

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:  
«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ

«Φαρμακογενετική μελέτη σε ασθενείς υπό  
φαρμακευτική αντιμετώπιση της εξάρτησης από  
οπιοειδή με μεθαδόνη και βουπρενορφίνη»

Πάτα Μαρία

Λάρισα 2023

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

«ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΥΠΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ  
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΟΠΙΟΕΙΔΗ ΜΕ ΜΕΘΑΔΟΝΗ ΚΑΙ  
ΒΟΥΠΡΕΝΟΡΦΙΝΗ»

THESIS TITLE:

«PHARMACOGENOMIC STUDY IN OPIOID-ADDICTED PATIENTS  
UNDER OPIOID MAINTENANCE TREATMENT WITH METHADONE AND  
BUPRENORPHINE»

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **ΒΕΣΚΟΥΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ):**

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΤΗΝ ΟΔΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

### **ΛΙΑΔΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

### **ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ - ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από τον Νοέμβριο του 2022 μέχρι τον Μάιο του 2023.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επίκουρο Καθηγητή και επιβλέποντα της διπλωματικής μου διατριβής κ. Βεσκούκη Αριστείδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την συγκεκριμένη εργασία καθώς και για την βοήθεια του όλο αυτό το διάστημα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τη επίκουρο καθηγήτρια κ. Καλλιόπη Λιαδάκη για την πολύτιμη βοήθεια, την αμέριστη στήριξη καθώς και για την συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο που δέχτηκε να συμμετάσχει στην τριμελή επιτροπή.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και την φιλική τους διάθεση.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, Παναγιώτη και Ανδρονίκη, και στα αδέρφια μου, Δημήτρη και Γιάννη, καθώς χάρη στην οικονομική αλλά κυρίως την ηθική στήριξη τους, την εμπιστοσύνη και την ατέρμονη ενθάρρυνση τους όλα αυτά τα χρόνια κατάφερα να ολοκληρώσω τόσο τις προπτυχιακές όσο και τις μεταπτυχιακές σπουδές μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εξάρτηση από οπιοειδή είναι ένα φαινόμενο που πλήττει τη σημερινή κοινωνία παγκοσμίως. Προς την πορεία αντιμετώπισής του, εντούτοις, είναι αξιοσημείωτο ότι ανάμεσα στους ασθενείς υπάρχει ετερογένεια όσον αφορά την απόκριση στη θεραπεία και τις επιδράσεις της σε διάφορες βιοχημικές και κλινικές παραμέτρους λόγω του γενετικού τους υποβάθρου. Είναι, λοιπόν, σημαντικό να βρεθούν νέοι μοριακοί βιοδείκτες που καθιστούν εφικτή την πρόβλεψη της απόκρισης των ασθενών στην εκάστοτε θεραπεία με αποτέλεσμα τον σχεδιασμό του καταλληλότερου θεραπευτικού σχήματος για κάθε ασθενή, στα πλαίσια της εξατομικευμένης θεραπείας. Η παρούσα μελέτη, επομένως, είχε ως στόχο τη φαρμακογενετική ανάλυση σε 36 ασθενείς που βρίσκονται σε θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών με μεθαδόνη και βουπρενορφίνη στις δομές του Οργανισμού Κατά των Ναρκωτικών (ΟΚΑΝΑ) της Αθήνας. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκε ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον μ-υποδοχέα των οπιοειδών (ORPM1), ο οποίος σύμφωνα με τη βιβλιογραφία φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία απέναντι στην εξάρτηση από οπιοειδή, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστό ποιος είναι ο ακριβής ρόλος τους. Αναφορικά με τα αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της θεραπείας υποκατάστασης (μεθαδόνη ή βουπρενορφίνη) και τους γονότυπους (AA, AG ή GG) των ασθενών. Ένα υποσχόμενο εύρημα αποτελεί, ωστόσο, το ότι οι ασθενείς υπό βουπρενορφίνη με αλληλόμορφο A φαίνεται να έχουν μειωμένη επιθυμία χρήσης εκ νέου οπιοειδών (craving) σε σχέση με τους ασθενείς υπό μεθαδόνη (τιμές:  $15,8 \pm 1,9$  και  $17,1 \pm 2,1$ ), ωστόσο λόγω του χαμηλού αριθμού του δείγματος το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό ( $p=0,112$ ). Σημειώνεται ότι η εύρεση μεγάλου αριθμού ασθενών που βρίσκονται στη διαδικασία απεξάρτησης από οπιοειδή είναι μία πολύ δύσκολη διαδικασία. Τέλος, η μελέτη αυτή προσφέρει προκαταρκτικά δεδομένα ώστε να προχωρήσει αναλόγως η έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο, καθώς τα δεδομένα στον Ευρωπαϊκό είναι ελάχιστα και αντικρουόμενα ενώ στον Ελληνικό πληθυσμό ανύπαρκτα.

Λέξεις κλειδιά: Οπιοειδή, εξάρτηση, φαρμακογενετική μελέτη, μεθαδόνη, βουπρενορφίνη, ORPM1

## ABSTRACT

Opioid addiction is a social phenomenon that affects society worldwide. It is noteworthy that there is a heterogeneity among patients in response to treatment and its effects on various biochemical and clinical parameters due to their genetic background. It is, therefore, important to find novel molecular biomarkers that will contribute to prediction of the response of patients to medication. This will allow the design of the most appropriate therapeutic scheme for each patient, in the context of personalized treatment. The present study, therefore, aimed to conduct a pharmacogenetic analysis in 36 patients who are in medication assisted treatment (MAT) against opioid addiction with methadone and buprenorphine in the premises of the Organization Against Drugs (OKANA), Athens, Greece. More specifically, a single nucleotide polymorphism of the gene coding for the  $\mu$ -opioid receptor (ORPM1) was selected, which, according to the literature, appears to play an important, but largely unknown, role in the treatment of opioid dependence. Regarding the results of the study, no statistically significant differences were observed between MAT and the genotypes (AA, AG or GG) of the patients. A promising finding is, though, that patients under buprenorphine with the A allele seem to have reduced craving compared to patients under methadone (values:  $15.8 \pm 1.9$  and  $17.1 \pm 2.1$ ), however due to the low number of the sample the result is not statistically significant ( $p=0.112$ ). Noteworthy, to find a large number of patients who are under MAT is a very difficult process. Finally, this study offers preliminary data so that the research in the specific field can proceed accordingly, as the data in the European population is scarce and contradictory, while there is no available evidence in the Greek population.

Key words: opioids, addiction, pharmacogenomic study, methadone, buprenorphine, ORPM1.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### Περιεχόμενα

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....                                                                                                  | 10 |
| 1.1 Εξαρτησιογόνες ουσίες .....                                                                                   | 10 |
| 1.2 Ιστορική αναδρομή .....                                                                                       | 10 |
| 1.3 Κατηγορίες οπιοειδών .....                                                                                    | 12 |
| 1.4 Υποδοχείς οπιοειδών .....                                                                                     | 12 |
| 1.5 Τρόπος δράσης οπιοειδών .....                                                                                 | 13 |
| 1.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση εξάρτησης από οπιοειδή.....                                                          | 14 |
| 1.6.1 Θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών .....                                                                      | 14 |
| 1.6.2 Μεθαδόνη .....                                                                                              | 15 |
| 1.6.3 Βουπρενορφίνη .....                                                                                         | 16 |
| 1.7 Εθισμός και εξάρτηση .....                                                                                    | 17 |
| 1.8 Φαρμακογενετική μελέτη – Συσχέτιση του γονιδίου του υποδοχέα των οπιοειδών με την απόκριση στην θεραπεία..... | 17 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ.....                                                                                                    | 20 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....                                                                                        | 21 |
| 3.1 Συμμετέχοντες .....                                                                                           | 21 |
| 3.2 Σχεδιασμός εκκινήτων .....                                                                                    | 21 |
| 3.3 Απομόνωση DNA .....                                                                                           | 21 |
| 3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....                                                                       | 22 |
| 3.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) .....                                                                   | 23 |
| 3.6 Καθαρισμός προϊόντων PCR.....                                                                                 | 25 |
| 3.7 Αλληλούχιση .....                                                                                             | 25 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....                                                                                | 26 |
| 4.1 Δημογραφικά χαρακτηριστικά .....                                                                              | 26 |
| 4.2 Απομόνωση DNA .....                                                                                           | 27 |
| 4.3 Ενίσχυση του γονιδίου ORPM1 με PCR .....                                                                      | 27 |
| 4.4 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....                                                                         | 28 |
| 4.5 Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR .....                                                                       | 29 |
| 4.6 Σύνδεση του γονοτύπου με τη θεραπεία υποκατάστασης .....                                                      | 30 |



|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.7 Σύνδεση του γονοτύπου με την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών .....                                      | 31 |
| 4.8 Σύνδεση του γονοτύπου με την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών με βάση τη θεραπεία υποκατάστασης.....     | 32 |
| 4.9 Σύνδεση του αλληλόμορφου με την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών με βάση τη θεραπεία υποκατάστασης ..... | 33 |
| 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....                                                                                          | 34 |
| BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....                                                                                             | 35 |

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ζήτημα της εξάρτησης από ναρκωτικές ουσίες είναι ένα μείζον φαινόμενο, το οποίο εμφανίζεται ανεξαιρέτως σε όλες τις κοινωνίες και αφορά όλες τις ηλικιακές ομάδες, από εφήβους μέχρι ενήλικες. Η έκταση αυτού του φαινομένου φανερώνει την αναγκαιότητα περιορισμού του σε παγκόσμιο επίπεδο.

### 1.1 Εξαρτησιογόνες ουσίες

Εξαρτησιογόνος ουσία είναι κάθε φυσική, ημισυνθετική ή συνθετική ουσία που επιδρά στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), και που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αλλάξει κάποιο άτομο την διάθεσή του (Ε.Π.Ι.Ψ.Υ. – Ο. ΚΑ. ΝΑ., 2003). Οι ουσίες αυτές έχουν επιπτώσεις σε σωματικό, πνευματικό και ψυχοκοινωνικό επίπεδο και προκαλούν σωματική και ψυχική εξάρτηση. Στις εξαρτησιογόνες ουσίες ανήκουν τόσο κατασταλτικά όσο και διεγερτικά του ΚΝΣ. Περιλαμβάνονται ουσίες η χρήση των οποίων διώκεται ποινικά από τον νόμο και μπορεί να είναι φυτικής προέλευσης ή ημισυνθετικά παράγωγα (κάνναβη, κοκαΐνη, οπιοειδή/ηρωίνη) και συνθετικά παρασκευάσματα (αμφεταμίνες, μεθαμφεταμίνες). Επιπλέον, στις ουσίες με εξαρτησιογόνο δράση ανήκουν ο καπνός, η καφεΐνη και το αλκοόλ, οι οποίες δεν απαγορεύονται νομικά. Τέλος, στις ουσίες αυτές συμπεριλαμβάνονται οι βενζοδιαζεπίνες, οι οποίες ενώ συνταγογραφούνται νόμιμα ως φάρμακα για την καταπολέμηση του άγχους και της αϋπνίας, προκαλούν σωματική και ψυχική εξάρτηση.

### 1.2 Ιστορική αναδρομή

Αξίζει να αναφερθεί ότι το όπιο και τα παράγωγά του μπορούν να χαρακτηριστούν ως η μακροβιότερη και καλύτερα καταγεγραμμένη φαρμακευτική ουσία (Brownstein 1993). Ο όρος οπιοειδή χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Acheson με σκοπό να ονομάσει τις ουσίες που είχαν παρόμοια δράση με την μορφίνη. Πλέον, ως οπιοειδή αναφέρονται οι ουσίες που συνδέονται με τους υποδοχείς των οπιοειδών και είτε δρουν ως αγωνιστές είτε ως ανταγωνιστές (Martin 1983).

