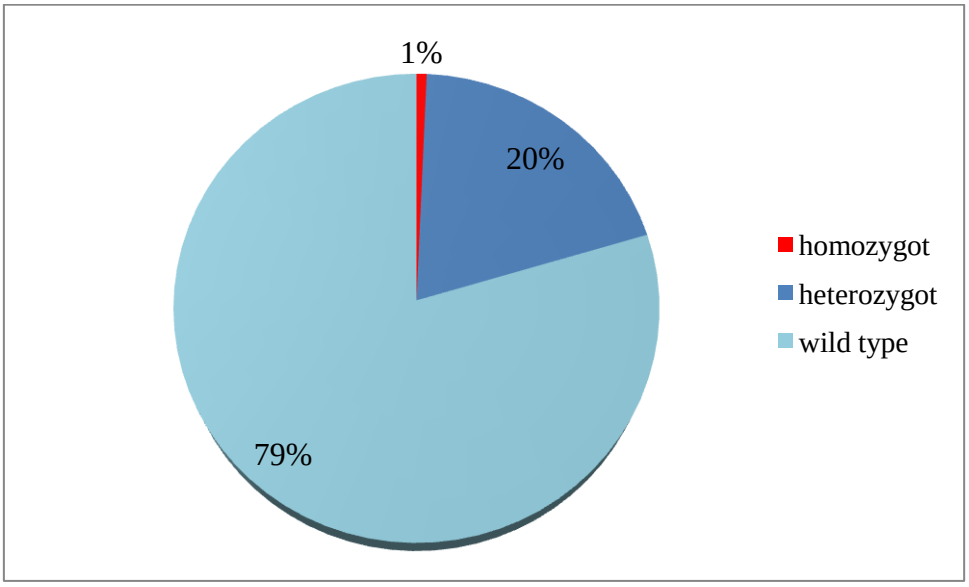
Graf 1: Frekvence genotypů FV Leidenská mutace v závislosti na pohlaví



Zdroj: Vlastní šetření.

Jak je vidět v grafu 2, celková prevalence FV Leiden v heterozygotní formě mutace je 19,6 % a v homozygotní formě se jedná o 0,69 %.

Graf 2: Vyjádření všech analyzovaných vzorků v procentech



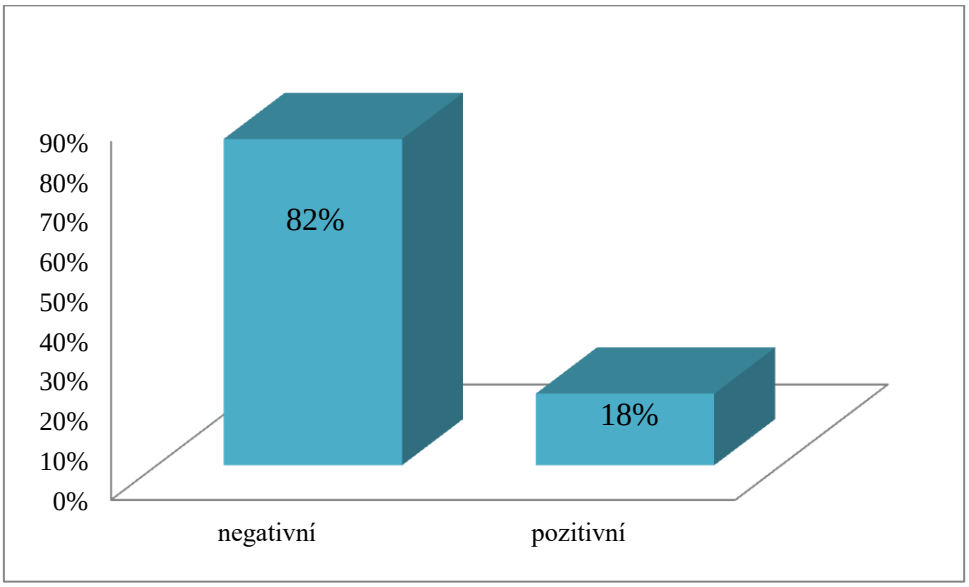
Zdroj: Vlastní šetření.

5.2 Vztah FV Leiden a APC a určení negativní predikce FV Leiden

Leidenská mutace způsobuje poruchu vazby proteinu C na faktor V, tím vznikají různě závažné rezistence na aktivovaný protein C. Pokud dochází k prodloužení aPTT po přidání aPC, tak je přítomnost Leidenské mutace nepravděpodobná, neboli predikce je negativní. Prodloužení by mělo být alespoň 1,5x, proto jako hranice bývá považován poměr 1,5.

Stanovení negativní predikce bylo provedeno u 600 pacientů, kteří byli vyšetřováni na hyperkoagulační stavy. Hodnotu APCR vyšší než 1,5 mělo z šestiset vyšetřovaných mělo celkem 493 pacientů, což odpovídá 82 % (Graf 3).

Graf 3: Zastoupení negativní predikce FV Leiden



Zdroj: Vlastní šetření.

Zajímavé je, že v literatuře se udává, že zhruba 5 % vyšetřovaných má jasně pozitivní aPCR, aniž by byla přítomna Leidenská mutace. Příčina není jasná, spekuluje se o jiném vazebném místě, vazbě na FVIII apod., jisté však je, že i tito pacienti jsou hyperkoagulační.

6. DISKUZE

Faktor v Leidenská mutace je považována za nejčastější vrozenou trombofilii v evropské populaci. Vědění o jejím nositelství velmi ovlivňuje léčbu a prevenci venózní trombózy, stejně tak i léčbu komplikací u těhotných žen či rozhodnutí o užívání hormonální antikoncepce (Grody, 2007). Vyšetření hyperkoagulačních stavů by se měli podrobit osoby, u kterých se vyskytuje venózní tromboembolismus na neobvyklém místě nebo ve věku nižším než je 45 let. Dále by měli být vyšetřeny osoby s pozitivní anamnézou v rodině a ženy, které prodělaly spontánní potrat.

K zjišťování FV Leidenské mutace se využívají sekulárně – biologické metody, které spočívají na amplifikaci DNA. V této práci byly frekvence výskytu FV Leidenské mutace získány z dat ambulance hematologické laboratoře Nemocnice České Budějovice a.s., kde se k detekci Leidenské mutaci využívá metoda Real-time PCR.

Podle různých studií, se názory na provádění testů liší. Dle některých studií by bylo dobré provádět testy u všech pacientů se zvýšeným rizikem trombózy, někteří uvádějí riziko pouze u heterozygotních nosičů. Dalším názorem je, že by měla být zahájena celoživotní antikoagulační terapie u všech pacientů se zvýšeným rizikem recidivy trombózy aj. Někteří lékaři by byli pro zavedení vyšetření na přenašečství FV Leidenské mutace u žen, které se rozhodují nad užíváním hormonální antikoncepce. Vzhledem k tomu, že podle posledních předpokladů, užívá hormonální antikoncepci přes 100 milionů žen po celém světě, jedná se u tak velké populace o velkou nákladovost vyšetření. Také se musí zohlednit riziko, že ženy s FV Leidenskou mutací by se musely spoléhat na jiné antikoncepce, povětšinou méně účinné než HA, tím by se mohl zvýšit počet těhotenství a tím pádem i počet těhotenských komplikací (Grody, 2007).

Na základě jiných studií je prevalence FV Leidenské mutace ve zdravé populaci okolo 3 %, studie zaměřená na prevalenci FV Leiden v České republice uvádí rozmezí výskytu od 3 do 15 %. Zastoupení homozygotů se udává 0,5 % a frekvence výskytu heterozygotní formy mutace se vyskytuje okolo 14 %. Výsledky této práce prokázaly celkem 7 homozygotních nosičů FV Leidenské mutace z celkových 1013 vyšetřovaných, což je nějakých 0,07 %, u heterozygotní formy nám výskyt vychází zhruba na 20 %. Ve srovnání s výsledky studií, jsou mnou zjištěné a vypočítané hodnoty o něco vyšší. Vysvětlením pro rozdílné hodnoty může být rozdílná skupina testovaných pacientů. Ve výše zmíněných

studiích se zabývali zdravou populací, zatímco v ambulanci hematologické laboratoře Nemocnice České Budějovice byly testovány hlavně osoby s předpokládaným výskytem dědičné trombofilie.

7. ZÁVĚR

Během vypracování této práce jsem si osvojila postupy analýzy FV Leidenské mutace. Díky tomu jsem stanovila frekvence výskytu faktor v Leidenské mutace z dat získaných z hematologické laboratoře Nemocnice České Budějovice. Výskyt FV Leidenské mutace testovaných pacientů je o něco vyšší, než je výskyt uváděn v literatuře. Dále jsem zjistila, že negativní predikce FV Leiden se dá určit díky vztahu s APC.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APC	aktivovaný protein C
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
Arg	arginin
AT	antitrombin
C4bBP	C4b – binding protein, protein vázající C4b složku komplementu
FI – FXIII	koagulační faktory
FIa – FXIIIa	aktivované koagulační faktory
HMWK	vysokomolekulární kininogen
kDa	kilo Dalton
PAI	aktivátor plazminogenu
PT	protrombinový čas
PTA	plasma tromboplastin antecedent
TAFI	trombinem aktivovatelný inhibitor fibrinolýzy
TEN	tromboembolitická nemoc
tPa	tkáňový aktivátor pazminogeenu (tissue-type plasminogen activator)
VTE	venózní tromboembolie
VWF	Von Wilebrandův faktor

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BAKER, R. a MURRAY, R. K. *PDQ biochemistry*. Hamilton, Ont.: BC Decker, c2001, s. 111. ISBN 1550091506.

2. KITTNAR, O. *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, s. 145-152. ISBN 9788024730684.

3. KUBISZ, P. a kolektiv *Hematológia a transfuzológia: učebnica*. 1. vydání. Praha: Grada, Bratislava: Grada Slovakia, 2006, 323 s. ISBN 80-8090-000-0.

