

# ÚLOHA POLYMORFISMU GENOTYPU A FENOTYPU P450 2E1 A P450 2D6 V METABOLISMU A ÚČINCÍCH LÉČIV A KARCINOGENŮ

## THE ROLE OF P450 2E1 AND P450 2D6 GENOTYPE AND PHENOTYPE POLYMORPHISM IN METABOLISM AND ACTION OF DRUGS AND CARCINOGENS

GUT I., MILFAJTOVÁ J., PATZELOVÁ V., FRANTÍK E., ŠARMANOVÁ J., SOUČEK P., VODIČKA P.

STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, CENTRUM PRACOVNÍHO LÉKAŘSTVÍ, SKUPINA BIOTRANSFORMACE, PRAHA

**Souhrn:** Mnoho (pro)karcinogenů je metabolizováno cytochromy P450 na vlastní účinné produkty. Genetický polymorfismus P450 2D6 výrazně ovlivňuje vlastnosti tohoto enzymu (fenotyp) a může se u jedinců s defektním enzymem projevit při běžných dávkách některých léků těžkým předávkováním. Neovlivňuje ale zřejmě individuální vnímavost k chemické karcinogenezi. Naproti tomu známé polymorfismy genu P450 2E1 neovlivňují aktivitu tohoto enzymu, která je zvýšena např. alkoholem a některými léky a snížena disulfiramem, fenolickými látkami v některé zelenině a ovoci. Vysoká exprese tohoto enzymu zvyšuje riziko genotoxických účinků benzenu, styrenu a asi 80 dalších významných xenobiotik a vysvětluje mechanismus, kterým alkohol může zvýšit jejich účinky. Proto je individuální odpovědnost každého jedince, který je vystaven expozici látkám, jež P450 2E1 aktivuje, aby maximálně omezil příjem alkoholu. Aktivitu P450 2E1 lze snadno stanovit pomocí metabolismu chlorzoxazonu a tak vytipovat jedince se zvýšeným rizikem při expozici jeho substrátům. Preventivně účinnějším a obecně platným zásahem je však snížení profesionální expozice.

**Klíčová slova:** P450 2E1, P450 2D6, polymorfismus genotypu a fenotypu, karcinogeneza

**Summary:** Many (pro)carcinogens are metabolized by cytochromes P450 to actual active products. Genetic polymorphism of P450 2D6 markedly influences properties of this enzyme (phenotype) and individuals with defective enzyme may be subject to severe overdose at regular doses of some of about 40 drugs it primarily metabolizes. However, it apparently does not influence the individual sensitivity to chemical carcinogenesis. In contrast, known genetic polymorphisms of P450 2E1 do not influence the activity of this enzyme, which may be increased by alcohol and some drugs and decreased by disulfiram, phenolic compounds in some vegetables and fruit. High expression of P450 2E1 increases genotoxic effect of benzene, styrene and about 80 other important chemicals and explains mechanism by which alcohol enhances their effects. Therefore, each individual person may be responsible for decreasing the risk of exposure to chemicals known to be activated by P450 2E1 by limiting the intake of alcohol. P450 2E1 activity may be conveniently assessed by metabolism of chlorzoxazone to estimate individual risk of exposure to its procarcinogenic substrates. The decrease of occupational exposure to these chemicals is a more effective preventive measure, though.

**Key words:** P450 2E1, P450 2D6, polymorphism of genotype and phenotype, carcinogenesis

Velká část chemických (pro)karcinogenů je cytochromy P450 metabolizována na vlastní aktivní produkty (10). Proto nepřekvapuje, že u různých typů rakoviny a dalších nemocí jsou nacházeny odlišné frekvence polymorfismů genotypu a/nebo fenotypu P450 a soudí se, že v některých případech lze předem odhadnout vyšší individuální riziko expozice chemickým látkám. Tyto polymorfismy mohou také významně ovlivnit účinky léků. Rovněž vysoce polymorfní glutathion S-transferázy, N-acetyltransferázy, epoxid hydroláza, DT-diaforáza atd. zřejmě hrají významnou roli v chemické karcinogenezi.

K průkazu příčinné souvislosti mezi polymorfismem genotypu či fenotypu určitého enzymu biotransformace a individuálně zvýšeným rizikem chemické karcinogeneze je obecně třeba zodpovědět řadu otázek (Tabulka 1).