Το όπιο παράγεται από την μήκωνα την υπνοφόρο (Εικόνα 1), ένα φυτό που ανήκει στην οικογένεια των παπαρουνοειδών (papaveraceae) και εντοπίζεται σε διάφορες ασιατικές χώρες καθώς και σε περιοχές γύρω από την Μεσόγειο (Booth 1998).

Τα πρώτα στοιχεία για τη χρήση των οπιοειδών καταγράφονται κατά τη νεολιθική εποχή (3500 πΧ), ενώ η πρώτη απόδειξη για τη χρήση τους απαντάται στους Σουμερίους (5000 πΧ). Από την ανακάλυψη υπολειμμάτων οπίου σε Αιγυπτιακό τάφο τον 15<sup>ο</sup>



**Εικόνα 1:** Μήκων η υπνοφόρος

αιώνα πΧ φαίνεται ότι το φυτό ήταν γνωστό και στους Ασσύριους και στους αρχαίους Αιγύπτιους (Cohen 1969).

Το όπιο (Εικόνα 2) ήταν γνωστό στην αρχαία Ελλάδα ήδη από τον 7<sup>ο</sup> πΧ αιώνα λόγω των υπνωτικών και καταπραϋντικών ιδιοτήτων του, καθώς βρέθηκαν ευρήματα καρπών παπαρούνας σε ανασκαφές στη Σάμο και στις Μυκήνες (Kritikos 1968). Υπάρχουν αναφορές ότι η θεά Δήμητρα μετά την απαγωγή της κόρης της έλαβε όπιο προκειμένου να ηρεμήσει. Επίσης, στην Οδύσσεια του Ομήρου αναφέρεται η ουσία νηπενθές, η οποία πιστεύεται ότι περιείχε όπιο και χαρακτηρίστηκε ως το φάρμακο της λησμονιάς (Kritikos & Papadaki 1967). Ακόμη, ο Ιπποκράτης χρησιμοποιούσε το μηκώνιο ως καθαρτικό και ως φάρμακο για τη θεραπεία της λευκόρροιας (Booth, 1998).



**Εικόνα 2: Όπιο**

Κατά τη ρωμαϊκή εποχή το όπιο χρησιμοποιούνταν ως υπνωτική και θανατηφόρα ουσία (Booth 1998). Μάλιστα, γινόταν εκτεταμένη χρήση του από όλες τις τάξεις της αυτοκρατορίας με σκοπό την επίτευξη ευφορίας. Τον 2<sup>ο</sup> μΧ. αιώνα ο Γαληνός αρχίζει να αντιλαμβάνεται τις επιπτώσεις από την υπερβολική χρήση του οπίου (Wright 1968).

Τον 12<sup>ο</sup> μΧ. αιώνα ήρθαν στην επιφάνεια οι μελέτες του Πεδάνιου Διοσκουρίδη αναφορικά με τις ιδιότητες του οπίου (Baraka, 2000). Κατά τον 11<sup>ο</sup> αιώνα, στην Ανατολή, ένας γνωστός μουσουλμάνος ιατρός ονόματι Avicenna χρησιμοποίησε το όπιο για τη θεραπεία ποικίλων ασθενειών (Al-Mazroa & Halim 1989). Έπειτα το όπιο έγινε γνωστό στην Κίνα και στην Ινδία μέσω των εμπορικών συναλλαγών των Οθωμανών με τα κράτη αυτά (Duarte 2005).

Κατά την περίοδο της Αναγέννησης, ο Παράκελσος παρασκευάζει το φάρμακο λαύδανο, γνωστό και ως «Πέτρα της Αθανασίας», το οποίο προέρχεται από το όπιο (Baraka 2000, Macht 1915). Αξίζει να σημειωθεί ότι, την εποχή των Ανακαλύψεων το όπιο χρησιμοποιήθηκε για την υποταγή των Ινδιάνικων πληθυσμών, με αποτέλεσμα τον «Πόλεμο του Οπίου» τον 19<sup>ο</sup> αιώνα ανάμεσα σε Κίνα, Αγγλία και Γαλλία (Booth 1998).

Το 1803, ο Freidrich Serturmer απομόνωσε το ενεργό συστατικό του οπίου. Έπειτα παρασκευάστηκε το πρώτο ημισυνθετικό, η μορφίνη, η οποία πήρε το όνομά της από τον θεό του ύπνου, τον Μορφέα (Macht 1915, Hamilton 2000). Ακολούθως, έγιναν και άλλες ανακαλύψεις οι οποίες οδήγησαν στην σημερινή κατάταξη των 25 αλκαλοειδών του οπίου σε δύο κατηγορίες: τα παράγωγα του φαινανθρενίου και τα παράγωγα της βενζυλισοκινόλης (Λιάππας 1992). Κατόπιν, η μορφίνη εξαπλώθηκε ευρέως και χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα σε όλους τους πολέμους λόγω της αναλγητικής δράσης της (Baraka 2000, Booth 1998). Ακολούθησε η παραγωγή ουσιών που προέρχονται από τη μορφίνη, όπως η ηρωίνη (1899), η υδροκωδεΐνη, η μεθαδόνη (Β' Παγκόσμιος πόλεμος) και η φεντανύλη (1960) (Murphee 1969, Janssen 1982).

### **1.3 Κατηγορίες οπιοειδών**

Τα οπιοειδή διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα ενδογενή και τα εξωγενή. Ως ενδογενή αναφέρονται εκείνα που παράγονται φυσιολογικά από τον οργανισμό όπως οι ενδορφίνες, οι εγκεφαλίνες, οι δυνορφίνες και οι ενδομορφίνες. Τα εξωγενή οπιοειδή περιλαμβάνουν τα φυσικά οπιούχα, τα ημισυνθετικά οπιοειδή και τα πλήρως συνθετικά οπιοειδή. Τα φυσικά οπιούχα είναι αλκαλοειδή τα οποία εντοπίζονται κυρίως στη ρητίνη της παπαρούνας του οπίου(μορφίνη, κωδεΐνη). Ακόμη ως φυσικά οπιούχα θεωρούνται τα φύλλα από το φυτό *Mitragyna speciosa*, αλλά και η *Salvinorin A* η οποία περιέχεται στο φυτό *Salvia Divinorum*. Τα ημισυνθετικά οπιοειδή δημιουργούνται από τα φυσικά οπιούχα και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την υδρομορφόνη, την υδροκωδόνη, την οξυμορφίνη και την διακετυλομορφίνη (ηρωίνη). Τέλος, στα πλήρως συνθετικά οπιοειδή ανήκουν ουσίες όπως η φαιντανύλη, η μεθαδόνη και η τραμαδόλη.

### **1.4 Υποδοχείς οπιοειδών**

Τα οπιοειδή συνδέονται σε υποδοχείς των οπιοειδών προκειμένου να ασκήσουν τις δράσεις τους. Οι υποδοχείς αυτοί εντοπίζονται στο ΚΝΣ, στον γαστρεντερικό σωλήνα, στον νωτιαίο μυελό, στον καρδιακό μυ, στους πνεύμονες, στο ήπαρ, στο αναπαραγωγικό σύστημα (Wittert et al 1996), στα φαγοκυτταρικά λεμφοκύτταρα και στα Τ λεμφοκύτταρα (Yaksh 1989). Οι υποδοχείς των οπιοειδών διακρίνονται σε τρεις βασικές κατηγορίες: τους  $\mu$ , τους  $\kappa$  και τους  $\delta$  (Law & Loh 1999, Pasternack 2004, Feng et al 2012). Οι οικογένειες αυτές των υποδοχέων περιλαμβάνουν και συγκεκριμένους υπότυπους. Η οικογένεια των  $\mu$  υποδοχέων διακρίνεται στους υπότυπους MOR1, MOR2, MOR3. Η οικογένεια των  $\kappa$  υποδοχέων περιλαμβάνει τους KOR1a, KOR1b, KOR2 και KOR3 υπότυπους, ενώ οι  $\delta$  υποδοχείς διακρίνονται σε DOR1 και DOR2 (Feng et al 2012, Simonin et al 1994). Οι υποδοχείς αυτοί διαφέρουν ως προς την έκφραση και την κατανομή τους στα διάφορα όργανα και την συγγένεια για διάφορους προσδέτες και εμπλέκονται σε διαφορετικές επιδράσεις των οπιοειδών (Bary & Zuo 2005). Πιο συγκεκριμένα, στον  $\mu$  υποδοχέα συνδέεται κυρίως η μορφίνη και η ηρωίνη και ο υποδοχέας αυτός σχετίζεται με την πρόκληση

ευφορίας, την καταστολή του αναπνευστικού, με την αναλγητική δράση αλλά και με την εξάρτηση. Οι κ υποδοχείς σχετίζονται με την αναλγησία και την καταστολή, ενώ οι δ υποδοχείς με την αναλγησία και την εξάρτηση (Harvey & Champe 1995).

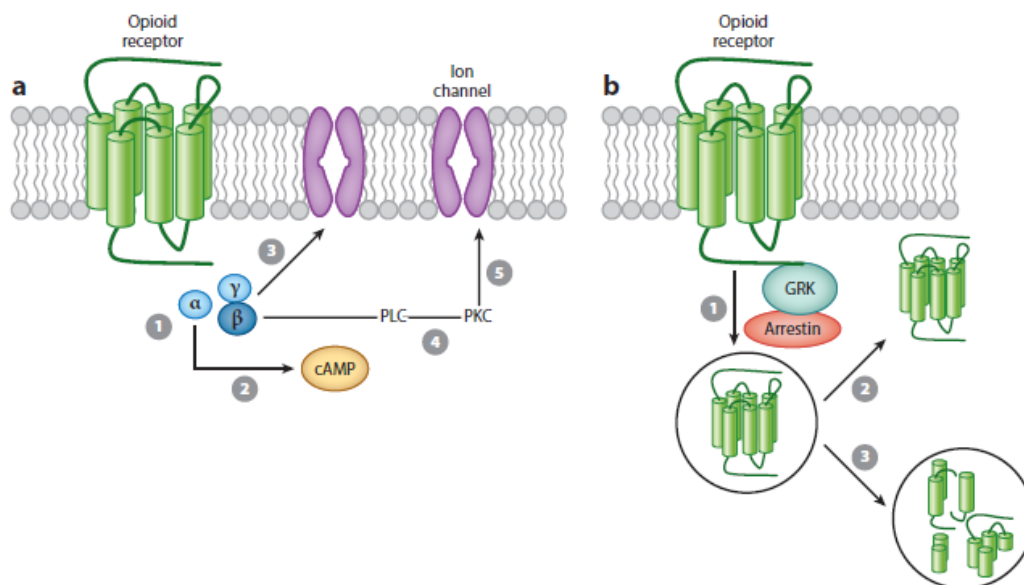
### 1.5 Τρόπος δράσης οπιοειδών

Οι υποδοχείς των οπιοειδών είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (GPCRs). Συγκεκριμένα, ανήκουν στην υποοικογένεια Α και στην ομάδα γ (Stein 2016).

Μετά τη σύνδεση ενός προσδέτη στον υποδοχέα πραγματοποιούνται αλλαγές στην διαμόρφωση του υποδοχέα που έχουν ως αποτέλεσμα τη δέσμευση της ετεροτριμερούς G-πρωτεΐνης στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα (Stein 2016). Οι G-πρωτεΐνες αποτελούνται από δύο υπομονάδες: την α και την βγ υπομονάδα (οι υπομονάδες β και γ παραμένουν πάντα συνδεδεμένες και λειτουργούν ως σύμπλοκο (Kudla & Przewlocki 2021). Αφού ενεργοποιηθεί η G-πρωτεΐνη, οι δύο υπομονάδες αποχωρίζονται. Η υπομονάδα Gα αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση μειώνοντας έτσι την παραγωγή του cAMP. Η υπομονάδα Gβγ αλληλεπιδρά απευθείας με διαφορετικά κανάλια στην μεμβράνη του κυττάρου (Stein 2016) (Εικόνα 3).