4. MAREK, J. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2010, s. 265-267. ISBN 9788024726397.

5. MATÝŠKOVÁ, M., ZAVŘELOVÁ, J., HRACHOVINOVÁ, I., *Hematologie pro zdravotní laboranty, 2. díl Krevní srážení,* Brno: IDVPZ, 1999. ISBN 80-7013-278-1.

6. PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patofyziologie hemostázy*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2004. ISBN 80-866-8203-X.

7. PENKA, M.. *Hematologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2001, 201 s. ISBN 80-247-0023-9.

8. PENKA, M., KRAHULCOVÁ, E., MATÝŠKOVÁ, M., *Hematologie: učební text pro PSS*, 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1994, 110 s. ISBN: 80-7013-162-4.

9. PENKA, M., BULIKOVÁ, A., *Neonkologická hematologie,* 2. vyd. Praha: Grada, 2009, 240 s., ISBN: 978-80-247-2299-3.

10. PENKA, M. a TESAŘOVÁ E. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 421 s., ISBN 978-802-4734-590.

11. RACEK, J. *Klinická biochemie 2.*, přeprac. Vyd Praha: Galén, 2006, s. 23 – 31. ISBN 80-726-2324-9.

12. TROJAN, S., et al. Lékařská fyziologie. 4. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2003. 772 s. ISBN 80-247-0512-5.

Odborné články a publikace:

1. DULÍČEK, P., Kalousek J., Malý J. *Hormonální antikoncepce a tromboembolická nemoc- jak je to ve skutečnosti.* Interní medicína pro praxi 8/2002. ISSN 1212-7299.
2. HADAČOVÁ, I. *Trombóza a hormonální antikoncepce u mladistvých dívek.* Pediatrie pro praxi. 2012, 13(4), 225-226. ISSN 1213-0494.
3. HEIT, J. A., *Thrombophilia: Common Questions on Laboratory Assessment and Management*, The Education Program Of American Society of Hematology, 2007.
4. KESSLER, P. Trombofilní stavy. 2006, Interní Med. 9: 374–379
5. KOLDE, H. J. *Haemostasis*. Basel:Pentapharm Ltd. 2004.
6. KOLIBA, P. *Rizika a přínos hormonální antikoncepce.* 2007. Interní medicína pro praxi 9/2007, 520-524. ISSN 1212-7299.
7. KOPŘIVOVÁ, O. *Laboratorní příručka*. Nemocnice České Budějovice, 2013.
8. KREIDY, R. Factor v *Leiden Mutation: a Comnmon Risk Factor for Venous Thrombosis among Lebanese Patients. Thrombosis*, 2012, 4 p.
9. KVASNIČKA, J. *Žilní a tepenná trombofilie*. 2003, Interv Akut Kardiol.
10. PROCHÁZKA, M., a kol. *Trombofilní stavy v porodnictví - I. část*., 2004, Prakt. Gyn., 4: 12-17.
11. POUL, H. *Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci.* 2006, Vnitřní lékařství 12, : 17-25.
12. RAUŠOVÁ, E., HADAČOVÁ, I., MACEK, M. *Hereditární trombofilie- jeden z modelů molekulární medicíny*. 2005, Klin. Biochem. Metab., 13 (34), 2: 68-76.
13. SCHEINOST, O. *Stanovení mutace genu pro faktor v Leiden (FVL) metodou PCR v reálném čase.* České Budějovice: Nemocnice České Budějovice a.s. 2012

14. URBÁNKOVÁ, J., CHOCHOLA M., VAŘEJKA P., JIRÁT S., HELLER S., KARETOVÁ D. a ASCHERMANN M. *Hyperkoagulační stav a hluboká žilní trombóza.* Kardiologická revue 4/2002, 282-284. ISSN 2336-288X.

Internetové a ostatní zdroje:

1. EMMERICH, J., et al. *Combined effect of factor v Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism*--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. Thromb Haemost. 2001. 86(3):809-16.

2. EMSLEY, J.; MCEWAN, P. A. a GAILANI, D. *Structure and function of factor XI. Blood* [online]. 2010-04-01, vol. 115, issue 13, s. 2569-2577 [cit. 2015-11-13]. DOI: 10.1182/blood-2009-09-199182.Dostupné z:<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-09-199182>.

3. GRODY, W. W., et al. *American College of Medical Genetics Consensus Statement on Factor v Leiden Mutation Testing*. 2007. [online] [cit. 2016-04-1]. Dostupné z: http://www.acmg.net/resources/policies/pol-009.asp

4. KISIEL, W.r; FUJIKAWA, K. a DAVIE, E. W. *Activation of bovine factor VII (proconvertin) by factor XIIa (activated Hageman factor). Biochemistry* [online]. 1977, vol. 16, issue 19, s. 4189-4194 [cit. 2016-1-06]. DOI: 10.1021/bi00638a009. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00638a009>.

5. LEYTUS, S. P.; FOSTER, Donald C.; KURACHI, Kotoku a DAVIE, Earl W. *Gene for human factor X: a blood coagulation factor whose gene organization is essentially identical with that of factor IX and protein C. Biochemistry* [online]. 1986, vol. 25, issue 18, s. 5098-5102 [cit. 2016-3-13]. DOI: 10.1021/bi00366a018. Dostupné z:< http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00366a018>.

6. ŠLECHTOVÁ, J. *Hemostáza – jak ji možná neznáte*. Klin. Biochem. Metab., 2007. [cit. 2016-3-13] Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2007/2-07/KBM0702_Slechtova_97.pdf

10. Seznam obrázků, tabulek, grafů

Obrázek č. 1: Schéma koagulačního systému 6
Obrázek č. 2: Schéma fibrinolýzy 8
Obrázek č. 3: Aktivace a degradace faktoru v a faktoru v Leiden 11

Tabulka č. 1: Výskyt heterozygotní a homozygotní formy FV Leidenské mutace žen v závislosti na jejich věku 20
Tabulka č. 2: Výskyt heterozygotní a homozygotní formy FV Leidenské mutace mužů v závislosti na jejich věku 21

Graf 1: Frekvence genotypů FV Leidenská mutace v závislosti na pohlaví 22
Graf 2: Vyjádření všech analyzovaných vzorků v procentech 22
Graf 3: Zastoupení negativní predikce FV Leiden 23

11. Přílohy

Příloha 1: Analyzovaná data pro rok 2015 – FV Leidenská mutace

Příloha 2: Analyzovaná data pro rok 2015 – Hyperkoagulace

Příloha 1: Analyzovaná data pro rok 2015 – FV Leidenská mutace

Datum příjmu	Rodné číslo	DNA_Leiden
02.01.2015	8758251534	heterozygot
02.01.2015	7851151428	heterozygot
02.01.2015	7909091420	heterozygot
02.01.2015	515421101	wild type
05.01.2015	9554011158	heterozygot
05.01.2015	7758173081	wild type
05.01.2015	9561201891	wild type
05.01.2015	9205161877	wild type
06.01.2015	435404931	wild type
06.01.2015	441106954	heterozygot
06.01.2015	7351071188	wild type
07.01.2015	485128874	wild type
07.01.2015	6710110516	wild type
07.01.2015	5908070442	wild type
07.01.2015	7761301349	wild type
07.01.2015	7210172617	wild type
07.01.2015	461103903	wild type
07.01.2015	9751161133	wild type
07.01.2015	8161011066	wild type
07.01.2015	6462220973	wild type
07.01.2015	7606141113	heterozygot
07.01.2015	5608252407	wild type
07.01.2015	9357181602	wild type
07.01.2015	7356071865	wild type
07.01.2015	7406201373	heterozygot
07.01.2015	8560181244	wild type
07.01.2015	7958291538	wild type
07.01.2015	455628922	wild type
07.01.2015	485128874	wild type
08.01.2015	6451081603	heterozygot
09.01.2015	9960151156	heterozgyot
09.01.2015	7457301433	heterozygot

09.01.2015	6951231440	wildtype
09.01.2015	8954162007	wild type
09.01.2015	6705122753	wild type
12.01.2015	7008098987	heterozygot
13.01.2015	8161091058	heterozygot
13.01.2015	5855170749	wild type
13.01.2015	320500970	wild type
13.01.2015	9652271265	heterozygot
13.01.2015	6760010245	wild type
14.01.2015	7451231534	wild type
14.01.2015	54111452	wild type
14.01.2015	7711121571	wild type
14.01.2015	525210907	homozygot
15.01.2015	7902071088	wild type
15.01.2015	7956191517	wild type
15.01.2015	8260271216	wild type
15.01.2015	9111201252	wild type
15.01.2015	6705081173	wild type
15.01.2015	7955061575	wild type
15.01.2015	7054257198	wild type
15.01.2015	8255031553	wild type
16.01.2015	6505060682	wild type
16.01.2015	8056201086	heterozygot
16.01.2015	6210230872	wild type
16.01.2015	9103171516	heterozygot
16.01.2015	7804111523	homozygot
16.01.2015	6857141741	wild type
19.01.2015	8952121551	wild type
20.01.2015	6106110922	wild type
21.01.2015	8358241814	wild type
21.01.2015	6101140803	wild type
21.01.2015	51061460	wild type
21.01.2015	5902080590	wild type
21.01.2015	8860221369	heterozygot
22.01.2015	6954221196	wild type
22.01.2015	7055071187	heterozygot
23.01.2015	9107282810	wild type
23.01.2015	9760031456	heterozygot
23.01.2015	7211171098	heterozygot
23.01.2015	8754031582	wild type
23.01.2015	505313217	wild type