Naše pozornost se zaměřila na cytochrom P450 2D6 a P450 2E1, jejichž polymorfismy se charakteristicky liší.

### Cytochrom P450 2D6

U P450 2D6 jsou známy odpovědi za řadu výše uvedených otázek. Frekvence polymorfismu genotypu (bod 1) hlavních alel je daná zárodečnými mutacemi, uvedenými v Tabulce 2. Tyto mutace významně ovlivňují fenotyp (aktivitu enzymu) celý život jedinců (Tab.1, bod 2), kteří jsou v populaci charakterizováni podle rychlosti metabolismu jako pomalí meta-

bolizátoři (poor metabolizers, PM, u nás 3-5%), rychlí metabolizátoři (extensive, EM, většina populace) a velmi rychlí metabolizátoři (ultrarapid, URM, 1-5% populace). P450 2D6 v podstatě nelze indukovat, ale lze ho inhibovat (bod 2). Polymorfismus genotypu i fenotypu P450 2D6 se významně projevuje v metabolismu a účincích asi 40 významných léků (bod 3a) Tab. 2 a Tab. 3) a v incidenci některých typů rakoviny ale ne v metabolismu řady známých karcinogenů, takže příčinná souvislost s karcinogenezou není jasná (Tab. 2, bod 3). Navíc meta-analýza třinácti epidemiologických studií ukázala, že u největších studií nebyl vztah mezi polymorfismem P450 2D6 a rakovinou plic významný (6).

Polymorfismus fenotypu P450 2D6 byl v řadě studií sledován pomocí metabolismu sparteinu, který ale již není k dispozici. Jiný specifický substrát debrisoquin vyvolal v běžných dávkách u řady pomalých metabolizátorů těžké stavy. V poslední době je používán metabolismus dextrometorfanu, což je antitusikum, v cizině prodávané bez předpisu.

Naše studie se týkala několika aspektů P450 2D6:

1. Možnost použití různých substrátů: ve výběru ze skupiny 100 dobrovolníků, jejichž polymorfismus fenotypu P450 2D6 byl před čtyřmi lety stanoven pomocí metabolismu sparteinu, jsme zjišťovali přesnost a citlivost stanovení PM a EM fenotypu pomocí metabolismu dextrometorfanu (odpovídá bodu 2

**Tabulka 1: Podmínky průkazu souvislosti polymorfismu biotransformačních enzymů a chemické karcinogeny**

1. Jaká je frekvence polymorfismů v populaci? Nacházený rozptyl je 1- 50% populace
2. Ovlivňuje polymorfismus genotypu fenotyp (aktivitu a afinitu enzymu, tj.  $K_m$ ,  $V_{max}$ )? Pokud ne, je odlišný fenotyp stabilní a čím je ovlivněn?
3. Souvisí polymorfismus genotypu či fenotypu s rakovinou, jinými chorobami, účinky a metabolismem léků jen statisticky nebo kauzálně (ve studiích in vitro a in vivo)?
  - a) enzym aktivuje či inaktivuje karcinogen, lék?
  - b) je jediným či hlavním enzymem?
  - c) jsou rozdíly in vitro tak významné, že ovlivní metabolismus in vivo (vliv transportu, koncentrací in vivo)
  - d) jsou data ze zvířat validní pro lidi? Některé P450 enzymy ze zvířat nejsou v játrech lidí exprimovány či mají jiné vlastnosti. Jsou údaje z experimentů in vivo relevantní?
  - e) je expozice významná, nejsou jiné složky expozice významnější?
4. Je stanovení polymorfismu fenotypu specifické a spolehlivé?
5. Je u jedince karcinogenní proces zásadně ovlivňován jinými faktory a geny (např. geny BRCA1 a BRCA2 u hereditární rakoviny prsu)?
6. jakou má polymorfismus závažnost a je žádoucí intervence? Je odlišný význam pro zaměstnance a zaměstnavatele?