Οι υποδοχείς των οπιοειδών μπορούν να ρυθμίσουν προσυναπτικά αλλά και μετασυναπτικά κανάλια ασβεστίου (μέσω της φωσφολιπάσης C και της φωσφοκινάσης C), αναστέλλοντας την εισροή ασβεστίου με αποτέλεσμα να μειώνεται η απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των υποδοχέων των οπιοειδών συνεπάγεται και ενεργοποίηση των καναλιών επανορθωτικού ρεύματος εισόδου καλίου (GIRK), αποτρέποντας έτσι τη διέγερση του νευρώνα και τη διάδοση του δυναμικού δράσης. Αυτός είναι και ο μηχανισμός με τον οποίο τα οπιοειδή συνδέονται με την αναλγησία, προκαλώντας μειωμένη αντίληψη του πόνου (Stein 2016).

Όσον αφορά τον μηχανισμό απευαισθητοποίησης και ανακύκλωσης του υποδοχέα (Εικόνα 1, β), σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι κινάσες GRK (G protein-coupled receptor kinase). Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν τον υποδοχέα και αυτή η φωσφορυλίωση επάγει την αντικατάσταση της G-πρωτεΐνης από την β-αρρεστίνη. Έτσι η G-πρωτεΐνη δεν μπορεί να συνδεθεί στον υποδοχέα και η μετάδοση του σήματος σταματά. Αφού η β-αρρεστίνη συνδεθεί με τον υποδοχέα υπάρχουν δύο εναλλακτικοί οδοί: είτε ακολουθεί η εσωτερίκευση (ενδοκυττάρωση) του απευαισθητοποιημένου υποδοχέα μέσω του μονοπατιού της κλαθρίνης, είτε ακολουθεί η ανακύκλωση του υποδοχέα αφού οδηγηθεί στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση (Stein, 2016).



**Εικόνα 3:** Σηματοδότηση και ανακύκλωση των υποδοχέων των οπιοειδών (Stein 2016).

## 1.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση εξάρτησης από οπιοειδή

Μέχρι τις αρχές του 1970 δινόταν περισσότερη έμφαση στην απαγόρευση την χρήσης καθώς και της διακίνησης των ναρκωτικών (Μαρσέλλος 1997). Το 1971 με την συνθήκη του ΟΗΕ για τις ψυχοτρόπες ουσίες (N.348/1976, N.1105/1972) το ενδιαφέρον επικεντρώνεται περισσότερο στην θεραπευτική προσέγγιση (UNGASS 1998). Στην Ευρώπη οι κύριες θεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν ψυχοκοινωνικές παρεμβάσεις, σωματική αποτοξίνωση και τη θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών. Η θεραπεία πραγματοποιείται σε εξειδικευμένες μονάδες όπως κέντρα απεξάρτησης, νοσοκομεία και ψυχιατρικές κλινικές. Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών αφορά σε εξάρτηση από τη χρήση οπιοειδών και η θεραπεία υποκατάστασης αποτελεί την κυρίαρχη θεραπευτική προσέγγιση. Τα πλεονεκτήματα της θεραπείας υποκατάστασης που έχουν παρατηρηθεί αφορούν σε μεγαλύτερο διάστημα παραμονής των ασθενών στη θεραπεία, στη μειωμένη παράνομη χρήση οπιοειδών και στη μείωση της θνησιμότητας από υπερβολική δόση οπιοειδών (EMCDDA 2015).

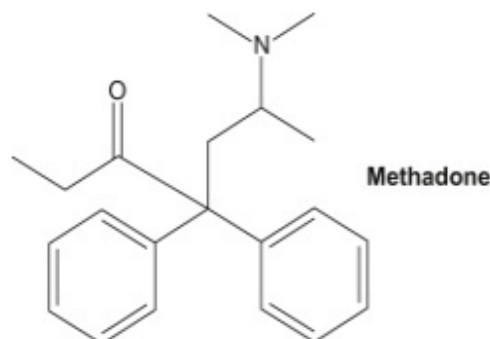
### 1.6.1 Θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών

Όσον αφορά την θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών, το υποκατάστατο που χρησιμοποιείται σε μεγαλύτερο ποσοστό είναι η μεθαδόνη (χορηγείται στο 69% των ασθενών) και το αμέσως επόμενο είναι η βουπρενορφίνη (χορηγείται στο 28% των ασθενών). Επίσης χρησιμοποιούνται σε μικρότερο ποσοστό και άλλες ουσίες όπως η μορφίνη βραδείας αποδέσμευσης και η διακετυλμορφίνη (ηρωίνη) (EMCDDA 2015). Οι φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία

υποκατάστασης συνδέονται με τους υποδοχείς των οπιοειδών παράγοντας παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των ενδογενών οπιοειδών (Julien 1998).

### 1.6.2 Μεθαδόνη

Η μεθαδόνη (Εικόνα 4) είναι ένα συνθετικό οπιοειδές, το οποίο αποτελείται από δύο εναντιομερή, το R ή I το οποίο είναι το ενεργό και το S ή d που είναι το ανενεργό εναντιομερές (Ferrari et al. 2004). Το R εναντιομερές έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τους υποδοχείς των οπιοειδών και ευθύνεται για τα κύρια θεραπευτικά αποτελέσματα της μεθαδόνης, ενώ το S εναντιομερές



σχετίζεται συνήθως με τις δυσμενείς **Εικόνα 4: Μεθαδόνη (Dasgupta 2020)** επιδράσεις (Ear CB et al. 2002). Η μεθαδόνη δεσμεύεται τόσο στους  $\mu$  όσο και στους  $\kappa$  και  $\delta$  υποδοχείς των οπιοειδών αλλά παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για τους  $\mu$  υποδοχείς (Harvey & Champe 1995).

Η μεθαδόνη εμφανίζει μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα και υψηλή απορρόφηση. Αιχνεύεται στο πλάσμα 15-45 λεπτά μετά τη χορήγηση, ενώ τα ανώτερα επίπεδα της επιτυγχάνονται σε 2,5 με 4 ώρες (De Castro et al. 1996). Η μεθαδόνη κατανέμεται σε ολόκληρο το σώμα μέσω της δέσμευσής της με πρωτεΐνες όπως γλυκοπρωτεΐνες και αλβουμίνη (De Vos 1995, Chhabra et al 2008). Η βιομετατροπή (μεταβολισμός) της μεθαδόνης πραγματοποιείται από το κυτόχρωμα P450 (CYP3A4, CYP2D6, CYP2B6, CYP1A2) παράγοντας τους μεταβολίτες πυρρολίνη και πυρρολιδίνη (Rostami et al 1999, Lugo et al 2005). Η μεθαδόνη απεκκρίνεται μέσω των ούρων και των κοπράνων (Kreek et al 2010).

Στη θεραπεία υποκατάστασης η μεθαδόνη χορηγείται με την μορφή διαλύματος. Αρχικά χορηγούνται 20 – 40 mg ανά 24ωρο και ακολούθως η ποσότητα αυτή αυξάνεται ως τα 80 – 150 mg με σκοπό την αθροιστική δράση. Στο σημείο αυτό προκαλείται καταστολή καθώς και αναπνευστική ανεπάρκεια (Kreek et al. 2010).

Αξιοσημείωτο είναι ότι υπάρχει διαφορά στην απόκριση, στη θεραπεία και στην ανοχή μεταξύ των ασθενών. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην αναλογία των εναντιομερών (R)/(S), καθώς όπως αναφέρθηκε η R μορφή οφείλεται για την παρόμοια δράση της μεθαδόνης με τα οπιοειδή ενώ η S μορφή σχετίζεται με τις παρενέργειες (Meini et al. 2015, Fonseca & Torrens 2018). Επιπροσθέτως, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το γενετικό προφίλ των ασθενών καθώς φαίνεται ότι επηρεάζει την απόκρισή τους στη θεραπεία (Fonseca & Torrens 2018). Πολλές έρευνες συσχετίζουν την απόκριση στη θεραπεία υποκατάστασης με γενετικούς



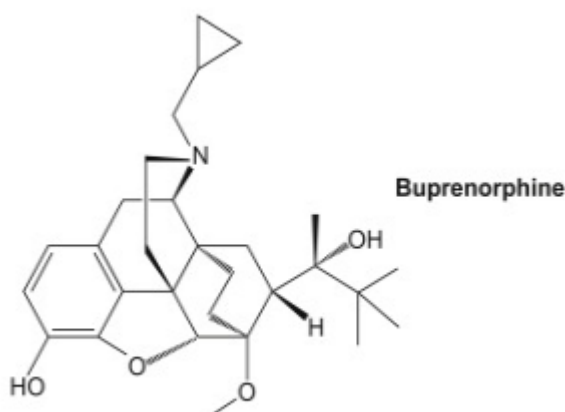
πολυμορφισμούς σε ένζυμα του μεταβολισμού ή σε πρωτεΐνες-μεταφορείς (όπως η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη) ή ακόμη και με πολυμορφισμούς σε παράγοντες που σχετίζονται με τη φαρμακοδυναμική όπως ο μ οπιοειδής υποδοχέας, οι υποδοχείς ντοπαμίνης ή η β-αρρεστίνη (Li Y et al. 2008, Somogyi 2014).

### 1.6.3 Βουπρενορφίνη

Η βουπρενορφίνη (Εικόνα 5) αποτελεί ένα συνθετικό ανάλογο του οπίου και έχει το μοναδικό χαρακτηριστικό ότι μπορεί να δρα και ως αγωνιστής αλλά και ως ανταγωνιστής διαφορετικών υποδοχέων. Αποτελεί μερικό αγωνιστή των μ υποδοχέων και ανταγωνιστή των κ υποδοχέων (Strain 2006). Ακόμη ένα χαρακτηριστικό της βουπρενορφίνης είναι ότι εμφανίζει ceiling effect, το οποίο σημαίνει ότι πάνω από μία συγκεκριμένη δόση δεν εμφανίζει επίδραση, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα υπερδοσολογίας (Leventelis et al. 2020).

Η βουπρενορφίνη εμφανίζει μεγάλο χρόνο ημιζωής που ανέρχεται περίπου στις 32 ώρες και για τον λόγο αυτό είναι δυνατή η χορήγησή της ανά δύο μέρες (Chiang & Hawks 2003). Η επίδρασή της ξεκινά περίπου μισή ώρα μετά τη χορήγηση, ενώ τα υψηλότερα επίπεδά της στο πλάσμα επιτυγχάνονται σε 1-3 ώρες περίπου (Bart 2012). Η βουπρενορφίνη υφίσταται εκτεταμένο μεταβολισμό πρώτης διόδου. Μεταβολίζεται στο ήπαρ από το κυτόχρωμα P450 και συγκεκριμένα από το CYP3A4 (Harrison 2018).

Όσον αφορά τη θεραπεία υποκατάστασης, η βουπρενορφίνη χορηγείται είτε με τη μορφή δισκίων που λαμβάνονται υπογλώσσια είτε με ενδοφλέβια χορήγηση. Επίσης, η βουπρενορφίνη κυκλοφορεί σε συνδυασμό με την ναλοξόνη η οποία αποτελεί ανταγωνιστή των οπιοειδών (Strain 2006). Κατά την έναρξη της θεραπείας χορηγείται αρχικά χαμηλή δόση της τάξης των 2-4 mg και σταδιακά η δοσολογία αυξάνεται μέχρι τα 16 mg (Saxon et al. 2013).