23.01.2015	415213611	wild type
23.01.2015	8553163244	wild type
23.01.2015	8053311342	wild type
23.01.2015	6551281648	heterozygot
23.01.2015	8059261055	wild type
23.01.2015	8251041061	wild type
26.01.2015	6405199910	heterozygot
27.01.2015	7056151475	wild type
28.01.2015	8451073960	heterozygot
28.01.2015	7405270696	wild type
28.01.2015	8009090517	wild type
28.01.2015	9362171576	wild type
28.01.2015	9558101552	wild type
28.01.2015	7152171520	wild type
28.01.2015	5805041626	wild type
29.01.2015	490101973	wild type
30.01.2015	6453090170	wild type
30.01.2015	8855271534	wild type
30.01.2015	7654281491	wild type
30.01.2015	7062241570	wild type
02.02.2015	5701160607	wild type
03.02.2015	475121915	heterozygot
03.02.2015	8509201315	heterozygot
03.02.2015	410925801	wild type
03.02.2015	6355020143	wild type
03.02.2015	5457122263	wild type
03.02.2015	5560010510	wild type
03.02.2015	465403978	wild type
03.02.2015	6002240342	heterozygot
03.02.2015	7512021483	wild type
03.02.2015	9806151453	wild type
04.02.2015	9760201472	wild type
04.02.2015	7709171546	wild type
04.02.2015	8008091530	wild type
05.02.2015	6801232206	wild type
05.02.2015	7760204198	wild type
06.02.2015	7252191418	heterozygot
10.02.2015	9811121528	wild type
10.02.2015	9061271207	wild type
10.02.2015	456279878	heterozygot
10.02.2015	8359013607	wild type

10.02.2015	7854241097	wild type
10.02.2015	6454209882	wild type
10.02.2015	7153171068	wild type
10.02.2015	8102051561	wild type
10.02.2015	7007251074	wild type
11.02.2015	9359091620	wild type
11.02.2015	6009121205	wild type
11.02.2015	7657081519	wild type
11.02.2015	8459091519	wild type
11.02.2015	9954091300	wild type
12.02.2015	9852251551	wild type
12.02.2015	8662151937	wild type
12.02.2015	7708041824	heterozygot
12.02.2015	520408093	wild type
13.02.2015	9558261602	wild type
13.02.2015	475424947	wild type
13.02.2015	6909271478	wild type
13.02.2015	8751211380	heterozygot
16.02.2015	257091559	wild type
16.02.2015	257091559	wild type
17.02.2015	525910067	wild type
17.02.2015	8709241243	wild type
17.02.2015	6759191317	heterozygot
17.02.2015	5903030121	wild type
18.02.2015	7251231569	wild type
18.02.2015	6406240488	wild type
18.02.2015	300623853	wild type
18.02.2015	9454181142	wild type
19.02.2015	7109121579	wild type
19.02.2015	515822964	heterozygot
20.02.2015	9253291464	heterozygot
20.02.2015	8709131529	heterozygot
20.02.2015	9102041453	wild type
20.02.2015	8654041670	wild type
23.02.2015	7460231580	heterozygot
23.02.2015	8605183773	wild type
24.02.2015	9661161135	wild type
25.02.2015	9751121599	wild type
25.02.2015	9855271612	wild type
25.02.2015	7705131543	wild type
25.02.2015	8057221061	wild type

26.02.2015	6204280213	wild type
26.02.2015	6102190423	wild type
26.02.2015	7204131252	wild type
26.02.2015	7655061094	heterozygot
26.02.2015	7861281075	wild type
26.02.2015	466123888	wild type
26.02.2015	8258121431	wild type
26.02.2015	491004143	heterozygot
26.02.2015	9056091461	wild type
26.02.2015	8151051270	wild type
26.02.2015	6760260649	wild type
26.02.2015	5660211336	wild type
26.02.2015	9055121162	wild type
26.02.2015	6761181437	wild type
27.02.2015	8801151589	wild type
03.03.2015	6657029851	heterozygot
03.03.2015	9756151514	wild type
04.03.2015	9306251459	wild type
04.03.2015	6360131645	heterozygot
04.03.2015	525331033	heterozygot
04.03.2015	491007971	wild type
05.03.2015	425923904	wild type
05.03.2015	262291149	heterozygot
05.03.2015	7456131099	wild type
05.03.2015	7302101223	wild type
05.03.2015	7653091192	wild type
05.03.2015	495601010	wild type
05.03.2015	5909180056	wild type
05.03.2015	470916939	wild type
05.03.2015	9759201198	wild type
05.03.2015	9261131153	wild type
05.03.2015	5862109868	wild type
05.03.2015	360902871	wild type
05.03.2015	406114914	wild type
05.03.2015	7058251188	heterozygot
05.03.2015	7802171057	wild type
06.03.2015	6007040357	wild type
06.03.2015	9857251568	heterozygot
06.03.2015	8955091166	wild type
06.03.2015	9201041464	wild type
06.03.2015	7704101118	wild type

09.03.2015	8954031514	wild type
09.03.2015	535119171	heterozygot
09.03.2015	154271303	wild type
10.03.2015	5603040167	wild type
10.03.2015	530330995	wild type
10.03.2015	7008211088	heterozygot
10.03.2015	8356031199	heterozygot
10.03.2015	8957091142	heterozygot
10.03.2015	7655081675	heterozygot
10.03.2015	9555181140	wild type
10.03.2015	7559231085	wild type
10.03.2015	8152030633	wild type
10.03.2015	7505121095	heterozygot
10.03.2015	7407241434	wild type
10.03.2015	476008886	wild type
11.03.2015	6008181222	wild type
11.03.2015	6606121675	wild type
11.03.2015	5607180215	wild type
11.03.2015	5562271527	heteroyzgot
11.03.2015	8051071082	wild type
11.03.2015	335505974	wild type
12.03.2015	475529013	heteroyzgot
12.03.2015	485725893	heteroyzgot
12.03.2015	5612180958	heteroyzgot
12.03.2015	9907121509	wild type
13.03.2015	9052181599	wild type
13.03.2015	7012061429	wild type
13.03.2015	7253141103	wild type
17.03.2015	8757213871	heterozygot
17.03.2015	8458041206	wild type
17.03.2015	8559051236	wild type
17.03.2015	521014136	wild type
17.03.2015	8004021475	wild type
17.03.2015	6204191179	heterozygot
17.03.2015	9907121509	wild type
17.03.2015	8854071313	wild type
17.03.2015	7605221084	wild type
17.03.2015	7702260026	wild type
17.03.2015	8859281199	heterozygot
17.03.2015	7656011109	wild type
18.03.2015	6504152093	wild type

19.03.2015	7903123370	wild type
19.03.2015	8207211077	wild type
19.03.2015	9457281261	wild type
20.03.2015	7759211943	wild type
20.03.2015	9358311478	wild type
20.03.2015	7059281195	wild type
20.03.2015	7702113165	heterozygot
23.03.2015	9851071141	wild type
25.03.2015	515902870	wild type
25.03.2015	5704120146	heterozygot
25.03.2015	6902131521	wild type
25.03.2015	9651241610	wild type
25.03.2015	6355020517	wild type
25.03.2015	7161261480	wild type
25.03.2015	9454271452	wild type
25.03.2015	7857191440	wild type
26.03.2015	9055051554	wild type
26.03.2015	475122859	heterozygot
26.03.2015	8753180061	wild type
27.03.2015	420220915	heterozygot
27.03.2015	506010131	wild type
27.03.2015	9357051461	heterozygot
27.03.2015	8760251587	wild type
27.03.2015	9362041611	wild type
27.03.2015	7111251531	wild type
30.03.2015	405917869	wild type
31.03.2015	9757281170	wild type
31.03.2015	7855081057	wild type
01.04.2015	7604171453	wild type
01.04.2015	475710927	wild type
01.04.2015	7504151522	wild type
02.04.2015	9556101246	wild type
02.04.2015	6404231261	wild type
02.04.2015	6010150189	wild type
02.04.2015	7807101114	heterozygot
02.04.2015	7404191068	wild type
02.04.2015	8053121218	wild type
02.04.2015	5854061982	wild type
02.04.2015	7655181071	wild type
02.04.2015	7111624365	wild type
02.04.2015	9359223620	wild type

02.04.2015	7059281195	wild type
02.04.2015	7761161572	wild type
02.04.2015	9410011159	wild type
02.04.2015	9362161148	wild type
02.04.2015	375429884	wild type
03.04.2015	7654273373	wild type
03.04.2015	7302061425	wild type
07.04.2015	526008978	wild type
07.04.2015	7403011461	wild type
07.04.2015	7062181422	wild type
08.04.2015	7554221421	wild type
08.04.2015	475704880	wild type
08.04.2015	6651211016	wild type
08.04.2015	6011170846	heterozygot
10.04.2015	7362081517	wild type
10.04.2015	7254070427	wild type
10.04.2015	6606230366	wild type
10.04.2015	410118873	wild type
10.04.2015	5903222082	wild type
10.04.2015	7054271476	heterozygot
10.04.2015	6862080268	wild type
10.04.2015	7659021743	heterozygot
10.04.2015	6102219914	wild type
10.04.2015	385822856	wild type
10.04.2015	6305199966	wild type
10.04.2015	356006907	wild type
10.04.2015	9961031145	heterozygot
10.04.2015	9159141133	wild type
10.04.2015	9351110680	wild type
10.04.2015	8154061475	wild type
10.04.2015	8253241193	wild type
10.04.2015	500618903	wild type
10.04.2015	7555101069	wild type
10.04.2015	7457091080	wild type
10.04.2015	6860281108	wild type
10.04.2015	7251211901	wild type
10.04.2015	8056261080	wild type
14.04.2015	6860011355	homozygot !
14.04.2015	9457151142	wild type
14.04.2015	9358221300	heterozygot
14.04.2015	7251274568	heterozygot

15.04.2015	7262021447	wild type
15.04.2015	6751266708	wild type
15.04.2015	9758231878	heterozygot
15.04.2015	7359141514	heterozygot
15.04.2015	536107901	wild type
15.04.2015	9907241145	heterozygot
17.04.2015	56299880	wild type
17.04.2015	7756201485	wild type
20.04.2015	8257271527	wild type
21.04.2015	500609912	wild type
21.04.2015	7659061189	wild type
21.04.2015	5802221259	wild type
21.04.2015	9910131153	heterozygot
22.04.2015	8457061425	heterozygot
22.04.2015	8755221529	wild type
22.04.2015	6555290290	wild type
22.04.2015	6653110672	wild type
22.04.2015	530805987	heterozygot
22.04.2015	8260181071	heterozygot
22.04.2015	8355011070	wild type
22.04.2015	7356101840	wild type
22.04.2015	6653260129	wild type
22.04.2015	453306919	wild type
22.04.2015	475310887	wild type
22.04.2015	6503221559	wild type
22.04.2015	6901051288	wild type
22.04.2015	7105091080	wild type
22.04.2015	5410033309	wild type
22.04.2015	5608060754	wild type
22.04.2015	8756211210	heterozygot
22.04.2015	456116246	wild type
23.04.2015	7157241112	heterozygot
23.04.2015	8611281667	wild type
24.04.2015	6157300401	wild type
24.04.2015	7603191661	heterozygot
24.04.2015	8853051470	wild type
24.04.2015	7054171090	heterozygot
26.04.2015	8604271521	heterozygot
27.04.2015	5561091128	wild type
27.04.2015	8106141196	heterozygot
27.04.2015	9604151248	wild type