**Tabulka 2: Polymorfismy genu P450 2D6**

Variantní alely	Mutace	Funkce enzymu	Frekvence alel (%)			
			Běloši (Kaucasoidi)	Asiaté	Černí Afričané	Ethiopiáni, Saud-Arabové
2D6*2xN	Duplikace nebo multiplikace genu	Vyšší aktivita	1 – 5	0 – 2	2	10 – 16
2D6*3	Delece genu	Žádný enzym	<1	–	–	–
2D6*4	Defektní sestřih RNA	Inaktivní enzym	12 – 21	1	2	1 – 4
2D6*5	Delece genu	Žádný enzym	2 – 7	6	4	1 – 3
2D6*10	Pro23Ser, Ser486Thr	Nestabilní enzym	1 – 2	51	6	3 – 9
2D6*17	Thr107Ile, Arg296Cys, Ser486Thr	Vyšší $K_m$	0	–	34	3 - 9

**Tabulka 3: Důsledky fenotypu PM a URM u P450 2D6 pro účinky některých léků a riziko rakoviny**

Léčivo nebo nemoc	Příklad	Důsledek	Nepřiznivý efekt
<b>POMALÍ METABOLIZÁTOŘI</b>			
Tricyklické antidepresanty	desipramin, fluvoxamin, fluoxetin, mexiletin, citalopram	snížená klírens	předávkování kardiotoxicita
neuroleptika	haloperidol	snížená klírens	zvýšený účinek
anti-anginózní	perhexilin	snížená klírens	neuropatie
anti-arrhythmika	propafenon, mexiletin	snížená klírens	nausea, zvracení
snížení chuti k jídlu	dexfenfluramin	snížená klírens	nausea, zvracení
analgetika	tramadol	snížená klírens	snížený účinek
antitusika	kodein	snížená klírens	snížený účinek
opioidy	oxydecon, hypercodon	snížená klírens	snížená závislost!!!
rakovina	rakovina plic	nižší riziko rakoviny plic není spolehlivě prokázáno	
<b>ULTRARYCHLÍ METABOLIZÁTOŘI</b>			
antitusika	kodein	zvýšená aktivace	bolesti břicha

**Tabulka 4: Analýza polymorfismu genotypu P450 2D6**

Č.vz.	Osoba	Metabolismu sparteinu v r.1995	Metabolismu dextrometorfanu v r.1999	alela 2D6*3 del2637A (HpaII, MspI)	alela 2D6*4 G1934A (BstNI)	alela 2D6*5 (gen chybí)
G-1	MRe	PM	EM	w/w	w/w	nepřítomna
G-2	JŠ	PM	PM	w/w	w/m	nepřítomna
G-3	MR	EM	EM	w/w	w/w	nepřítomna
G-4	HJ	EM	EM	w/w	w/w	nepřítomna
G-5	TM	EM	EM	w/w	w/w	nepřítomna
G-6	NB	EM	EM	w/w	w/w	nepřítomna
G-7	LŠ	PM	PM	w/w	w/m	nepřítomna
G-8	PK	EM	EM	w/w	w/w	nepřítomna
G-9	NŘ	EM	EM	w/w	w/w	nepřítomna
G-10	JM	EM	EM	w/w	w/w	nepřítomna
IHE-38	RF	EM	EM	w/w	w/w	nepřítomna
IHE-40	PR	EM	EM	w/w	w/w	nepřítomna
IHE-41	IG	EM	EM	w/w	w/w	nepřítomna

**Tabulka 5: Důsledky fenotypu P450 2E1 pro riziko rakoviny**

1. Gen P450 2E1 je v populaci polymorfnní, polymorfismus c1/c2 (v 5'-přiléhající oblasti) se vyskytuje asi ve 2% populace a polymorfismus C/D (v intronu 6) v asi 5-10% populace
2. Polymorfismus genotypu P450 2E1 neovlivňuje významně fenotyp ( $V_{max}$  a  $K_m$  ani inducibilitu enzymu. Velké inter- i intraindividuální rozdíly fenotypu jsou dány vlivy prostředí (indukce alkoholem i léky, inhibice Antabusem i látkami z potravy)
3. Vliv odlišné frekvence polymorfismů genotypu u Japonců s rakovinou plic nelze vysvětlit aktivitou P450 2E1. Naproti tomu zvýšené riziko genotoxických účinků benzenu u Číňanů souviselo s vyšší aktivitou P450 2E1, tj. odlišným fenotypem
  - a) enzym aktivuje benzen a dalších asi 80 prokarcinogenů na genotoxické metabolity. Nemetabolizuje významně léky vyjma paracetamolu.
  - b) je jediným či hlavním enzymem xenobiotik ad 3.a.
  - c) nalezené rozdíly  $K_m$  a  $V_{max}$  u lidí in vitro a ex vivo jsou tak významné, že mohou ovlivnit metabolismus in vivo
  - d) vlastnosti P450 2E1 ( $V_{max}/K_m$ ) u zvířat a lidí jsou podobné – řada prokarcinogenů je metabolizována podobnou rychlostí a na stejné metabolity. Zvýšení genotoxicity benzenu alkoholem u zvířat lze vysvětlit indukci P450 2E1
  - e) expozice různým substrátům P450 2E1 v některých zemích je dosud významná a často vysoce převyšuje expozici dalším látkám
4. Stanovení polymorfismů genotypu pomocí PCR-RFLP je spolehlivé a určení fenotypu pomocí metabolismu chlorzoxazonu je specifické a spolehlivé
5. Nelze vyloučit, že karcinogenní proces je u exponovaných lidí ovlivňován dalšími faktory a geny
6. Známé polymorfismy genotypu P450 2E1 u bělochů zatím nemají prokázanou souvislost s různými typy rakoviny. Indukci P450 2E1 např. alkoholem lze považovat za spolehlivě prokázaný rizikový faktor při expozici prokarcinogenům, které P450 2E1 oxiduje. Intervence je věcí každého jedince, ale není informací pro zaměstnavatele