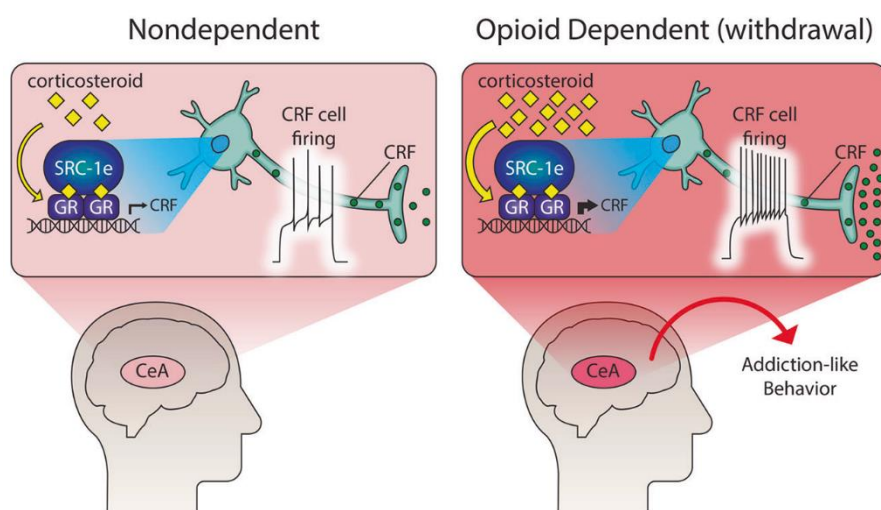
**Εικόνα 5:** Βουπρενορφίνη (Dasgupta 2020)



## 1.7 Εθισμός και εξάρτηση

Ως εξάρτηση καλείται η συνεχής ανάγκη ενός ατόμου για χρήση μίας ουσίας και αυτή μπορεί να είναι είτε σωματική είτε ψυχική. Υπάρχουν κάποια κριτήρια τα οποία χαρακτηρίζουν την εξάρτηση. Αυτά μπορεί να είναι: η έντονη επιθυμία για λήψη της ουσίας, η ανοχή στην ουσία (λόγω της συνεχούς χρήσης μειώνεται η αποτελεσματικότητα της ουσίας στον οργανισμό και έτσι χρειάζεται η λήψη μεγαλύτερης δόσης ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα), η εμφάνιση συμπτωμάτων στέρησης αν μειωθεί ή σταματήσει η χρήση της ουσίας, η επίμονη και ανεξέλεγκτη χρήση της ουσίας παρά την αναγνώριση των αρνητικών επιδράσεών της, η παραμέληση οποιασδήποτε άλλης δραστηριότητας και η προσήλωση αποκλειστικά στην ανεύρεση της ουσίας. Για να χαρακτηριστεί ένα άτομο ως εξαρτημένο από μία ουσία θα πρέπει να πληρούνται τουλάχιστον τρία από αυτά τα κριτήρια (Cami & Farre 2003).

Η εξάρτηση προκαλείται μέσω ενός μηχανισμού αύξησης της έκλυσης ντοπαμίνης (Εικόνα 6). Συγκεκριμένα η λήψη της ουσίας αποτελεί ερέθισμα για την υπερδιέγερση του συστήματος της ντοπαμίνης με τελικό αποτέλεσμα την πρόκληση αισθήματος ευχαρίστησης και ανάγκης για επαναλαμβανόμενη χρήση της ουσίας (Cami & Farre 2003).



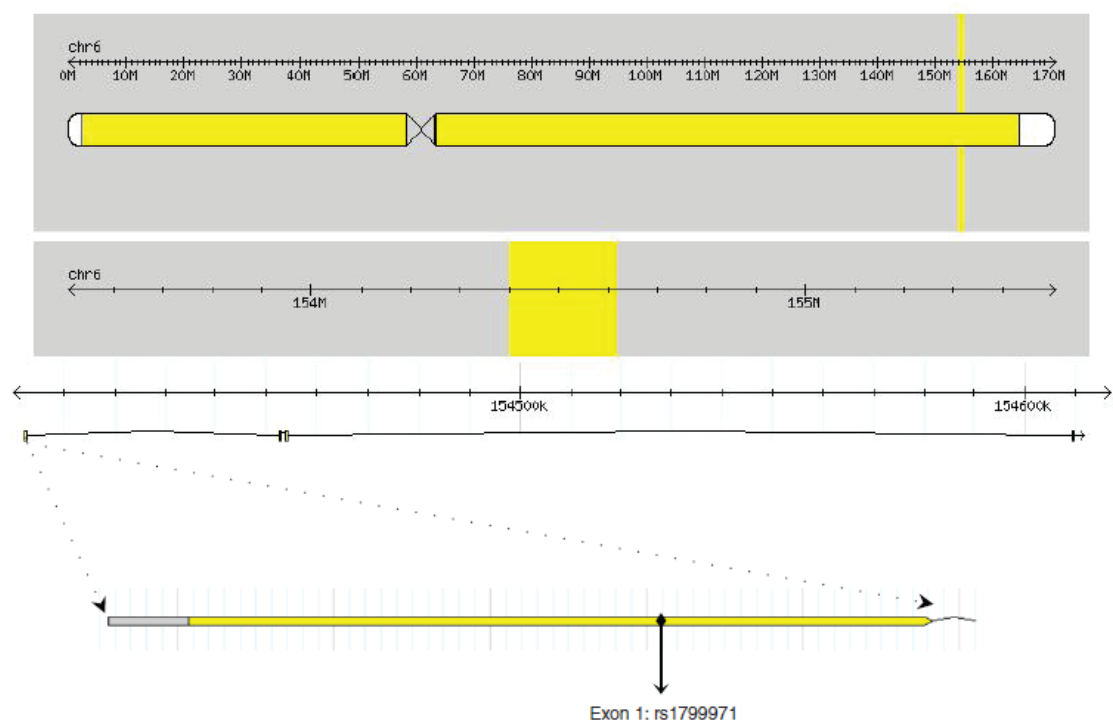
**Εικόνα 6:** Πρόκληση εξάρτησης από οπιοειδή (Carmack 2022).

## 1.8 Φαρμακογενετική μελέτη – Συσχέτιση του γονιδίου του υποδοχέα των οπιοειδών με την απόκριση στην θεραπεία

Έχει παρατηρηθεί ότι μεταξύ των ασθενών υπάρχει ετερογένεια όσον αφορά την απόκριση στη θεραπεία. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως μοριακοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, γενετικές παραλλαγές, επιγενετικές τροποποιήσεις (Somogyi AA 2014, Bauer IE 2015). Γενετικοί πολυμορφισμοί σε συγκεκριμένα γονίδια που εμπλέκονται στον τρόπο δράσης των

οπιοειδών, όπως γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς οπιοειδών ή μεταβολικά ένζυμα, φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση στη θεραπεία και στις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των ασθενών (Dennis BB 2014, Ahmad 2018). Οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορεί να αποτελούν μοριακούς δείκτες για την πρόβλεψη της απόκρισης καθώς και για την επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος σε κάθε ασθενή με απώτερο σκοπό την εξατομικευμένη θεραπεία και την επιτυχή απόκριση (Xie 2022).

Στην παρούσα εργασία θα γίνει αναφορά σε έναν συγκεκριμένο πολυμορφισμό που αφορά το γονίδιο που κωδικοποιεί τον μ-υποδοχέα των οπιοειδών (ORPM1) (Εικόνα 7). Επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος υποδοχέας καθώς αποτελεί στόχο και των δύο φαρμάκων, τόσο της μεθαδόνης όσο και της βουπρενορφίνης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο του ORPM1 μπορεί να είναι υπεύθυνες για τη διαφορετική απόκριση στη θεραπεία αλλά και να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη εξάρτησης στα οπιοειδή (Shi et al. 2002, Bond et al. 1998, Ikeda et al. 2005, Goldman et al. 2005). Το γονίδιο του ORPM1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 στη θέση 38. Ο πολυμορφισμός rs1799971 αποτελεί έναν μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό (single nucleotide polymorphism – SNP) που εντοπίζεται στο εξόνιο 1 του γονιδίου ORPM1 και αφορά την αλλαγή της αδερίνης σε γουανίνη (A118G). Η παραλλαγή 118G σχετίζεται με αυξημένη συγγένεια σύνδεσης με τον υποδοχέα (Bond 1998) και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης εξάρτησης (Taqi 2019). Ο πολυμορφισμός αυτός έχει ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση του αμινοξέος ασπαραγίνη με το αμινοξύ ασπαραγινικό οξύ στη θέση 40 του υποδοχέα (N40D) (Haerian 2013). Αυτή η αλλαγή τροποποιεί τη δομή και τη λειτουργία του υποδοχέα και επηρεάζει θέσεις γλυκοζυλίωσης στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα, επιδρώντας στη σηματοδότηση και την έκφρασή του (Haerian 2013, LaForge 2000, Yuferson 2010, Kasai 2011). Επιπλέον, ο πολυμορφισμός αυτός τροποποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου ORPM1 λόγω μεθυλίωσης σε παρακείμενες νησίδες CpG, μειώνοντας έτσι τη δραστηριότητα των οπιοειδών και αυξάνοντας την απαιτούμενη δόση ώστε να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα (Oertel 2012). Ο πολυμορφισμός rs1799971, λοιπόν, φαίνεται ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εξάρτηση από οπιοειδή (Haerian BS 2013). Σύμφωνα με μελέτες, η παρουσία του G αλληλόμορφου έχει συσχετιστεί με αυξημένη ευαισθησία στην εξάρτηση από οπιοειδή (Haerian 2013, Mague 2009, Wang 2012). Η εμφάνιση του G αλληλόμορφου είναι συχνότερη σε Ασιατικούς πληθυσμούς σε σύγκριση με Ευρωπαϊκούς ή Αφρικανικούς πληθυσμούς (33, 12 και 2% αντίστοιχα) (Haerian 2013). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το G αλληλόμορφο φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου και να καθιστά τους Ασιατικούς πληθυσμούς περισσότερο ευαίσθητους στα οπιοειδή (Haerian 2013).



**Εικόνα 7:** Ο πολυμορφισμός rs1799971 στο εξόνιο 1 του γονιδίου ORPM1 (Haerian 2013).

## **2. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η φαρμακογενετική ανάλυση δειγμάτων αίματος ασθενών οι οποίοι βρίσκονται σε θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών και λαμβάνουν ως θεραπευτικό σχήμα τις ουσίες μεθαδόνη και βουπρενορφίνη. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη στοχεύει στην εύρεση του γονοτύπου κάθε ασθενούς όσον αφορά έναν συγκεκριμένο πολυμορφισμό που απαντάται στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των οπιοειδών. Μέσω αυτής της διαδικασίας, σκοπός είναι η σύνδεση τόσο των διαφορετικών γονοτύπων όσο και των αλληλόμορφων με την επιλογή του φαρμάκου που λαμβάνει ο κάθε ασθενής ως θεραπεία καθώς και με την επιθυμία να κάνει εκ νέου χρήση οπιοειδών. Απώτερος στόχος είναι η εύρεση της πιο κατάλληλης και αποτελεσματικότερης θεραπείας για κάθε ασθενή, δηλαδή η εξατομικευμένη προσέγγιση στη θεραπεία από την εξάρτηση στα οπιοειδή.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Συμμετέχοντες

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν συνολικά 36 δείγματα αίματος από ασθενείς εξαρτημένους από οπιοειδή που βρίσκονται σε θεραπεία υποκατάστασης λαμβάνοντας τα φάρμακα μεθαδόνη και βουπρενορφίνη. Οι ασθενείς αυτοί παρακολουθούν προγράμματα απεξάρτησης του OKANA (Οργανισμός Κατά των Ναρκωτικών).

#### 3.2 Σχεδιασμός εκκινήτων

Ο σχεδιασμός των εκκινήτων έγινε με τη βοήθεια του υπολογιστικού εργαλείου Primer designing tool του NCBI. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι αλληλουχίες των εκκινήτων:

**Πίνακας 1:** Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν

| Εκκινήτες        | Αλληλουχία         | Tm    |
|------------------|--------------------|-------|
| Forward ORPM1-F2 | TGATGAGCCTCTGTGAAC | 54 °C |
| Reverse ORPM1-R2 | CTTAAGCCGCTGAACCCT | 56 °C |

Στην εικόνα 8 επισημαίνονται με κίτρινο χρώμα οι θέσεις υβριδισμού των εκκινήτων καθώς και με κόκκινο χρώμα η θέση του πολυμορφισμού που μελετήθηκε.