27.04.2015	6253181274	wild type
28.04.2015	7559271191	wild type
28.04.2015	8262231196	wild type
28.04.2015	6301211454	wild type
28.04.2015	6412171666	wild type
28.04.2015	6154070009	wild type
29.04.2015	6658061519	wild type
29.04.2015	535722061	wild type
29.04.2015	6255040890	wild type
29.04.2015	7804041530	wild type
29.04.2015	8112311426	wild type
29.04.2015	8353231204	wild type
29.04.2015	8053071201	wild type
30.04.2015	355115923	wild type
04.05.2015	9854191258	wild type
04.05.2015	9911201244	heterozygot
05.05.2015	9553251146	wild type
06.05.2015	6111250925	wild type
06.05.2015	9961261155	heterozygot
06.05.2015	6757010842	heterozygot
06.05.2015	7159231430	wild type
06.05.2015	476213932	wild type
06.05.2015	9459141141	heterozygot
06.05.2015	8654211235	wild type
06.05.2015	6660270517	wild type
06.05.2015	8309201482	heterozygot
06.05.2015	8062231187	heterozygot
06.05.2015	6554301863	wild type
06.05.2015	6653251637	wild type
06.05.2015	5957200226	wild type
06.05.2015	516124112	wild type
06.05.2015	9003271155	heterozygot
06.05.2015	9103061208	wild type
07.05.2015	7556021582	wild type
11.05.2015	6710100330	wild type
11.05.2015	7161271424	wild type
12.05.2015	460129280	wild type
12.05.2015	460707875	wild type
12.05.2015	475516881	wild type
12.05.2015	6860111048	wild type
13.05.2015	7853051579	heterozygot

14.05.2015	485406014	wild type
14.05.2015	7208131061	wild type
14.05.2015	9060170448	wild type
14.05.2015	7155141069	wild type
14.05.2015	530928128	wild type
14.05.2015	460815856	heterozygot
14.05.2015	7457051480	heterozygot
14.05.2015	255071596	wild type
15.05.2015	9501041560	wild type
15.05.2015	6203300707	wild type
18.05.2015	6406149969	heterozygot
18.05.2015	7252251522	wild type
18.05.2015	6654149952	wild type
19.05.2015	5508100938	wild type
19.05.2015	8551254205	wild type
19.05.2015	6905041516	heterozygot
20.05.2015	9456164563	wild type
20.05.2015	7056221424	wild type
20.05.2015	510204005	heterozygot
20.05.2015	7105292292	wild type
21.05.2015	6458109877	wild type
21.05.2015	7204061567	heterozygot
21.05.2015	9862201139	wild type
21.05.2015	7354252740	wild type
21.05.2015	6354051373	wild type
21.05.2015	446118878	wild type
21.05.2015	6006131317	wild type
21.05.2015	390921293	wild type
21.05.2015	410403899	wild type
21.05.2015	9354201416	heterozygot
22.05.2015	9302231278	wild type
25.05.2015	9358291161	heterozygot
26.05.2015	535823057	wild type
26.05.2015	62161560	wild type
27.05.2015	9555271615	wild type
27.05.2015	9558131142	wild type
27.05.2015	9108261513	heterozygot
27.05.2015	5661140275	wild type
27.05.2015	336029298	wild type
27.05.2015	6757021578	wild type
27.05.2015	9204041461	wild type

28.05.2015	9052271161	wild type
28.05.2015	8809241627	wild type
28.05.2015	491219085	wild type
28.05.2015	7554111113	wild type
28.05.2015	6857120291	wild type
28.05.2015	6161090088	wild type
28.05.2015	6505271838	heterozygot
28.05.2015	5711091495	wild type
28.05.2015	390105846	wild type
28.05.2015	8208101087	wild type
29.05.2015	8004021475	wild type
29.05.2015	6558029873	wild type
01.06.2015	8456141198	wild type
01.06.2015	6610269940	heterozygot
01.06.2015	7707081491	heterozygot
02.06.2015	9807081558	wild type
02.06.2015	480418320	homozygot
03.06.2015	520209883	heterozygot
03.06.2015	520502963	wild type
03.06.2015	6354231509	wild type
03.06.2015	8105090619	heterozygot
05.06.2015	5610060763	heterozygot
05.06.2015	8861241520	wild type
05.06.2015	8809101333	wild type
05.06.2015	8511081325	wild type
05.06.2015	9851151595	wild type
08.06.2015	9860191164	wild type
08.06.2015	55021570	wild type
08.06.2015	6205271159	wild type
09.06.2015	7358091564	wild type
09.06.2015	9808121157	wild type
09.06.2015	8158261055	heterozygot
09.06.2015	7759044589	wild type
09.06.2015	6761121498	wild type
09.06.2015	8711111639	wild type
09.06.2015	6708141098	wild type
09.06.2015	6911181056	wild type
09.06.2015	55021570	wild type
09.06.2015	445822928	wild type
09.06.2015	7407241434	wild type
09.06.2015	7807155102	wild type

09.06.2015	6706226174	wild type
09.06.2015	6205271159	wild type
09.06.2015	450728872	wild type
10.06.2015	7660301527	heterozygot
10.06.2015	6960271438	wild type
10.06.2015	7506031081	wild type
10.06.2015	7159101091	wild type
11.06.2015	9809041186	heterozygot
12.06.2015	8204291072	wild type
12.06.2015	425113902	wild type
12.06.2015	6561299964	wild type
12.06.2015	8956091561	wild type
15.06.2015	8009251216	wild type
15.06.2015	8959191152	wild type
15.06.2015	8761151321	heterozygot
15.06.2015	460719940	wild type
16.06.2015	395306871	wild type
16.06.2015	9356111247	heterozygot
17.06.2015	6311049953	wild type
17.06.2015	6107080968	wild type
17.06.2015	8451301528	wild type
17.06.2015	8458291566	wild type
17.06.2015	7505061420	wild type
17.06.2015	6107021557	wild type
18.06.2015	9906131553	wild type
18.06.2015	7409041254	heterozygot
19.06.2015	6151010425	wild type
22.06.2015	6654011330	wild type
23.06.2015	6651120871	wild type
23.06.2015	5761269876	wild type
23.06.2015	6159070103	heterozygot
23.06.2015	8952141318	wild type
23.06.2015	7952094798	wild type
23.06.2015	8058290404	wild type
23.06.2015	7055111062	wild type
23.06.2015	7809271073	heterozygot
23.06.2015	6504132161	heterozygot
23.06.2015	8403132550	wild type
23.06.2015	9001051168	wild type
23.06.2015	9056301165	wild type
24.06.2015	7957012370	wild type

24.06.2015	5961021153	wild type
24.06.2015	7960081524	wild type
24.06.2015	520605224	wild type
24.06.2015	480405889	wild type
25.06.2015	9908191138	wild type
26.06.2015	7259234938	wild type
29.06.2015	6562030375	heterozygot
29.06.2015	6655151106	wild type
29.06.2015	406205883	wild type
29.06.2015	8103254323	wild type
29.06.2015	6207151367	wild type
29.06.2015	520401083	wild type
30.06.2015	7708101103	heterozygot
30.06.2015	9357311512	wild type
30.06.2015	9962071250	wild type
30.06.2015	9957141512	heterozygot
30.06.2015	62181514	wild type
01.07.2015	7556241549	wild type
01.07.2015	6959021563	wild type
01.07.2015	5552172119	wild type
01.07.2015	8252281476	wild type
01.07.2015	8856081519	wild type
01.07.2015	6452290063	wild type
01.07.2015	5407161759	wild type
01.07.2015	505815169	wild type
01.07.2015	7155251817	wild type
01.07.2015	6507300491	wild type
01.07.2015	380716261	wild type
02.07.2015	470625872	wild type
02.07.2015	9712101244	heterozygot
02.07.2015	9908081248	wild type
02.07.2015	7455251517	wild type
03.07.2015	7361051433	wild type
03.07.2015	6062141084	wild type
03.07.2015	8953061534	wild type
03.07.2015	6304159872	wild type
07.07.2015	9005201259	heterozygot
07.07.2015	9308231250	heterozygot
08.07.2015	471115863	wild type
08.07.2015	7159181061	wild type
08.07.2015	7906072052	heterozygot

08.07.2015	6704240190	wild type
08.07.2015	9101151135	wild type
10.07.2015	9360031603	wild type
10.07.2015	7154063960	wild type
10.07.2015	480702869	wild type
10.07.2015	7556241549	wild type
10.07.2015	7658124726	wild type
10.07.2015	8051092840	wild type
10.07.2015	8056141059	wild type
10.07.2015	8259199882	wild type
10.07.2015	6102220244	wild type
10.07.2015	6455311334	heterozygot
10.07.2015	6603020555	wild type
10.07.2015	6711251711	wild type
10.07.2015	6802191296	wild type
10.07.2015	5907300079	wild type
10.07.2015	480702869	wild type
11.07.2015	450812850	heterozygot
13.07.2015	415301853	wild type
14.07.2015	9458011177	wild type
14.07.2015	8654241221	wild type
14.07.2015	9104121179	heterozygot
14.07.2015	6704021015	wild type
15.07.2015	5404110700	heterozygot
15.07.2015	9606181606	heterozygot
15.07.2015	435927925	wild type
16.07.2015	9507061508	wild type
16.07.2015	9201111534	wild type
16.07.2015	8662111589	heterozygot
16.07.2015	6558080649	heterozygot
17.07.2015	6961111475	wild type
17.07.2015	6962134926	wild type
17.07.2015	7254061209	wild type
20.07.2015	56261303	wild type
21.07.2015	8811041216	wild type
21.07.2015	9957051136	heterozygot
21.07.2015	7754081059	heterozygot
21.07.2015	152201301	wild type
22.07.2015	7960171427	wild type
22.07.2015	515310225	wild type
22.07.2015	500210000	heterozygot