Citace k tabulce: 4, 5, 9, 11, 13, 14, 15

a 4 Tabulky 1). U výběru 8 osob, z toho 5 EM a 3 PM odpovídaly všechny osoby dříve stanovenému fenotypu vyjma jedné osoby původně určené jako PM, jejíž metabolismus dextrometorfanu odpovídal fenotypu EM.

2. Korelace genotypu a fenotypu: kvůli uvedené diskrepanci stanovení fenotypu jsme u těchto osmi a dalších pěti osob v genomové DNA určili inaktivující mutace P450 2D6 (Tab. 1, bod 2 a Tab. 4), jež dle literatury zodpovídají za status PM, tj. G1934A (alela 2D6\*4, restriktáza BstNI) a del2637 (alela 2D6\*3, restriktáza HpaII, MspI) (Tab.4). Inaktivující mutace G1934A byla zjištěna jen ve dvou ze tří osob PM a žádné EM, mutace del2637 nebyla u žádné osoby. Analýza genotypu tedy potvrdila, že předchozí stanovení fenotypu sparteinem nebylo u jedné osoby PM přesné, zřejmě pro krátký odběr moči ke stanovení metabolitů, doporučený v literatuře, který je zatížen rizikem zpožděného vylučování. Metabolismus dextrometorfanu se ukázal vhodným testem určení fenotypu P450 2D6. Polymorfismus genu P450 2D6 však poskytuje podrobnější analýzu povahy defektu genu, jehož důsledky pro fenotyp jsou dobře prostudovány.

3. Stabilita fenotypu: ukázali jsme, že fenotyp PM i EM je v ontogeneze jednotlivce zachován (Tab. 1, bod 2), což odpovídá zárodečným mutacím. Tento fakt zjednodušuje sledování významu P450 2D6 pro metabolismus a účinky chemických látek.

4. Úloha polymorfismu genotypu/fenotypu P450 2D6 v karcinogenezi: i když významně ovlivňuje metabolismus i účinky řady léků, ani poslední léta neukázala jeho účast v metabolismu známých karcinogenů nebo antikarcinogenů (cytostatik). To zpochybňuje kauzální souvislost mezi odlišnou frekvencí polymorfismu genotypu i fenotypu P450 2D6 a chemickou karcinogenezou, nalezenou v některých epidemiologických studiích. I naše studie metabolismu důležitých cytostatik ukázala malý význam tohoto enzymu pro jejich účinky (1, 12).

### Cytochrom P450 2E1

Pro význam polymorfismu fenotypu, ne však genotypu P450 2E1 v metabolismu, toxicitě a chemické karcinogenitě svědčí řada skutečností uvedených v Tabulce 5, která vychází z obecných zásad uvedených v Tabulce 1.

Chtěli jsme přispět k řešení otázky, zda se polymorfismus fenotypu P450 2E1 významně uplatňuje i v riziku expozice styrenu (IARC klasifikace 2A = pravděpodobný karcinogen) a chlorovaným derivátům benzenu, podezřelým z karcinogenity. Studovali jsme již dříve vliv P450 2E1 a dalších P450 enzymů na metabolismus benzenu (4, 5, 9), styrenu (7), chlorbenzenu, 1,2- a 1,4-dichlorbenzenu u potkana, myši a člověka in vitro (11), jejich aktivaci na genotoxické produkty alkylující DNA a vztah mezi aktivitou P450 2E1 a oxidací styrenu u dobrovolníků in vivo.