TGATGAGCCTCTGTGAAC TACTAAGGTGGGAGGGGGCTATACGCAGAGGAGAATGTCAGATGCTCAGCTCGGTCCCCCTCCGCTGACGCTCCTCTCTGTCTCAGCCAGGACTGGTTTCTGTAAAGAAACAGCAGGAGCTGTGGCAGCGGCGAAAGGAAGCGGCTGAGGCGCTTGGAAACCCGAAAAGTCTCGGTGCTCCTGGCTACCTCGCACAGCGGTGCCCGCCCGGCCGTCAGTACCATGGACAGCAGCGCTGCCCCACGAACGCCAGCAATTGCACTGATGCCTTGGCGTACTCAAGTTGCTCCCCAGCACCCAGCCCCGGTTCTGGGTCAACTTGTCCCACTTAGATGGCAACCTGTCCGACCCATGCGGTCCGAACCGCACCGACCTGGGCGGGAGAGACAGCCTGTGCCCTCCGACCGGCAGTCCCTCCATGATCACGGCCATCACGATCATGGCCCTCTACTCCATCGTGTGCGTGGTGGGGCTCTTCGAAACTTCCTGGTCATGTATGTGATTGTCAGGTAAGGAAAGCGCCAGGGCTCCGAGCGGAGGGTTCAGCGGCTTAAG

**Εικόνα 8:** Θέσεις υβριδισμού των εκκινήτων (κίτρινο χρώμα) και θέση πολυμορφισμού (κόκκινο χρώμα).

#### 3.3 Απομόνωση DNA

Προκειμένου να ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία απομονώθηκε το DNA από δείγματα περιφερικού αίματος. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με το kit της εταιρείας Invitrogen (PureLink Genomic DNA kits) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αρχικά έγινε επεξεργασία των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, σε 200μl αίματος από κάθε δείγμα προστέθηκαν 20 μl πρωτεϊνάσης K και 20 μl RNAάσης A. Το δείγμα υποβλήθηκε σε vortex και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά. Κατόπιν προστέθηκαν 200 μl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer και ακολούθησε ανακίνηση με vortex και επώαση σε heat block στους 55° C για 30 λεπτά. Έπειτα προστέθηκαν 200 μl αιθανόλης 96-100% και το ομογενοποίημα μεταφέρθηκε σε στήλη. Μετά από φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 1 λεπτό απομακρύνθηκε ό,τι πέρασε κάτω από την στήλη και πραγματοποιήθηκε η έκπλυση της στήλης. Αρχικά, προστέθηκαν 500 μl Wash Buffer 1 και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 10.000 g για ένα λεπτό. Αφού απορρίφθηκε το υγρό που πέρασε από την στήλη προστέθηκαν 500 μl Wash Buffer 2 και έγινε ξανά φυγοκέντρηση σε 12.000 g για 3 λεπτά.

Το τελευταίο στάδιο αφορά στην έκλουση του DNA από την στήλη. Η στήλη μεταφέρθηκε σε collection tube των 1,5 ml και προστέθηκε το Elution Buffer. Ο όγκος του Elution Buffer που προστέθηκε σε κάθε δείγμα ήταν 50 μl και προστέθηκε διαδοχικά ανά 25 μl με ενδιάμεση φυγοκέντρηση σε 12.000 g για ένα λεπτό. Το DNA διατηρείται σε -20° C μέχρι τη μετέπειτα χρήση του. Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν ως προς την ποιότητα και ποσότητά τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

### **3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

Αντιδραστήρια

-Αγαρόζη

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: TAE 50X το οποίο αραιώνεται σε 1X πριν από τη χρήση (Σύσταση αρχικού stock: 242 g Tris-base, 57,1 ml οξικού οξέος και 100 ml EDTA 0,5 M με pH = 8 και ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 1 l).

- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε νερό συγκέντρωσης 10 mg/ml  
- Loading Buffer (διάλυμα φόρτωσης) 6X: 12,5 mg μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromofenol blue) (0.25%), 1,5 ml γλυκερόλη (30% w/v) και ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 5ml.

- Μάρτυρας: 1kb Plus DNA ladder (NEB)

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία τεχνική διαχωρισμού DNA και πρωτεϊνών που βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης το οποίο επιτρέπει το διαχωρισμό των μορίων ανάλογα με το μέγεθος τους.

## Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά παρασκευάζεται πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. Για την παρασκευή του πηκτώματος αναμείχθηκαν 0,6 gr αγαρόζης με 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE συγκέντρωσης 1X σε κωνική φιάλη και το μείγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Ακολούθως, το μείγμα ψύχθηκε υπό τρεχούμενο νερό, προστέθηκε το βρωμιούχο αιθίδιο και τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο με χτενάκια ώστε να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια για την φόρτωση των δειγμάτων. Αφού πολυμερίστηκε η αγαρόζη, βγήκαν τα χτενάκια και προστέθηκαν στα πηγαδάκια τα δείγματα παρουσία του loading buffer. Έπειτα το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης και εφαρμόστηκε ηλεκτρική τάση 100 V για το διαχωρισμό των δειγμάτων. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας τα μόρια DNA φθορίζουν λόγω του βρωμιούχου αιθιδίου το οποίο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στο DNA και γίνονται ορατά ως ζώνες.

Ανάλογα με το μέγεθος και την ένταση της ζώνης στο πήκτωμα είναι δυνατή η εκτίμηση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA που υπάρχει σε κάθε δείγμα. Μέσω αυτής της διαδικασίας αποφασίσαμε και την ποσότητα του δείγματος DNA που χρησιμοποιήθηκε στην PCR.

### 3.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

#### Αντιδραστήρια:

- 10X Buffer
- dNTPs
- Forward Primer ORPM1-F2
- Reverse Primer ORPM1-R2
- Taq Polymerase
- DNA

#### Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της PCR επιτρέπει την in vitro ενίσχυση ενός τμήματος DNA που ορίζεται από το ζεύγος των εκκινητικών μορίων που επιλέγονται. Μέσω της PCR επιτυγχάνεται η παραγωγή τεράστιου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η PCR πραγματοποιείται σε μια ειδική συσκευή που ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής και επιτρέπει την γρήγορη εναλλαγή θερμοκρασιών. Η αντίδραση χωρίζεται σε τρία επιμέρους στάδια. Το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται στους 94° C και περιλαμβάνει την αποδιάταξη της δίκλωνης έλικας του DNA. Κατά το δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται ο υβριδισμός των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται το στάδιο αυτό εξαρτάται από

το μήκος και την σύσταση των εκκινητών. Τέλος το τρίτο στάδιο είναι το στάδιο της επιμήκυνσης όπου η DNA πολυμεράση προσδένεται στους εκκινητές και προσθέτει διαδοχικά dNTPs στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την αλληλουχία-στόχο.

Τα στάδια αυτά επαναλαμβάνονται για συγκεκριμένο αριθμό κύκλων με σκοπό την εκθετική ενίσχυση του στόχου.

#### Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά για κάθε αντίδραση PCR προετοιμάζεται ένα Master Mix, το οποίο περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το DNA. Αυτό γίνεται ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων, δηλαδή πολλαπλασιάζοντας την ποσότητα κάθε αντιδραστήριου με τον αριθμό των αντιδράσεων και προσθέτοντας μια επιπλέον αντίδραση για τυχόν λάθος κατά το πιπετάρισμα. Το Master Mix μοιράζεται στα tubes και τέλος προστίθεται σε κάθε tube το αντίστοιχο δείγμα DNA.

Αξίζει να σημειωθεί ότι κάθε φορά χρησιμοποιείται και αρνητικός μάρτυρας όπου αντί για DNA προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα νερού για τον έλεγχο των επιμολύνσεων.

#### Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR

| Αντιδραστήρια                            | Ποσότητες (μl) | Τελικές συγκεντρώσεις         |
|------------------------------------------|----------------|-------------------------------|
| Buffer (10X + 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ) | 4              | 1X + 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> |
| dNTPs (10 mM)                            | 0,8            | 0,2 mM                        |
| ORPM1-F2 Forward Primer (10 pm/μl)       | 4              | 40 pm/40 μl                   |
| ORPM1-R2 Reverse Primer (10 pm/μl)       | 4              | 40 pm/40 μl                   |
| Kapa Taq DNA Polymerase (5 units/μl)     | 0,2            | 1 unit/μl                     |
| DNA Template                             | 1-10           |                               |
| ddH <sub>2</sub> O                       | 17-26          |                               |
| Τελικός όγκος                            | 40             |                               |

Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή και η PCR εκτελείται σύμφωνα με τις συνθήκες που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

#### Πίνακας 3: Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή για την PCR

| Στάδια                     | Συνθήκες         | Αριθμός κύκλων |
|----------------------------|------------------|----------------|
| Αρχική αποδιάταξη          | 94° C για 5 min  | 1              |
| Αποδιάταξη                 | 94° C για 30 sec | 35             |
| Υβριδισμός εκκινητών       | 60° C για 45 sec |                |
| Επιμήκυνση                 | 72° C για 45 sec |                |
| Επιμήκυνση ημιτελών κλώνων | 72° C για 10 min | 1              |



Τέλος, τα προϊόντα της PCR ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

### **3.6 Καθαρισμός προϊόντων PCR**

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το kit Nucleospin Gel and PCR clean up της εταιρείας Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά μετρήθηκε ο όγκος του προϊόντος PCR και προστέθηκε τόσος όγκος νερού ώστε να προκύψει τελικός όγκος 50 μl. Έπειτα προστέθηκε διπλάσια ποσότητα από το Buffer NTI (100 μl στην συγκεκριμένη περίπτωση) και ακολούθησε vortex. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε στήλη η οποία ήταν τοποθετημένη μέσα σε collection tube και φυγοκεντρήθηκε στις 11.000 g για 30 sec. Ακολούθως απορρίφθηκε το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη, προστέθηκαν 700 μl Buffer NT3 και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε ξανά για 30 sec σε 11.000 g. Αυτό το τελευταίο βήμα επαναλήφθηκε για άλλη μια φορά. Ακολούθησε άλλη μια φυγοκέντρηση στις 11.000 g για 30 sec χωρίς να προστεθεί τίποτα στο δείγμα.

Τέλος, η στήλη μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάκι συλλογής και πραγματοποιήθηκε η έκλουση από την στήλη με προσθήκη κατάλληλου όγκου από το διάλυμα έκλουσης. Ο όγκος που χρησιμοποιήθηκε για κάθε δείγμα ήταν 15-40 μl ανάλογα με την ένταση της ζώνης στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Αφού προστέθηκε το διάλυμα έκλουσης η στήλη επώαστηκε για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκε με σκοπό την συλλογή του καθαρισμένου προϊόντος.

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία του καθαρισμού 1μl από το καθαρισμένο προϊόν υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση μαζί με μάρτυρα μοριακού βάρους με σκοπό την ποσοτικοποίηση του δείγματος.