22.07.2015	8358071446	wild type
22.07.2015	5662031715	wild type
22.07.2015	7754241428	wild type
22.07.2015	5556200165	heterozygot
22.07.2015	9351161522	heterozygot
22.07.2015	9510221511	wild type
22.07.2015	8753251242	wild type
23.07.2015	8758071365	heterozygot
23.07.2015	8262242977	heterozygot
23.07.2015	9462141512	wild type
23.07.2015	6751289984	wild type
23.07.2015	7509281196	wild type
23.07.2015	7710081191	wild type
23.07.2015	8004291261	wild type
24.07.2015	380223924	wild type
24.07.2015	9855201641	wild type
24.07.2015	9653091249	wild type
24.07.2015	204241245	wild type
27.07.2015	5851277167	wild type
28.07.2015	6953190034	wild type
29.07.2015	6301210178	heterozygot
30.07.2015	8061191060	wild type
30.07.2015	7305071124	wild type
30.07.2015	8359204369	wild type
31.07.2015	5852030326	wild type
31.07.2015	9204171569	wild type
03.08.2015	6257181996	wild type
04.08.2015	8861031585	wild type
05.08.2015	9553104142	wild type
05.08.2015	8801249907	wild type
05.08.2015	8053061246	wild type
05.08.2015	6555151074	wild type
05.08.2015	7156011092	wild type
05.08.2015	5556030655	wild type
05.08.2015	6152051003	wild type
05.08.2015	8212211743	homozygot
05.08.2015	7804070790	wild type
07.08.2015	51041616	heterozygot
07.08.2015	7951271437	wild type
10.08.2015	7155301064	heterozygot
10.08.2015	7651081096	wild type

10.08.2015	6710310683	wild type
10.08.2015	6001131201	heterozygot
11.08.2015	415802854	heterozygot
11.08.2015	260121146	wild type
11.08.2015	260121146	wild type
11.08.2015	9957231151	wild type
12.08.2015	6555140404	heterozygot
12.08.2015	9661161608	wild type
12.08.2015	9856091244	wild type
12.08.2015	8060281591	wild type
13.08.2015	8955021151	wild type
13.08.2015	6052241491	wild type
13.08.2015	8856063127	wild type
14.08.2015	8458131098	wild type
14.08.2015	8755051205	wild type
17.08.2015	8359121418	wild type
17.08.2015	5710166362	wild type
18.08.2015	506021070	heterozygot
18.08.2015	51161571	wild type
18.08.2015	5601010898	wild type
18.08.2015	5603061265	wild type
18.08.2015	8752181624	wild type
18.08.2015	9359141142	wild type
18.08.2015	7351160134	wild type
18.08.2015	6460071727	wild type
18.08.2015	7057150748	wild type
18.08.2015	6509101477	heterozygot
18.08.2015	6811030214	heterozygot
18.08.2015	9606051608	wild type
18.08.2015	5701300571	wild type
18.08.2015	8851101962	heterozygot
18.08.2015	9701221551	wild type
18.08.2015	470825945	wild type
18.08.2015	9809151516	heterozygot
19.08.2015	9352231602	heterozygot
19.08.2015	7462051343	wild type
19.08.2015	9605061608	wild type
19.08.2015	460324858	wild type
19.08.2015	7254301823	wild type
21.08.2015	6362049957	wild type
21.08.2015	9456271175	wild type

24.08.2015	6403151941	wild type
24.08.2015	9954241461	wild type
25.08.2015	7358091586	wild type
26.08.2015	9151281556	wild type
26.08.2015	9401281559	wild type
26.08.2015	6953191563	wild type
26.08.2015	7460240886	wild type
26.08.2015	8106092741	wild type
27.08.2015	9958161509	heterozygot
27.08.2015	8956281938	wild type
27.08.2015	9253311165	wild type
27.08.2015	6651290436	wild type
27.08.2015	6011160979	wild type
28.08.2015	6209160440	wild type
31.08.2015	9159191469	wild type
31.08.2015	8259281348	wild type
01.09.2015	5852190706	wild type
01.09.2015	510728149	wild type
01.09.2015	6661206540	wild type
02.09.2015	6556141811	wild type
02.09.2015	5653091454	heterozygot
02.09.2015	8857301639	wild type
03.09.2015	8712113277	wild type
03.09.2015	5653240999	wild type
03.09.2015	62161516	wild type
03.09.2015	8862151209	wild type
03.09.2015	8059181525	wild type
03.09.2015	8155111293	wild type
03.09.2015	5954129873	wild type
03.09.2015	475500973	wild type
03.09.2015	6411171744	wild type
03.09.2015	5404200438	wild type
03.09.2015	5609100914	wild type
03.09.2015	490925851	wild type
04.09.2015	7560051520	wild type
05.09.2015	530823917	wild type
07.09.2015	7856031061	wild type
08.09.2015	6409604079	heterozygot
08.09.2015	7556221573	wild type
08.09.2015	357191152	wild type
08.09.2015	510928992	wild type

08.09.2015	9262121604	wild type
09.09.2015	470619944	wild type
10.09.2015	6410010815	heterozygot
10.09.2015	8362201066	wild type
10.09.2015	7852031098	wild type
10.09.2015	6751040669	wild type
10.09.2015	7162101077	wild type
10.09.2015	425317253	wild type
10.09.2015	9608241301	wild type
10.09.2015	8407291056	wild type
10.09.2015	531121005	wild type
10.09.2015	5410111673	wild type
11.09.2015	7903123370	wild type
14.09.2015	5457221989	wild type
14.09.2015	7161161490	wild type
15.09.2015	9153231317	wild type
15.09.2015	475315958	heterozygot
15.09.2015	6001211325	heterozygot
16.09.2015	9354281595	wild type
16.09.2015	9061281459	heterozygot
16.09.2015	5404132568	heterozygot
17.09.2015	9106181259	wild type
17.09.2015	8759221316	wild type
22.09.2015	7507091426	wild type
23.09.2015	8453241543	wild type
23.09.2015	525417972	wild type
23.09.2015	530516955	heterozygot
23.09.2015	6858220280	heterozygot
23.09.2015	7257311192	heterozygot
23.09.2015	9857270851	wild type
23.09.2015	8556271206	wild type
23.09.2015	8562120511	wild type
23.09.2015	7562212613	wild type
23.09.2015	7958234448	wild type
23.09.2015	6655060807	wild type
23.09.2015	5859220058	wild type
23.09.2015	9512159931	wild type
23.09.2015	6507299886	wild type
23.09.2015	7101071075	wild type
23.09.2015	360527872	wild type
23.09.2015	5655100230	heterozygot

23.09.2015	8758031314	wild type
23.09.2015	7154131907	wild type
23.09.2015	505906912	wild type
23.09.2015	7404272303	heterozygot
23.09.2015	8806261518	wild type
23.09.2015	530400904	wild type
23.09.2015	321100868	wild type
24.09.2015	5810010249	heterozygot
24.09.2015	6404301045	wild type
25.09.2015	410321905	heterozygot
25.09.2015	9702111033	wild type
29.09.2015	201301517	wild type
30.09.2015	6252120786	heterozygot
30.09.2015	505521019	wild type
30.09.2015	6006169872	wild type
30.09.2015	535830999	heterozygot
30.09.2015	161291140	wild type
01.10.2015	8760161211	wild type
01.10.2015	435801927	wild type
02.10.2015	6808310541	wild type
02.10.2015	480905879	homozygot
05.10.2015	6451239904	heterozygot
06.10.2015	5452071030	wild type
06.10.2015	5453041054	wild type
06.10.2015	475501866	wild type
07.10.2015	5601009886	wild type
07.10.2015	9851151298	wild type
07.10.2015	7659091197	wild type
07.10.2015	7956271069	wild type
07.10.2015	5855032655	wild type
07.10.2015	6154250211	wild type
07.10.2015	8302231563	heterozygot
07.10.2015	9407116080	wild type
07.10.2015	5504141081	wild type
07.10.2015	5510131109	wild type
07.10.2015	480906882	wild type
07.10.2015	520410004	wild type
08.10.2015	8262261193	wild type
08.10.2015	8204251197	heterozygot
08.10.2015	8759141214	wild type
12.10.2015	361131165	wild type

14.10.2015	8754271525	heterozygot
14.10.2015	9258291470	heterozygot
14.10.2015	6654051480	heterozygot
14.10.2015	9157280175	wild type
14.10.2015	9105101455	wild type
14.10.2015	455203900	wild type
14.10.2015	476214981	wild type
14.10.2015	516207905	wild type
14.10.2015	9602271557	heterozygot
14.10.2015	7806011542	wild type
15.10.2015	465510994	wild type
15.10.2015	7260201068	heterozygot
15.10.2015	9751080459	wild type
15.10.2015	7853231099	wild type
15.10.2015	7854021493	wild type
15.10.2015	465901801	wild type
15.10.2015	8303211212	heterozygot
15.10.2015	6912311130	wild type
15.10.2015	6202120550	wild type
15.10.2015	460419979	wild type
15.10.2015	6755020062	wild type
16.10.2015	510824958	heterozygot
16.10.2015	7662231521	heterozygot
16.10.2015	7006170973	wild type
16.10.2015	9854041460	wild type
19.10.2015	6510181424	wild type
19.10.2015	9954261162	wild type
20.10.2015	8802281663	wild type
21.10.2015	7611231055	wild type
21.10.2015	6460280364	heterozygot
22.10.2015	500903953	wild type
23.10.2015	9861191174	wild type
23.10.2015	6558249917	wild type
23.10.2015	6759260133	wild type
23.10.2015	7562212613	wild type
23.10.2015	485707055	heterozygot
26.10.2015	525706035	wild type
26.10.2015	6005187198	wild type
27.10.2015	6861011112	wild type
27.10.2015	6858261387	wild type
29.10.2015	6656130953	heterozygot