Naše výsledky ukázaly, že styren byl in vitro významně metabolizován mikrosomálním P450 2E1 potkana i člověka. Úlohu dalších enzymů P450 3A1/2 potkana i P450 3A4 člověka jsme prokázali indukci nebo inhibicí těchto dvou enzymů. Rychlost metabolismu styrenu u potkana, myši a člověka byla srovnatelná. P450 2E1 aktivoval styren in vitro účinněji než P450 3A na genotoxický metabolit styren oxid a účinněji tvořil DNA adukty.

Sledováním inhibice metabolismu chlorzoxazonu disulfirame (Antabusem) u dobrovolníků jsme zjistili, že rozdílnou aktivitu P450 2E1 lze snadno určit vylučováním jeho metabolitu močí (2). Na druhé straně dvojnásobné zrychlení metabolismu chlorzoxazonu po předchozím podání alkoholu zdravým, mladým dobrovolníkům prokázalo, že lze dobře sledovat

zvýšení aktivity P450 2E1 a zároveň to, že mírné dávky alkoholu tuto aktivitu výrazně zvýší.

Významný podíl P450 2E1 v metabolismu styrenu na styren oxid byl prokázán u lidí pomocí vylučování jeho metabolitů kyseliny mandlové a kyseliny fenylglyoxylové močí, které bylo výrazně sníženo inhibitorem P450 2E1 disulfirame (3). Tyto studie tedy přispěly k průkazu, že 1) P450 2E1 je nejvýznamnějším enzymem aktivace styrenu na genotoxické metabolity u člověka i potkana, 2) metabolismus styrenu u lidí je významně ovlivněn aktivitou P450 2E1 také in vivo, 3) polymorfismus fenotypu (ne však genotypu) P450 2E1 je významným faktorem individuální vnímavosti ke genotoxickým účinkům styrenu a 4) tento polymorfismus je významně ovlivněn alkoholem. Tyto faktory se přirozeně mohou uplatnit jen při významných opakovaných expozicích styrenu v pracovním prostředí, které u nás existovaly ještě před několika lety. Z preventivního hlediska je tedy snížení expozice zaměstnavatelem zřejmě významnějším faktorem než zjištění polymorfismu fenotypu P450 2E1. Na druhé straně je individuální zodpovědností každého zaměstnance exponovaného styrenu, aby konzumací alkoholu nezvyšoval genotoxické riziko, které expozice styrenu přináší.

Analogicky jsme ukázali, že polymorfismus fenotypu P450 2E1 by mohl přispět k individuálně odlišným účinkům dalších genotoxických látek anilinu, chlorbenzenu, 1,2-dichlorbenzenu (8), ale pravděpodobně má malý vliv na účinky potenciálního karcinogenu 1,4-dichlorbenzenu, který je převážně metabolizován poměrně málo polymorfním lidským P450 3A4.

### Závěry

1. Genetický polymorfismus P450 2D6 daný inaktivujícími mutacemi celoživotně snižuje aktivitu (mění fenotyp) tohoto enzymu a může se u daných osob projevit při běžných dávkách některých léků těžkým předávkováním. Literární údaje o odlišné frekvenci genetického polymorfismu u pacientů s některými nádory však dosud nelze kauzálně spojovat s chemickou expozicí či karcinogenezou, protože prokázané karcinogeny nepatří ke známým substrátům tohoto enzymu a meta-analýza 13 studií nepotvrdila souvislost uváděnou některými předchozími studiemi. Polymorfismus fenotypu lze snadno stanovit u lidí pomocí metabolismu dextrometorfanu, ale analýza polymorfismu genotypu z DNA bílých krvinek poskytuje podrobnější informace o povaze defektů, jejichž důsledky pro fenotyp jsou dobře známy.