### **3.7 Αλληλούχιση**

Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Sanger στην εταιρεία CEMIA στην Λάρισα. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης απεικονίστηκαν με την μορφή χρωματογραφήματος και επεξεργάστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος BioEdit 7.2.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Δημογραφικά χαρακτηριστικά

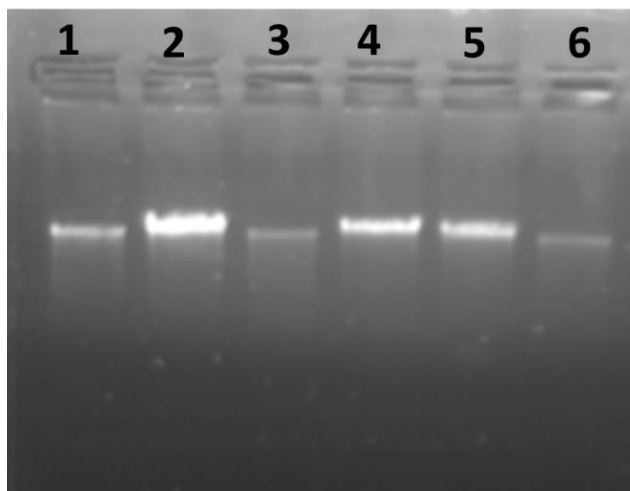
Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4:** Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη. SD: Τυπική απόκλιση (standard deviation).

| Δημογραφικά χαρακτηριστικά                            |                          | Ασθενείς υπό<br>μεθαδόνη<br>n (%) | Ασθενείς υπό<br>βουπρενορφίνη<br>n (%) |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|
| Φύλο                                                  | Γυναίκες                 | 6 (40,0)                          | 4 (19,0)                               |
|                                                       | Άνδρες                   | 9 (60,0)                          | 17 (81,0)                              |
| Εκπαιδευτικό<br>επίπεδο                               | Πρωτοβάθμια εκπαίδευση   | 4 (26,7)                          | 5 (23,8)                               |
|                                                       | Δευτεροβάθμια εκπαίδευση | 11 (73,3)                         | 16 (76,2)                              |
| Εθνικότητα                                            | Ελληνική                 | 14 (93,3)                         | 19 (90,5)                              |
|                                                       | Άλλη                     | 1 (6,7)                           | 2 (9,5)                                |
| Ασφάλεια                                              | Ναι                      | 9 (60,0)                          | 18 (85,7)                              |
|                                                       | Όχι                      | 6 (40,0)                          | 3 (14,3)                               |
| Κοινωνική<br>κατάσταση                                | Έγγαμη/ος                | 1 (6,7)                           | 10 (47,6)                              |
|                                                       | Άγαμη/ος                 | 9 (60)                            | 9 (42,8)                               |
|                                                       | Σε χηρεία                | 0 (0)                             | 1 (4,8)                                |
|                                                       | Διαζευγμένη/ος           | 5 (33,3)                          | 1 (4,8)                                |
| Επαγγελματική<br>κατάσταση                            | Πλήρης απασχόληση        | 1 (6,7)                           | 11 (52,4)                              |
|                                                       | Μερική απασχόληση        | 0 (0)                             | 1 (4,8)                                |
|                                                       | Άνεργη/ος                | 14 (93,3)                         | 9 (42,8)                               |
| Περιοχή<br>διαμονής                                   | Αστική                   | 15 (100,0)                        | 2 (100,0)                              |
|                                                       | Μη αστική                | 0 (0)                             | 0 (0)                                  |
| Χρόνια νόσος                                          | Σακχαρώδης διαβήτης      | 1 (6,7)                           | 3 (14,3)                               |
|                                                       | Νεοπλασματική νόσος      | 0 (0)                             | 3 (14,3)                               |
|                                                       | Καρδιαγγειακά νοσήματα   | 0 (0)                             | 1 (4,8)                                |
|                                                       | Αναπνευστική νόσος       | 1 (6,7)                           | 1 (4,8)                                |
|                                                       | Ψυχιατρικό νόσημα        | 7 (46,6)                          | 4 (19)                                 |
|                                                       | Καμία                    | 6 (40)                            | 9 (42,8)                               |
|                                                       |                          | Έτη (Μέσος όρος ± SD)             |                                        |
| Ηλικία                                                |                          | 47,6 ± 7,2                        | 46,9 ± 7,4                             |
| Χρόνια παρουσίας στον ΟΚΑΝΑ                           |                          | 13,9 ± 7,6                        | 8,7 ± 4,0                              |
| Ηλικία έναρξης χρήσης ουσιών                          |                          | 16,7 ± 4,2                        | 24,3 ± 7,1                             |
| Διάρκεια χρήσης ουσιών (πριν την εισαγωγή στον ΟΚΑΝΑ) |                          | 16,4 ± 10,1                       | 16,5 ± 8,8                             |

## 4.2 Απομόνωση DNA

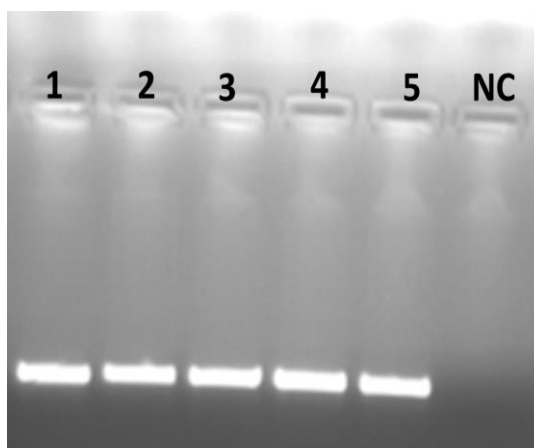
Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε με το kit NucleoSpin Tissue της εταιρείας Macherey-Nagel. Έπειτα ελέγχθηκε η ποιότητα του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 1%. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 9) παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης του DNA.



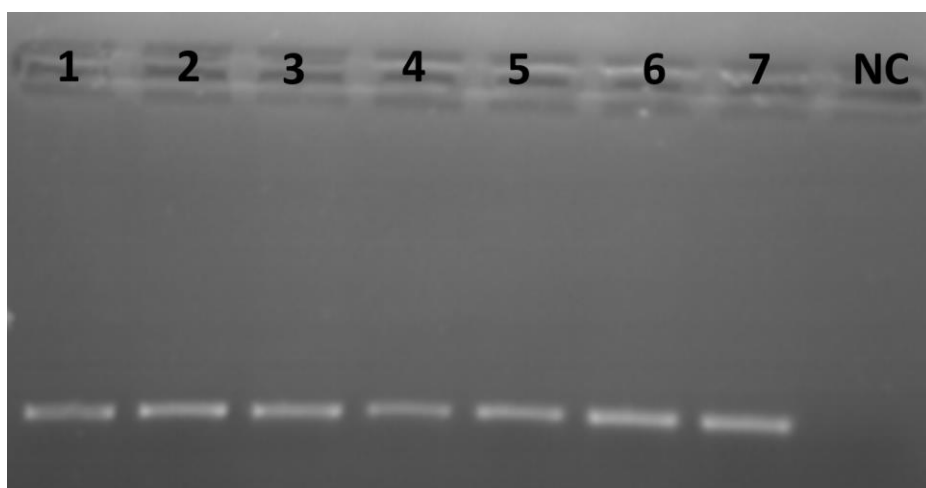
**Εικόνα 9:** Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA σε πήκτωμα αгарόζης. Κάθε διαδρομή περιλαμβάνει 1  $\mu$ l από τα DNA που απομονώθηκαν. Διαδρομή 1: Δείγμα S17, Διαδρομή 2: Δείγμα S19, Διαδρομή 3: Δείγμα S20, Διαδρομή 4: Δείγμα S25, Διαδρομή 5: Δείγμα S26, Διαδρομή 6: S28.

## 4.3 Ενίσχυση του γονιδίου ORPM1 με PCR

Αφού απομονώθηκε το DNA ενισχύθηκε με PCR το γονίδιο ORPM1 το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα των οπιοειδών και ειδικότερα ενισχύθηκε η περιοχή που περιέχει τον πολυμορφισμό rs1799971. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR ήταν οι ORPM1-F2 και ORPM1-R2 (Πίνακας 1), και το προϊόν της ενίσχυσης έχει μήκος 580 bp. Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Παρακάτω, στην Εικόνα 10 και 11, φαίνονται ενδεικτικά κάποια από τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR. Να σημειωθεί ότι η ζώνωση φανερώνει την επιτυχημένη ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος, ενώ η έλλειψη ζώνωσης στον αρνητικό μάρτυρα υποδηλώνει την απουσία επιμόλυνσης.



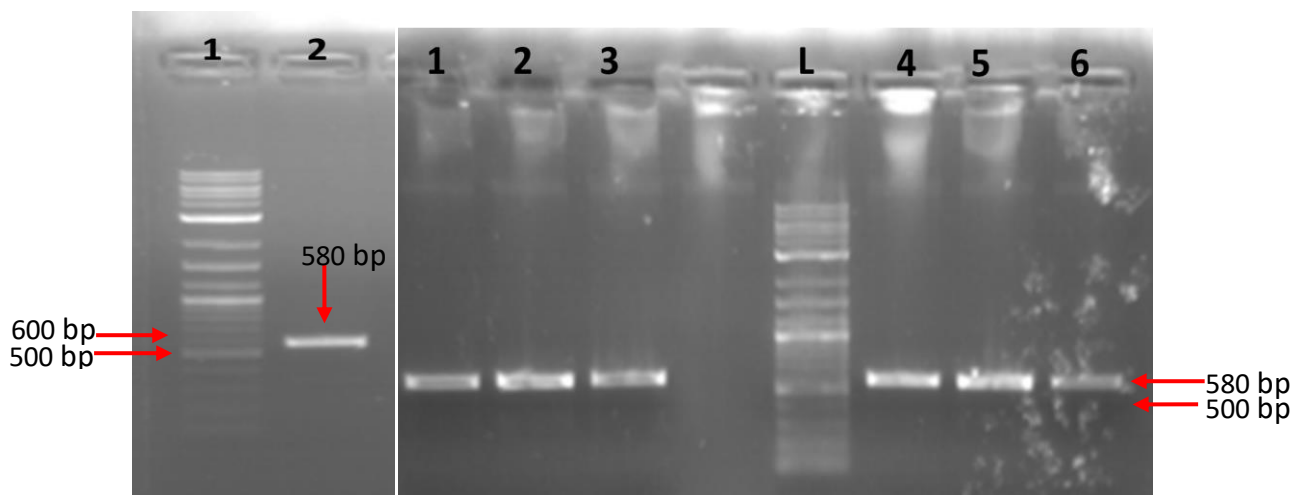
**Εικόνα 10:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR. Κάθε διαδρομή περιλαμβάνει 5 µl από την PCR. Διαδρομή 1: Δείγμα S27, Διαδρομή 2: Δείγμα S30, Διαδρομή 3: Δείγμα S34, Διαδρομή 4: Δείγμα S35, Διαδρομή 5: Δείγμα S36. NC: Αρνητικός Μάρτυρας (negative control).



**Εικόνα 11:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR. Κάθε διαδρομή περιλαμβάνει 5 µl από την PCR. Διαδρομή 1: Δείγμα S17, Διαδρομή 2: Δείγμα S19, Διαδρομή 3: Δείγμα S20, Διαδρομή 4: Δείγμα S25, Διαδρομή 5: Δείγμα S26, Διαδρομή 6: S28, Διαδρομή 7: S7. NC: Αρνητικός Μάρτυρας (negative control).

#### 4.4 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το kit Nucleospin Gel and PCR clean up της εταιρείας Macherey-Nagel και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με σκοπό να ελεγχθεί η καθαρότητα και να εκτιμηθεί η ποσότητα (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12:** Αποτελέσματα έπειτα από τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR. Αριστερά: Διαδρομή 1: Μάρτυρας μοριακών βαρών 1kb plus DNA Ladder, Διαδρομή 2: Δείγμα C7. Δεξιά: Διαδρομή 1: Δείγμα S17, Διαδρομή 2: Δείγμα S19, Διαδρομή 3: Δείγμα S20, L: Μάρτυρας μοριακών βαρών 1kb plus DNA Ladder, Διαδρομή 4: Δείγμα S25, Διαδρομή 5: Δείγμα S26, Διαδρομή 6: S28.