29.10.2015	8955241250	wild type
29.10.2015	9061021254	wild type
29.10.2015	7351081066	wild type
29.10.2015	7852171480	wild type
29.10.2015	6160229910	wild type
29.10.2015	5402072818	wild type
29.10.2015	6005187198	wild type
29.10.2015	380323302	wild type
29.10.2015	9254281178	wild type
29.10.2015	7555281062	wild type
29.10.2015	6059230924	wild type
29.10.2015	7307271069	wild type
29.10.2015	7911101098	wild type
29.10.2015	6102079906	wild type
29.10.2015	455122878	wild type
30.10.2015	8058141662	wild type
02.11.2015	7459191530	heterozygot
02.11.2015	7654201081	wild type
03.11.2015	152061557	heterozygot
03.11.2015	536124064	wild type
03.11.2015	9302021552	wild type
03.11.2015	9804271564	wild type
03.11.2015	102061563	wild type
03.11.2015	7010012591	heterozygot
04.11.2015	5910039893	heterozygot
04.11.2015	7852021594	wild type
04.11.2015	7407200228	wild type
04.11.2015	262201169	wild type
04.11.2015	262201169	wild type
04.11.2015	8851011938	wild type
04.11.2015	7954041072	wild type
04.11.2015	7158181073	wild type
04.11.2015	8602041249	wild type
04.11.2015	7304008859	wild type
05.11.2015	7757250434	wild type
05.11.2015	7857302749	wild type
05.11.2015	7351041070	heterozygot
06.11.2015	445804858	heterozygot
06.11.2015	8358011188	wild type
09.11.2015	8355241058	wild type
09.11.2015	7052091078	heterozygot

10.11.2015	8112121060	wild type
11.11.2015	9556291150	wild type
11.11.2015	6859160428	wild type
11.11.2015	9402171470	wild type
11.11.2015	9803201462	wild type
11.11.2015	8903281243	heterozygot
11.11.2015	515413149	wild type
12.11.2015	8710021231	wild type
12.11.2015	501014079	wild type
12.11.2015	7655161480	wild type
13.11.2015	9953121595	wild type
13.11.2015	7557191564	wild type
16.11.2015	9554221632	wild type
16.11.2015	6906161349	wild type
16.11.2015	8751271682	wild type
18.11.2015	7853181423	wild type
18.11.2015	6704041519	wild type
18.11.2015	9355121148	wild type
18.11.2015	9657311135	wild type
18.11.2015	9254021369	wild type
18.11.2015	7659171090	wild type
18.11.2015	6159050776	wild type
18.11.2015	8503259863	wild type
18.11.2015	6604100491	wild type
18.11.2015	6110100754	wild type
20.11.2015	475603971	wild type
20.11.2015	51291558	wild type
20.11.2015	5708240449	wild type
23.11.2015	6706051109	wild type
23.11.2015	6551050549	wild type
23.11.2015	6162251094	wild type
24.11.2015	5712131248	heterozygot
24.11.2015	5454042670	wild type
25.11.2015	6258171039	heterozygot
25.11.2015	8160081742	wild type
25.11.2015	490926856	wild type
25.11.2015	9660111471	wild type
25.11.2015	8305270863	wild type
25.11.2015	6401090200	wild type
25.11.2015	8359161194	wild type
25.11.2015	7552563974	wild type

25.11.2015	475524279	wild type
25.11.2015	7209281056	wild type
25.11.2015	7359243528	heterozygot
25.11.2015	6661020354	wild type
25.11.2015	6952101089	wild type
25.11.2015	485505112	wild type
25.11.2015	430728859	wild type
26.11.2015	9760071133	wild type
26.11.2015	8558141690	wild type
27.11.2015	6256180424	wild type
27.11.2015	7456211421	wild type
27.11.2015	6510111464	wild type
27.11.2015	501113086	wild type
30.11.2015	7807220398	wild type
30.11.2015	240926640	wild type
30.11.2015	240926640	wild type
01.12.2015	7004091192	wild type
01.12.2015	7853121572	wild type
01.12.2015	211061553	wild type
02.12.2015	9108240580	heterozygot
02.12.2015	8656201553	wild type
02.12.2015	5806011397	heterozygot
03.12.2015	7357191203	wild type
03.12.2015	531220184	heterozygot
04.12.2015	5552111146	wild type
04.12.2015	8604245770	wild type
04.12.2015	8353281056	wild type
04.12.2015	9252221307	wild type
04.12.2015	7955075149	wild type
04.12.2015	7160261063	wild type
04.12.2015	445923046	wild type
04.12.2015	520924993	heterozygot
04.12.2015	8503061214	wild type
04.12.2015	8005011519	wild type
07.12.2015	8054301562	wild type
07.12.2015	8704051366	heterozygot
07.12.2015	8162111055	wild type
08.12.2015	455316953	wild type
08.12.2015	7708261879	wild type
08.12.2015	7559101758	wild type
09.12.2015	7356281602	wild type

09.12.2015	6760230476	wild type
09.12.2015	8758191529	wild type
09.12.2015	460509000	heterozygot
09.12.2015	530624208	wild type
10.12.2015	5604182275	wild type
10.12.2015	6653301720	heterozygot
10.12.2015	154111572	wild type
10.12.2015	9910291555	heterozygot
11.12.2015	7606213900	wild type
11.12.2015	490121118	wild type
11.12.2015	6009110150	wild type
11.12.2015	7059071106	wild type
11.12.2015	7152261126	wild type
11.12.2015	5759010135	wild type
11.12.2015	7912051102	wild type
11.12.2015	6602031160	wild type
11.12.2015	6807654226	wild type
11.12.2015	5602267659	wild type
14.12.2015	6711160554	wild type
15.12.2015	361128895	wild type
15.12.2015	7953311574	wild type
15.12.2015	8110281057	homozygot
16.12.2015	7008252745	wild type
16.12.2015	5907220868	wild type
16.12.2015	7859241081	heterozygot
16.12.2015	9661111459	wild type
17.12.2015	6105140007	heterozygot
18.12.2015	5461251531	wild type
21.12.2015	9858111141	wild type
21.12.2015	9404191158	wild type
22.12.2015	8254051332	wild type
22.12.2015	506213071	wild type
22.12.2015	6210170031	wild type
23.12.2015	495412076	heterozygot
23.12.2015	451019907	wild type
30.12.2015	7405113033	wild type
30.12.2015	7355161120	heterozygot
31.12.2015	8305154648	wild type

Příloha 2: Analyzovaná data pro rok 2015 – Hyperkoagulace

Datum příjmu	Rodné číslo	P_APC_R
05.01.2015	6462220973	1,90
05.01.2015	7356071865	1,70
05.01.2015	7257161482	1,47
06.01.2015	8560181244	2,18
06.01.2015	9357181602	2,33
06.01.2015	7712131261	1,56
06.01.2015	9453131467	1,49
07.01.2015	7406201373	1,36
07.01.2015	6458011229	1,86
07.01.2015	7958291538	2,80
07.01.2015	485128874	2,56
08.01.2015	6705081173	2,80
09.01.2015	9111201252	3,09
12.01.2015	7956191517	1,93
12.01.2015	7008098987	1,69
13.01.2015	9652271265	1,32
13.01.2015	8859231589	1,55
13.01.2015	8258191094	1,85
13.01.2015	9052251515	1,50
13.01.2015	8260271216	2,35
13.01.2015	8955121163	1,48
13.01.2015	8252251204	0,78
14.01.2015	7955061575	2,38
14.01.2015	8255031553	2,46
16.01.2015	505313217	2,44
16.01.2015	8553163244	1,97
16.01.2015	6551281648	1,56
19.01.2015	415213611	2,18
20.01.2015	8059261055	2,10
20.01.2015	8355281098	1,74
20.01.2015	9351131668	1,56
20.01.2015	9354041454	1,66
20.01.2015	6258160446	2,83
21.01.2015	5902080590	2,90
22.01.2015	8754031582	2,89
23.01.2015	508139851	2,61
23.01.2015	8053311342	3,19
23.01.2015	8251041061	2,58
26.01.2015	8509201315	1,40

27.01.2015	9254141159	2,63
27.01.2015	410925801	3,39
27.01.2015	8758051433	2,42
27.01.2015	7512021483	2,53
28.01.2015	430427914	1,92
28.01.2015	7152171520	3,51
28.01.2015	5560010510	3,97
30.01.2015	6453090170	2,83
30.01.2015	6355020143	3,17
30.01.2015	465403978	3,50
02.02.2015	6002240342	1,09
02.02.2015	5457122263	3,82
03.02.2015	8459021537	1,58
03.02.2015	8762121224	2,29
03.02.2015	9806151453	2,99
04.02.2015	7153171068	2,61
04.02.2015	7854241097	3,17
05.02.2015	456279878	1,49
06.02.2015	6454209882	2,66
06.02.2015	8359013607	2,34
06.02.2015	7007251074	2,68
09.02.2015	8102051561	1,82
10.02.2015	8358211190	1,51
10.02.2015	8757131217	3,56
10.02.2015	7102215449	2,95
10.02.2015	9061271207	3,01
10.02.2015	8851311941	3,51
10.02.2015	7155201063	3,45
12.02.2015	9852251551	3,05
12.02.2015	491004143	1,38
12.02.2015	520408093	1,86
13.02.2015	5660211336	3,50
14.02.2015	6760260649	2,31
16.02.2015	7312171074	1,99
17.02.2015	8151051270	2,62
18.02.2015	9056091461	2,22
18.02.2015	9055121162	2,12
18.02.2015	300623853	2,98
19.02.2015	9055121162	1,78
23.02.2015	8258121431	2,44
23.02.2015	7861281075	2,33