2. Známé genetické polymorfismy P450 2E1 neovlivňují aktivitu tohoto enzymu. Polymorfismus jeho fenotypu je ovlivněn vlivy prostředí: aktivita je zvýšena např. alkoholem a některými léky, snížena disulfirame, fenolickými látkami v některé zelenině a ovoci a lze ji tedy do určité míry ovlivnit vlastním jednáním. Vysoká exprese tohoto enzymu zvyšuje riziko genotoxických účinků benzenu, styrenu a řady dalších významných substrátů tohoto enzymu a vysvětluje mechanismus, kterým alkohol může ovlivňovat jejich účinky. Naše studie ukazují, že polymorfismus fenotypu P450 2E1 by mohl být významným faktorem individuální vnímavosti k rakovině vyvolané substráty tohoto enzymu. Aktivitu P450 2E1 lze poměrně snadno stanovit pomocí metabolismu chlorzoxazonu. Nejlepší prevencí je samozřejmě snížení profesionální expozice, ale je obtížné vyhnout se expozici z prostředí, například ve formě některých benzinů obsahujících aromáty.

*Oznámení: studie byla podporována grantem reg.č. 6715-3 Interní grantové agentury MZ ČR.*

## Literatura:

1. Gut I, Danielová V, Holubová J, Souček P, Klučková H: Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel and docetaxel for tumor cell lines in vitro: effects of concentration, time and CYP-catalyzed metabolism. *Arch Toxicol* 74, 2000 s. 437-46.
2. Gut I, Hiršl A, Linhart I a Hurychová D: Rychlost vylučování 6-hydroxychlorzoxazonu močí jako neinvazivní test aktivity cytochromu CYP2E1 a jeho vztah k riziku genotoxicity. *Pracov Lék* 49, 1997, s. 113-120.
3. Gut I, Milfajtová J, Mráz J, Frantík E, Gilar M: Inhibice metabolismu styrenu Antabusem u lidí. *České pracovní lékařství* 2000, Supplementum 1, s. 12-18.
4. Gut I, Nedelcheva V, Souček P, Stopka P and Tichavská B: Cytochrome P450 in benzene metabolism and involvement of its metabolites and reactive oxygen species in toxicity. *Environm.Health Perspect.* 104, 1996, Suppl.6, s. 1211-1218.
5. Gut I, Nedelcheva V, Souček P, Vodička P, Gelboin HV, Ingelman-Sundberg M: The role of CYP2E1 and 2B1 in metabolic activation of benzene derivatives. *Arch.Toxicol* 71, 1996, s. 45-56.
6. Christensen PM, Gotsche PC, Brosen K: The spartein/debrisoquine (CYP2D6) oxidation polymorphism and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 51, 1997, s. 389-393.
7. Linhart I., Gut I., Šmejkal J., Novák Jan: Biotransformation of styrene in mice. Stereochemical aspects. *Chem. Res.Toxicol.* 13, 2000, s. 36-44.
8. Nedelcheva V, Gut I: Lidské a potkaní formy cytochromu P450: význam jejich srovnání pro toxikologii a metody jejich studia. *Pracov Lék* 46, 1994, s. 58-67
9. Nedelcheva V, Gut I, Souček P, Tichavská B, Mráz J, Guengerich FP and Ingelman-Sundberg M: Metabolism of benzene in human liver microsomes. Interindividual variations in relation to CYP2E1 expression. *Arch.Toxicol* 73, 1999, s. 33-40.
10. Nedelcheva V, Gut I: Cytochromes P450 in rats and humans: Methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* 24, 1994, s. 1151-1175
11. Nedelcheva V., Gut I, Souček P., Frantík E. Oxidation of monochlorobenzene, 1,2-dichlorobenzene and 1,4-dichlorobenzene by CYP2E1:rats, mice and humans. *Chem-Biol. Interactions* 115, 1998, s.53-70.
12. Pospíšilová L, Gut I, Souček P, Hodek P: Cytochromes P450 involved in cyclophosphamide, paclitaxel and docetaxel metabolism in rats. *Collect Czech Chem Com* 65, 2000, s. 1183-1190.
13. Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Traver RD, Hoener B-A, Campleman S, Li G-L, Dosemeci M, Linet M a spol.: Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609CT mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res* 57, 1997, s. 2839-2842.
14. Souček P, Šarmanová J, Gut I: Geno- a fenotypování biotransformačních enzymů. *Zdravotnické noviny* 1999, č. 27, s. 8.
30. Šarmanová J, Týnková L, Šusová S, Gut I, and Souček P: Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes: allele frequencies in the population of the Czech Republic. *Pharmacogenetics* 10, 2000, s. 781-788.