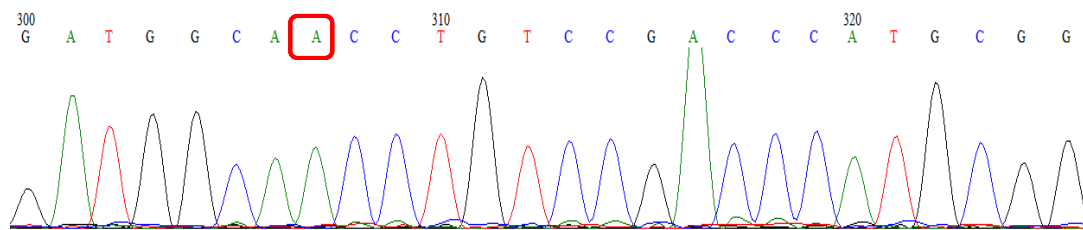
#### 4.5 Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των προϊόντων της PCR παρουσιάζονται με την μορφή χρωματογραφήματος (Εικόνες 13-15). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η ενίσχυση αφορά το γονίδιο ORPM1 που περιέχει τον πολυμορφισμό rs1799971. Ανάμεσα στα δείγματα βρέθηκαν άτομα τόσο ομόζυγα για το συχνό αλληλόμορφο (AA) όσο και ετερόζυγα (AG), ενώ βρέθηκε και ένα άτομο ομόζυγο για το σπάνιο αλληλόμορφο. Πιο συγκεκριμένα, η γονοτύπηση των δειγμάτων φαίνεται στον Πίνακα 4.

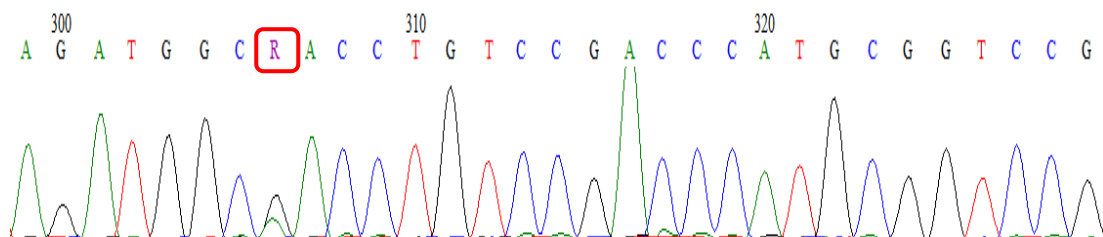
**Πίνακας 4:** Γονότυποι δειγμάτων

| ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ | ΔΕΙΓΜΑΤΑ                                                                                                     |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AA        | S1, S3, S5, S7, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S16, S17, S18, S19, S22, S23, S24, S25, S29, S31, S33, S35, S36 |
| AG        | S2, S4, S6, S8, S15, S21, S26, S27, S28, S30, S32, S34                                                       |
| GG        | S20                                                                                                          |

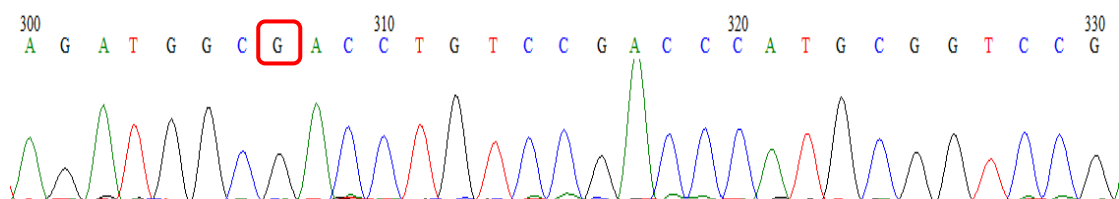
Συνολικά βρέθηκαν 23 άτομα ομόζυγα για το συχνό αλληλόμορφο (AA), 12 άτομα ετερόζυγα (AG), και 1 άτομο ομόζυγο για το σπάνιο αλληλόμορφο (GG). Παρακάτω παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα χρωματογράφημα για τον κάθε γονότυπο.



**Εικόνα 13:** Χρωματογράφημα που αφορά το δείγμα S5, το οποίο είναι ομόζυγο για το συχνό αλληλόμορφο (AA). Η θέση του πολυμορφισμού επισημαίνεται με κόκκινο τετράγωνο.



**Εικόνα 14:** Χρωματογράφημα που αφορά το δείγμα S8, το οποίο είναι ετερόζυγο (AG). Η θέση του πολυμορφισμού επισημαίνεται με κόκκινο τετράγωνο.



**Εικόνα 15:** Χρωματογράφημα που αφορά το δείγμα S20, το οποίο είναι ομόζυγο για το σπάνιο αλληλόμορφο (GG). Η θέση του πολυμορφισμού επισημαίνεται με κόκκινο τετράγωνο.

#### 4.6 Σύνδεση του γονότυπου με τη θεραπεία υποκατάστασης

Στον πίνακα 5 αναγράφεται η θεραπεία υποκατάστασης των ασθενών σε σχέση με τον γονότυπο (αλληλόμορφα AA, AG και GG). Συγκεκριμένα, 13 από τους 23 ασθενείς με γονότυπο AA και 7 από τους 12 ασθενείς με γονότυπο AG βρίσκονται υπό θεραπεία υποκατάστασης με βουπρενορφίνη. Στην ίδια θεραπεία υποκατάστασης βρίσκεται και ο ασθενής με γονότυπο GG. Οι υπόλοιποι ασθενείς βρίσκονται υπό θεραπεία υποκατάστασης με μεθαδόνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας σημαντικός παράγοντας για την επιλογή του φαρμάκου (μεθαδόνη ή βουπρενορφίνη), πέρα από την ψυχολογική/ψυχιατρική εκτίμηση, είναι η εμπειρία των ίδιων των ασθενών από την επαφή τους με αυτό πριν εισέρθουν στις δομές του ΟΚΑΝΑ.

**Πίνακας 5:** Η σύνδεση του γονότυπου των ασθενών με τη θεραπεία υποκατάστασης.

| ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ | Θεραπεία Υποκατάστασης                              |
|-----------|-----------------------------------------------------|
| AA (n=23) | Μεθαδόνη: 10 Ασθενείς<br>Βουπρενορφίνη: 13 Ασθενείς |
| AG (n=12) | Μεθαδόνη: 5 Ασθενείς<br>Βουπρενορφίνη: 7 Ασθενείς   |
| GG (n=1)  | Βουπρενορφίνη                                       |

#### 4.7 Σύνδεση του γονότυπου με την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών

Στον Πίνακα 6 αναγράφεται ο γονότυπος (αλληλόμορφα AA, AG και GG) σε σχέση με τα δεδομένα για την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών (craving). Το ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της επιθυμίας χρήσης οπιοειδών είναι το διεθνώς αποδεκτό και σταθμισμένο στην ελληνική γλώσσα heroin craving questionnaire (HCQ) (Leventelis et al. 2020). Το HCQ αποτελείται από πέντε διαστάσεις, και συγκεκριμένα την επιθυμία χρήσης ηρωίνης, την πρόθεση χρήσης ηρωίνης, την προσδοκία για μία θετική απόκριση, την ανακούφιση από την απόσυρση ή τη δυσφορία και την έλλειψη ελέγχου υπερβολικής χρήσης. Η επιθυμία υπολογίζεται μέσω της κλίμακας Likert 7 βαθμών που κυμαίνεται από το 1 (διαφωνώ έντονα) έως το 7 (συμφωνώ απόλυτα). Με βάση τα αποτελέσματα, όσο μικρότερη είναι η τιμή, τόσο μικρότερη είναι η επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση (TTEST) που πραγματοποιήθηκε, δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στην επιθυμία χρήσης οπιοειδών μεταξύ των γονότυπων AA και AG.

**Πίνακας 6:** Η σύνδεση του γονότυπου των ασθενών με την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών.

| ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ | Επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών (craving)<br>Μέσος όρος $\pm$ Τυπική απόκλιση |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|
| AA (n=23) | 18,6 $\pm$ 3,9                                                                  |
| AG (n=12) | 19,0 $\pm$ 3,5                                                                  |
| GG (n=1)  | 19,0                                                                            |

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δεν υπάρχει ξεκάθαρη επίδραση του πολυμορφισμού rs1799971 στην εξάρτηση από οπιοειδή. Υπάρχουν μελέτες οι οποίες συσχετίζουν το G αλληλόμορφο με ανάγκη για μέγιστη δόση μεθαδόνης (Hung 2011), όμως η μελέτη του πολυμορφισμού αξιολογείται σε συνδυασμό με τη μελέτη και άλλων παραγόντων και αφορά κινεζικό πληθυσμό. Επομένως, σε καμία περίπτωση δεν μπορεί να υπάρξει κάποιο γενικευμένο συμπέρασμα. Κάποιες άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει ξεκάθαρη σύνδεση του πολυμορφισμού με την απόκριση στη θεραπεία, αλλά ο πολυμορφισμός δρα συνεργιστικά με άλλους φαρμακοδυναμικούς ή φαρμακοκινητικούς παράγοντες (Barratt 2012, Crettol 2008). Εν αντιθέσει, σύμφωνα με μία μετανάλυση, βρέθηκε σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με την εξάρτηση από οπιοειδή σε Ασιατικούς πληθυσμούς, ενώ σε Αφρικανούς ή Καυκάσιους δεν υπάρχει αυτή η συσχέτιση (Haerian 2013). Πιο συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο G είναι περισσότερο συχνό σε Ασιατικούς πληθυσμούς από ό,τι σε Αφρικανούς ή Καυκάσιους και η παρουσία του φαίνεται να ευθύνεται για την αυξημένη ευαισθησία που παρουσιάζουν οι πληθυσμοί αυτοί στην εξάρτηση από οπιοειδή (Haerian 2013).

#### **4.8 Σύνδεση του γονότυπου με την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών με βάση τη θεραπεία υποκατάστασης**

Στον Πίνακα 7 αναγράφεται ο γονότυπος (αλληλόμορφα AA, AG και GG) σε σχέση με τα δεδομένα για την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών, αναφορικά με τη θεραπεία υποκατάστασης των ασθενών. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση (TTEST) που πραγματοποιήθηκε, δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στην επιθυμία χρήσης οπιοειδών μεταξύ των γονότυπων AA και AG, σε σχέση με το φάρμακο (μεθαδόνη ή βουπρενορφίνη).

**Πίνακας 7:** Η σύνδεση του γονότυπου των ασθενών με την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών με βάση τη θεραπεία υποκατάστασης.

| ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ | Επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών (craving) με βάση τη θεραπεία υποκατάστασης<br>Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AA (n=23) | Μεθαδόνη: 22,4 ± 1,9<br>Βουπρενορφίνη: 15,6 ± 1,9                                                             |
| AG (n=12) | Μεθαδόνη: 22,4 ± 1,6<br>Βουπρενορφίνη: 16,6 ± 2,3                                                             |
| GG (n=1)  | Βουπρενορφίνη: 19,0                                                                                           |



#### 4.9 Σύνδεση του αλληλόμορφου με την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών με βάση τη θεραπεία υποκατάστασης

Στον Πίνακα 8 αναγράφονται τα αλληλόμορφα (A ή G) σε σχέση με τα δεδομένα για την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών, αναφορικά με τη θεραπεία υποκατάστασης των ασθενών. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση (Mann Whitney U test,  $p=0,112$ ) που πραγματοποιήθηκε, δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στην επιθυμία χρήσης οπιοειδών μεταξύ των αλληλόμορφων A και G, σε σχέση με το φάρμακο (μεθαδόνη ή βουπρενορφίνη). Ποιοτικά, ωστόσο, παρατηρείται ότι η επιθυμία χρήσης οπιοειδών φαίνεται να είναι πιο χαμηλή σε ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο A και λαμβάνουν την βουπρενορφίνη ως θεραπεία (τιμή: 15,8) σε σχέση με τους ασθενείς που λαμβάνουν μεθαδόνη (τιμή: 17,1). Παρότι, αυτό το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, αξίζει να αναφερθεί ότι είναι ένα εύρημα που αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω.