24.02.2015	1204210358	2,34
24.02.2015	8161091058	1,48
24.02.2015	7655061094	1,19
24.02.2015	8307081056	1,36
24.02.2015	466123888	2,94
24.02.2015	8151091475	1,63
24.02.2015	9360031251	2,70
24.02.2015	9661161135	2,50
24.02.2015	7854271259	1,41
24.02.2015	6160260017	1,94
25.02.2015	7204131252	1,88
25.02.2015	7705131543	3,38
25.02.2015	7761071526	2,64
27.02.2015	470916939	3,15
27.02.2015	7653091192	2,48
27.02.2015	7253141103	2,00
02.03.2015	495601010	1,40
02.03.2015	5909180056	2,37
02.03.2015	9759201198	2,36
03.03.2015	9056051564	1,52
03.03.2015	9261131153	1,86
04.03.2015	7802171057	3,79
04.03.2015	360902871	3,65
04.03.2015	7058251188	1,62
04.03.2015	6360131645	1,78
05.03.2015	406114914	2,11
05.03.2015	5862109868	3,10
06.03.2015	7505121095	1,56
06.03.2015	9555181140	2,00
06.03.2015	7407241434	2,96
06.03.2015	8154181067	1,38
06.03.2015	8152030633	2,51
06.03.2015	5608252407	2,78
06.03.2015	8356031199	1,46
06.03.2015	7759291286	2,86
09.03.2015	8957091142	1,21
09.03.2015	6154250211	2,49
09.03.2015	7559231085	2,47
10.03.2015	6855299967	1,29
10.03.2015	7262152072	1,58
10.03.2015	476008886	2,07

10.03.2015	7655081675	1,33
10.03.2015	9662281276	1,36
11.03.2015	8004021475	2,97
11.03.2015	6606121675	2,93
11.03.2015	5607180215	3,09
11.03.2015	6204191179	1,64
12.03.2015	9907121509	3,51
13.03.2015	7702260026	3,29
13.03.2015	8854071313	2,76
16.03.2015	8004021475	2,80
16.03.2015	7605221084	3,69
17.03.2015	7656011109	3,61
17.03.2015	9751111457	1,27
17.03.2015	8859281199	1,59
17.03.2015	8257241255	1,25
17.03.2015	7807101114	1,67
18.03.2015	7404191068	1,79
18.03.2015	8053121218	1,89
18.03.2015	6404231261	1,84
19.03.2015	8207211077	1,76
19.03.2015	7655181071	1,87
20.03.2015	7111624365	1,76
20.03.2015	9359223620	1,72
20.03.2015	7702113165	1,45
21.03.2015	5854061982	2,62
24.03.2015	8851061262	2,16
24.03.2015	8955071146	2,03
24.03.2015	8453121456	1,25
24.03.2015	7761161572	1,89
24.03.2015	7351071188	2,43
24.03.2015	9410011159	2,47
24.03.2015	7557061071	1,64
24.03.2015	7856234561	1,61
25.03.2015	6902131521	2,74
25.03.2015	515902870	2,69
25.03.2015	9362161148	2,52
25.03.2015	375429884	1,86
26.03.2015	9055051554	2,54
27.03.2015	6010150189	2,22
31.03.2015	7251211901	3,24
31.03.2015	6860281108	3,60

31.03.2015	8758041632	1,49
31.03.2015	7457091080	2,51
31.03.2015	7555101069	2,96
31.03.2015	9353091538	1,52
31.03.2015	500618903	2,17
03.04.2015	8253241193	2,03
03.04.2015	7903045204	1,35
03.04.2015	8154061475	2,10
03.04.2015	7354071592	1,91
03.04.2015	7652021475	1,47
04.04.2015	9351110680	2,72
05.04.2015	9159141133	2,08
07.04.2015	9554011158	1,52
07.04.2015	9961031145	1,46
07.04.2015	356006907	2,81
07.04.2015	6305199966	2,69
07.04.2015	7403011461	2,01
07.04.2015	7659021743	1,57
07.04.2015	485622915	3,10
08.04.2015	385822856	3,47
09.04.2015	6102219914	3,04
10.04.2015	8056261080	3,62
10.04.2015	9756151514	2,48
13.04.2015	6503221559	3,92
14.04.2015	7952141064	2,96
14.04.2015	6653260129	2,62
15.04.2015	453306919	3,36
16.04.2015	8355011070	2,82
17.04.2015	7055071187	1,53
17.04.2015	5410033309	3,01
17.04.2015	7105091080	2,63
20.04.2015	7356101840	2,98
20.04.2015	5608060754	2,30
20.04.2015	6901051288	2,49
21.04.2015	8751211380	1,80
21.04.2015	535119171	0,82
21.04.2015	8260181071	1,82
21.04.2015	8757213871	1,39
21.04.2015	6505211822	3,00
21.04.2015	475310887	4,19
21.04.2015	8353251840	1,24

23.04.2015	8457075604	2,51
24.04.2015	7603191661	1,24
24.04.2015	8853051470	2,15
24.04.2015	8251221527	2,10
26.04.2015	8604271521	1,55
27.04.2015	7908061094	2,10
28.04.2015	7559271191	3,07
28.04.2015	8262231196	3,82
28.04.2015	5608012123	1,27
28.04.2015	6301211454	2,64
28.04.2015	9059231136	2,81
28.04.2015	8051191070	4,05
28.04.2015	6154070009	3,70
28.04.2015	6961051734	1,48
29.04.2015	5957200226	2,84
30.04.2015	8257071492	1,38
30.04.2015	8053121218	2,24
30.04.2015	8654211235	3,54
30.04.2015	6660270517	2,03
01.05.2015	8309201482	1,40
04.05.2015	6653251637	3,02
04.05.2015	8062231187	1,50
04.05.2015	9911201244	1,41
05.05.2015	8353251840	1,38
05.05.2015	1353190838	3,85
05.05.2015	516124112	3,07
05.05.2015	9555111147	2,69
05.05.2015	9103061208	2,92
05.05.2015	6554301863	3,47
05.05.2015	8054292707	1,66
06.05.2015	9003271155	1,12
06.05.2015	9961261155	1,34
06.05.2015	7208131061	2,93
07.05.2015	460815856	1,22
07.05.2015	530928128	4,01
11.05.2015	460129280	3,19
11.05.2015	7155141069	2,93
11.05.2015	9060170448	2,43
12.05.2015	8351166548	1,66
12.05.2015	8358161536	1,39
14.05.2015	8354211084	1,45

14.05.2015	9862201139	4,02
15.05.2015	8102051561	1,75
17.05.2015	6006131317	2,15
19.05.2015	8559051236	2,77
19.05.2015	390921293	2,43
19.05.2015	8258201247	2,41
19.05.2015	6354051373	3,00
20.05.2015	7105292292	2,61
20.05.2015	446118878	3,23
20.05.2015	7504151522	2,42
21.05.2015	7354252740	3,86
21.05.2015	410403899	3,79
21.05.2015	9354201416	1,31
22.05.2015	8253241193	2,80
22.05.2015	390105846	2,62
22.05.2015	6161090088	2,55
25.05.2015	6857120291	3,96
25.05.2015	7554111113	2,01
25.05.2015	5711091495	2,49
25.05.2015	6505271838	1,53
26.05.2015	8208101087	2,63
26.05.2015	8357060469	1,39
26.05.2015	9052271161	1,93
27.05.2015	9204041461	3,65
27.05.2015	5661140275	4,84
27.05.2015	8809241627	3,24
27.05.2015	336029298	4,98
27.05.2015	491219085	2,61
28.05.2015	8161131428	1,60
01.06.2015	6761121498	2,95
01.06.2015	8158261055	1,57
01.06.2015	506021070	1,26
02.06.2015	6651210532	2,74
02.06.2015	6708141098	4,28
02.06.2015	7461221096	2,40
03.06.2015	8711111639	3,19
03.06.2015	520502963	3,49
03.06.2015	7759044589	2,58
04.06.2015	6911181056	2,75
04.06.2015	445822928	3,05
05.06.2015	9851151595	1,96

08.06.2015	7807155102	3,16
08.06.2015	8662171319	3,04
08.06.2015	9860191164	2,76
08.06.2015	7407241434	2,93
08.06.2015	5191152	2,75
08.06.2015	55021570	1,80
08.06.2015	6205271159	2,62
09.06.2015	6706226174	2,80
09.06.2015	450728872	2,02
09.06.2015	9258291558	1,35
09.06.2015	8756211210	1,29
09.06.2015	8252081089	2,34
10.06.2015	7506031081	2,37
10.06.2015	7159101091	1,92
11.06.2015	9809041186	1,18
12.06.2015	8758201649	1,56
15.06.2015	8009251216	2,94
15.06.2015	8959191152	2,25
15.06.2015	8761151321	1,64
15.06.2015	460719940	2,72
16.06.2015	9356111247	1,45
16.06.2015	9454131147	1,34
16.06.2015	6159070103	1,63
17.06.2015	9056301165	2,87
18.06.2015	9001051168	2,85
18.06.2015	6504132161	1,79
18.06.2015	7055111062	2,64
19.06.2015	7958291065	2,60
19.06.2015	6151010425	3,43
19.06.2015	8403132550	2,39
19.06.2015	7952094798	2,92
22.06.2015	8058290404	2,13
22.06.2015	8253061068	2,58
23.06.2015	8952141318	2,99
23.06.2015	7809271073	1,40
23.06.2015	6601010866	2,28
24.06.2015	406205883	3,18
26.06.2015	6655151106	2,69
26.06.2015	8103254323	2,59
29.06.2015	8757231581	3,25
29.06.2015	8152231482	2,88

29.06.2015	8051092840	2,76
29.06.2015	7658124726	2,28
30.06.2015	6102220244	3,06
30.06.2015	8056141059	2,70
30.06.2015	8259199882	1,80
01.07.2015	7556241549	0,77
01.07.2015	6507300491	3,04
02.07.2015	6603020555	2,18
03.07.2015	5957200226	2,56
07.07.2015	6455311334	1,29
07.07.2015	5907300079	2,34
07.07.2015	9462301507	1,26
07.07.2015	9456101258	1,45
07.07.2015	6711251711	3,00
09.07.2015	6802191296	2,37
10.07.2015	6308230499	2,50
10.07.2015	480702869	2,50
14.07.2015	8557251262	1,64
16.07.2015	7254061209	2,04
16.07.2015	6961111475	2,03
17.07.2015	6962134926	3,98
17.07.2015	8557091938	1,35
17.07.2015	9462141512	2,78
20.07.2015	6751289984	2,87
20.07.2015	8262242977	1,46
20.07.2015	8758071365	1,36
20.07.2015	56261303	2,21
21.07.2015	7710081191	3,02
21.07.2015	9056301165	1,36
22.07.2015	500210000	1,50
22.07.2015	515310225	2,62
22.07.2015	8004291261	2,50
22.07.2015	7960171427	2,83
22.07.2015	7509281196	2,54
24.07.2015	7804070790	2,39
24.07.2015	6152051003	2,40
24.07.2015	8062090365	1,94
27.07.2015	562274602	2,65
29.07.2015	8212211743	0,83
30.07.2015	6555151074	2,24
31.07.2015	8851061262	2,09

31.07.2015	8053061246	2,21
03.08.2015	5556030655	3,48
05.08.2015	6961111475	3,76
05.08.2015	7156011092	4,30
10.08.2015	7351160134	2,07
10.08.2015	7057150748	2,78
10.08.2015	8858041202	1,44
11.08.2015	6460071727	2,73
11.08.2015	9957231151	2,03
12.08.2015	6555140404	1,38
12.08.2015	6509101477	1,40
13.08.2015	9606051608	2,28
13.08.2015	9359141142	2,21
13.08.2015	6811030214	1,17
14.08.2015	5701300571	2,27
14.08.2015	8851101962	1,40
14.08.2015	470825945	2,80
17.08.2015	6011170846	1,36
18.08.2015	7211261067	3,13
18.08.2015	9701221551	3,98
18.08.2015	51161571	3,80
18.08.2015	5601010898	2,82
18.08.2015	8654121310	1,23
18.08.2015	6852061644	3,23
20.08.2015	6052241491	2,12
24.08.2015	9958161509	1,43
25.08.2015	6011160979	2,71
25.08.2015	9253311165	2,25
25.08.2015	8456181062	1,36
25.08.2015	9062061150	1,38
26.08.2015	8956281938	2,94
26.08.2015	9401281559	2,76
26.08.2015	6107101120	3,18
26.08.2015	6651290436	3,42
28.08.2015	6411171744	2,94
31.08.2015	9053071609	1,33
31.08.2015	362061149	1,56
01.09.2015	5404200438	3,07
01.09.2015	8155111293	2,62
01.09.2015	5954129873	3,30
01.09.2015	475500973	3,58

01.09.2015	8357684059	1,31
02.09.2015	8059181525	2,24
02.09.2015	8862151209	2,11
02.09.2015	5609100914	2,43
03.09.2015	490925851	1,52
03.09.2015	7203281194	1,31
03.09.2015	62161516	3,74
03.09.2015	6751040669	1,83
04.09.2015	5410111673	2,41
07.09.2015	8351203882	2,61
08.09.2015	8407291056	2,45
08.09.2015	9459141141	1,43
08.09.2015	7852031098	2,52
08.09.2015	470825945	2,45
08.09.2015	7162101077	2,49
08.09.2015	8362201066	2,22
08.09.2015	7409041254	1,63
09.09.2015	531121005	2,63
09.09.2015	9754161251	1,42
09.09.2015	9608241301	2,22
10.09.2015	425317253	3,23
10.09.2015	360527872	3,27
10.09.2015	8454071196	2,90
11.09.2015	530400904	3,19
14.09.2015	6507299886	2,94
14.09.2015	505906912	2,60
14.09.2015	7404272303	1,25
15.09.2015	8758031314	3,08
15.09.2015	7758221085	2,39
15.09.2015	9458011177	2,30
15.09.2015	5655100230	1,66
16.09.2015	9457281261	2,42
17.09.2015	7751131189	2,41
17.09.2015	7154131907	2,64
19.09.2015	8806261518	2,35
21.09.2015	321100868	1,72
21.09.2015	7562212613	1,61
21.09.2015	7952081081	2,11
21.09.2015	6655060807	2,72
21.09.2015	5859220058	2,93
21.09.2015	6858220280	1,28

21.09.2015	7101071075	1,84
22.09.2015	7257311192	1,29
22.09.2015	7305071124	4,03
22.09.2015	9512159931	2,23
22.09.2015	9857270851	2,87
22.09.2015	8556271206	3,19
22.09.2015	7958234448	3,14
22.09.2015	9761271167	1,33
22.09.2015	7053032425	1,32
22.09.2015	8562120511	2,71
23.09.2015	5504141081	3,09
25.09.2015	6154250211	3,32
25.09.2015	9656241253	1,41
25.09.2015	9851151298	2,10
27.09.2015	5510131109	2,95
29.09.2015	9407116080	2,07
29.09.2015	201301517	2,03
29.09.2015	7659091197	2,47
02.10.2015	7956271069	2,29
05.10.2015	480906882	2,53
05.10.2015	9556211510	1,44
05.10.2015	5855032655	2,62
06.10.2015	520410004	3,63
06.10.2015	9055021513	1,31
06.10.2015	7703261081	1,25
06.10.2015	8854021208	2,19
06.10.2015	8302231563	1,23
07.10.2015	8303211212	1,51
07.10.2015	9751080459	2,36
08.10.2015	465901801	3,27
09.10.2015	6912311130	2,48
09.10.2015	7855271247	2,87
12.10.2015	6202120550	2,37
13.10.2015	7853231099	3,24
13.10.2015	460419979	3,03
13.10.2015	8662111589	1,31
13.10.2015	7854021493	2,57
13.10.2015	7260201068	1,51
14.10.2015	6755020062	2,16
19.10.2015	380323302	2,57
20.10.2015	6160229910	2,34

20.10.2015	7259251064	1,37
20.10.2015	8262281081	1,66
20.10.2015	8955241250	2,45
21.10.2015	6005187198	2,32
22.10.2015	5402072818	2,46
22.10.2015	455122878	3,55
22.10.2015	7351081066	2,64
23.10.2015	9061021254	2,48
23.10.2015	6656130953	1,36
23.10.2015	7852171480	2,21
23.10.2015	658076099	1,59
23.10.2015	7562212613	2,12
26.10.2015	7911101098	2,41
26.10.2015	6509230914	2,89
26.10.2015	6059230924	2,73
26.10.2015	9254281178	1,95
27.10.2015	6059230924	2,25
27.10.2015	7361031435	1,43
27.10.2015	7754081059	1,32
27.10.2015	7555281062	2,87
27.10.2015	7307271069	2,33
27.10.2015	9358291161	1,50
27.10.2015	6557040478	1,34
27.10.2015	8562281573	2,67
27.10.2015	6102079906	2,89
27.10.2015	8956191507	2,63
30.10.2015	7852011419	1,23
30.10.2015	7158181073	2,55
02.11.2015	7654201081	2,73
02.11.2015	9455191151	2,40
02.11.2015	8602041249	2,29
03.11.2015	8851011938	2,64
04.11.2015	7304008859	4,21
04.11.2015	7954041072	2,90
04.11.2015	262201169	2,77
09.11.2015	9254021369	2,08
10.11.2015	9657311135	2,64
10.11.2015	6859101369	1,60
10.11.2015	6406149969	1,23
10.11.2015	9351161522	1,24
11.11.2015	9556291150	2,77

11.11.2015	8503259863	2,87
12.11.2015	7654221519	2,56
13.11.2015	9355121148	2,21
16.11.2015	6110100754	3,06
16.11.2015	8303119747	1,90
16.11.2015	7659171090	3,14
16.11.2015	6159050776	2,64
18.11.2015	6604100491	4,09
19.11.2015	5962281082	1,30
19.11.2015	7209281056	2,66
19.11.2015	8359161194	2,95
19.11.2015	8356041473	2,49
20.11.2015	8660181309	1,35
20.11.2015	7552563974	2,81
23.11.2015	8560201594	2,12
24.11.2015	475524279	3,17
24.11.2015	485505112	3,06
24.11.2015	5712131248	1,98
24.11.2015	6661020354	3,43
24.11.2015	9159111158	2,82
24.11.2015	8362211571	2,14
24.11.2015	7359243528	1,36
25.11.2015	430728859	4,60
25.11.2015	6952101089	2,23
25.11.2015	8956281938	3,41
26.11.2015	445923046	3,28
27.11.2015	7357191203	2,38
27.11.2015	8503061214	2,23
27.11.2015	6256180424	2,44
30.11.2015	7955075149	2,72
30.11.2015	8353281056	2,36
30.11.2015	9252221307	1,98
01.12.2015	7004091192	2,40
01.12.2015	8005011519	2,38
01.12.2015	520924993	1,37
01.12.2015	7453311524	1,25
01.12.2015	7451031070	2,14
01.12.2015	6758130862	2,55
01.12.2015	7160261063	2,40
01.12.2015	8662101579	1,31
03.12.2015	7708261879	3,22

03.12.2015	6110100754	1,24
07.12.2015	8704051366	1,17
07.12.2015	5602267659	2,74
07.12.2015	7912051102	2,95
07.12.2015	7059071106	2,95
08.12.2015	6807654226	3,28
08.12.2015	7152261126	2,40
08.12.2015	8361221065	2,55
08.12.2015	8055061728	2,85
08.12.2015	6602031160	2,66
09.12.2015	6009110150	2,48
11.12.2015	5759010135	3,51
14.12.2015	8853151240	2,23
15.12.2015	506213071	3,33
15.12.2015	8257085407	1,45
15.12.2015	8551101371	1,63
18.12.2015	8753241584	1,69
21.12.2015	8253281475	1,46
21.12.2015	7659081220	1,57
21.12.2015	8254051332	1,53
22.12.2015	6210170031	3,42
22.12.2015	8962311511	1,19
22.12.2015	8961191513	1,13
23.12.2015	6102101983	2,50
28.12.2015	330704914	2,02
28.12.2015	6509230947	2,24
29.12.2015	7762041055	1,37
29.12.2015	7751271076	2,06