**Πίνακας 8:** Η σύνδεση του γονοτύπου των ασθενών με την επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών με βάση τη θεραπεία υποκατάστασης.

| ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ | Επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών (craving) με βάση τη θεραπεία υποκατάστασης<br>Μέσος όρος $\pm$ Τυπική απόκλιση |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A           | Μεθαδόνη: $22,4 \pm 1,8$<br>Βουπρενορφίνη: $15,8 \pm 1,9$                                                         |
| G           | Μεθαδόνη: $22,4 \pm 1,6$<br>Βουπρενορφίνη: $17,1 \pm 2,1$                                                         |

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη είναι μία μελέτη σειράς περιπτώσεων (case series), όπου συμμετείχε ένας μικρός αριθμός ασθενών εξαρτημένων από οπιοειδή που βρίσκονται σε θεραπεία υποκατάστασης με μεθαδόνη και βουπρενορφίνη στις δομές του ΟΚΑΝΑ. Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη του πιθανού ρόλου του γονοτύπου κάθε ασθενούς όσον αφορά ένα συγκεκριμένο πολυμορφισμό που απαντάται στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των οπιοειδών στην επιλογή του φαρμάκου για τη διαδικασία της απεξάρτησής τους καθώς και στην επιθυμία εκ νέου χρήσης οπιοειδών. Από τα δεδομένα της μελέτης αυτής φαίνεται ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν δίνει ξεκάθαρα αποτελέσματα, δεδομένου βέβαια και του μικρού αριθμού του δείγματος. Σημειώνεται ότι η εύρεση μεγάλου αριθμού ασθενών που βρίσκονται στη διαδικασία απεξάρτησης από οπιοειδή είναι μία πολύ δύσκολη διαδικασία. Τέλος, η μελέτη αυτή, όπως κάνει κάθε μελέτη σειράς περιπτώσεων εξ ορισμού, προσφέρει προκαταρκτικά δεδομένα ώστε να προχωρήσει αναλόγως η έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο, καθώς τα δεδομένα στον Ευρωπαϊκό είναι ελάχιστα και αντικρουόμενα ενώ στον Ελληνικό πληθυσμό ανύπαρκτα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahmad T, Valentovic MA, Rankin GO. Effects of cytochrome P450 single nucleotide polymorphisms on methadone metabolism and pharmacodynamics. *Biochem Pharmacol*. 2018;153:196-204.
2. Al-Mazroa A.A., Abdel Halim R.E. (1989). Anesthesia 1000 years ago, Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series. 134:46-47.
3. Amitava Dasgupta. Fighting the Opioid Epidemic. Prescription Opioids: An Overview. Elsevier. 2020; 2:17-41.
4. Baraka A. (2000). Historical aspects of opium. *Middle East J Anesthesiol*. 15:423-436.
5. Barry U., Zuo Z. (2005). Opioids: old drugs for potential new applications. *Curr Pharm Des*. 11(10):1343-50.
6. Bart G. Maintenance medication for opiate addiction: The foundation of recovery. *J. Addict. Dis*. 2012;31(3):207-225.
7. Bauer IE, Soares JC, Nielsen DA. The role of opioidergic genes in the treatment outcome of drug addiction pharmacotherapy: a systematic review. *Am J Addict*. 2015;24:15-23.
8. Bond C, LaForge KS, Tian M, et al. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9608–9613. doi:10.1073/pnas.95.16.9608.
9. Bond C, LaForge KS, Tian M, et al. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9608-9613.
10. Booth M. (1998). *Opium - a History*, New York, St Martin's Griffin.
11. Brownstein J. M. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 90:5391-5393.
12. Cami J. & Farre M. (2003). Drug addiction. *N Engl J Med*. 349:975–986.
13. Chhabra Shalini, Janet Bull. Methadone. *American Journal of Hospice & Palliative Medicine*. 2008;25(2):146-150.
14. Chiang C.N. & Hawks R.L. Pharmacokinetics of the combination tablet of buprenorphine and naloxone. *Drug Alcohol Depend*. 2003;70(2 Suppl): S39-S47.
15. De Vos JW, Geerlings PJ, Van Den Brink W, Ufkes JG, Van Wilgenburg H. Pharmacokinetics of methadone and its primary metabolite in 20 opiate addicts. *Eur J Clin Pharmacol*. 1995;48(5):361-366.
16. De Castro J., Aguirre C., Rodriguez-Sasiain JM, Gomez E., Garrido MJ, Calvo R. The effect of changes in gastric pH induced by omeprazole on the absorption and respiratory depression of methadone. *Biopharm Drug Dispos*. 1996; 17(7):551-563.
17. Dennis BB, Bawor M, Thabane L, Sohani Z, Samaan Z. Impact of ABCB1 and CYP2B6 genetic polymorphisms on methadone metabolism, dose and treatment response in patients with opioid addiction: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2014;9:e86114.

18. Duarte F. D. (2005). Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. *Opium and Opioids: A Brief History*. *Rev Bras Anesthesiol*. 55(1): 135-146.
19. Eap CB, Buclin T., Baumann P. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41:1153-93.
20. EMCDDA (European Drug Report) (2015a). Trends and Developments. Available online at: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/edr/trendsdevelopments/2015> (Accessed November 14, 2015).
21. EMCDDA (New psychoactive substances in Europe) (2015b). An Update from the EU Early Warning System. Available online at: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/2015/new-psychoactive-substances> (Accessed December 14, 2015).
22. Feng Y., He X., Yang Y., Chao D., Lazarus H.L., Xia Y. (2012). Current Research on Opioid Receptor Function *Curr Drug Targets*. 13(2): 230-246.
23. Ferrari A., Coccia C.P., Bertolini A., Sternieri E. (2004). Methadone - metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Res*. 50:551–559.
24. Fonseca F., Torrens M. Pharmacogenetics of Methadone Response. *Mol Diagn Ther* (2018);22:57-78.
25. Goldman D, Oroszi G, Ducci F. The genetics of addictions: uncovering the genes. *Nat Rev Genet*. 2005;6:521–532. doi:10.1038/nrg1635.
26. Haerian BS, Haerian MS. OPRM1 rs1799971 polymorphism and opioid dependence: evidence from a meta-analysis. *Pharmacogenomics*. 2013;14:813-824.
27. Hamilton G.R., Baskett T.F. (2000). In the arms of Morpheus the development of morphine for postoperative pain relief. *Can J Anaesth*. 47:367-374.
28. Harvey R. & Champe P. (1995). *Φαρμακολογία. Επιστημονικές εκδόσεις Μ. Παρισιάνου*. Αθήνα, Ελλάδα.
29. Harvey R. & Champe P. (1995). *Φαρμακολογία. Επιστημονικές εκδόσεις Μ. Παρισιάνου*. Αθήνα, Ελλάδα.
30. Ikeda K, Ide S, Han W, Hayashida M, Uhl GR, Sora I. How individual sensitivity to opiates can be predicted by gene analyses. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26:311–317. doi:10.1016/j.tips.2005.04.001.
31. Janssen P.A. (1982). Potent new analgesics tailor-made for different purposes. *Acta Anaesthesiol Scand*. 26:262-268.
32. Julien R. M. (1998). Opioid analgesics. A primer of drug action: A concise, nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs (pp. 282–318). New York, NY: WH Freeman & Co.
33. Kasai S, Ikeda K. Pharmacogenomics of the human  $\mu$ -opioid receptor. *Pharmacogenomics* 12, 2011; 1305–1320.
34. Kreek M.J., Borg L., Ducat E., Ray B. (2010). Pharmacotherapy in the Treatment of Addiction: Methadone. *J Addict Dis*. 29(2):200-216.
35. Kritikos P.G. (1968). The history of opium in antiquity. *J Am Pharm Assoc*. 8:446-447.

36. Kritikos P.G., Papadaki S.P. (1967). The history of poppy and opium and their expansion in antiquity in the Eastern Mediterranean Area. *Bull. Narcotics*. 19:5-10.
37. Kudla L., & Przewlocki R. (2021). Influence of G protein-biased agonists of  $\mu$ -opioid receptor on addiction-related behaviors. *Pharmacological Reports*, 73(4), 1033–1051. doi:10.1007/s43440-021-00251-1
38. LaForge KS, Yuferov V, Kreek MJ. Opioid receptor and peptide gene polymorphisms: potential implications for addictions. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 410, 249–268.
39. Law P.Y., Loh H.H. (1999). Regulation of Opioid Receptor Activities. *J Pharmacol Exp Ther.* 289(2): 607-24.
40. Leventelis C, Goutzourelas N, Kortsinidou A, Spanidis Y, Toulia G, Kampitsi A, Tsitsimpikou C, Stagos D, Veskoukis AS, Kouretas D. Buprenorphine and Methadone as Opioid Maintenance Treatments for Heroin-Addicted Patients Induce Oxidative Stress in Blood. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Apr 9;2019:9417048. doi: 10.1155/2019/9417048.
41. Leventelis C, Veskoukis SA, Malliori M, Koutsilieris M, Zyga S, et al. (2020) Validation of Heroin Craving Questionnaire in Greek Patients under Substitution Treatment with Methadone and Buprenorphine: How to Prevent a Relapse. *J Addict Behav Ther Rehabil* 9:1. doi: 10.37532/jabtr.2020.9(1).189.
42. Leventelis C, Veskoukis SA, Malliori M, Koutsilieris M, Zyga S, Rojas Gil AP, Tzavella F, Georgouloupoulou F, Koutsopoulou E, Kampitsi A, et al. Validation of heroin craving questionnaire in Greek patients under substitution treatment with methadone and buprenorphine: How to prevent a relapse. *J Addict Behav Ther Rehabil.* 2020;9:1. doi:10.37532/jabtr.2020.9(1).189.
43. Leventelis, Ch. (2018). Measurement of Oxidative Stress Indices in the Blood of Drug Addicts, Postgraduate Thesis in Toxicology, University of Thessaly School of Health Sciences Department of Biochemistry and Biotechnology.
44. Li Y, Kantelip JP, Gerritsen-van Schieveen P, Davani S. Interindividual variability of methadone response: impact of genetic polymorphism. *Mol Diagn Ther.* 2008;12:109-24.
45. Lugo R.A., Satterfield K.L., Kern S.E. (2005). Pharmacokinetics of methadone. *J Pain Palliat Care Pharmacother.* 19:13-24.
46. Macht D.I. (1915). The history of opium and some of its preparation and alkaloids. *JAMA.* 64:477-461.
47. Mague SD, Isiegas C, Huang P, Liu-Chen LY, Lerman C, Blendy JA. Mouse model of *OPRM1* (A118G) polymorphism has sex-specific effects on drug-mediated behavior. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2009; 106(26), 10847–10852.
48. Martin W.R. (1983). Pharmacology of opioids. *Pharmacol Ver.* 35:283-303.
49. Meini M., Moncini M., Daini L., Giarratana T., Scaramelli D., Chericoni S et al. Relationship between plasma concentrations of the l-enantiomer of methadone and response to methadone maintenance treatment. *Eur J Pharmacol.* 2015;760:1-6.

50. Murphree H.B. (1969). Analgésicos Narcóticos: Analgésicos Sintéticos, em: DiPalma JR, Drill-Farmacologia Médica, México, La Prensa Médica Mexicana.
51. Oertel BG, Doehring A, Roskam B *et al.* Genetic-epigenetic interaction modulates  $\mu$ -opioid receptor regulation. *Hum. Mol. Genet.* 2012; 21, 4751–4760.
52. Pasternak G.W. (2004). Multiple opiate receptors: *dijū* vu all over again. *Neuropharmacology*. 47(Suppl 1):312-23.
53. Rostami-Hodjegan A, Wolff K, Hay AW, Raistrick D, Calvert R, Tucker GT. Population pharmacokinetics of methadone in opiate users: characterization of time-dependent changes. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48(1):43-52.
54. Saxon A.J., Ling W., Hillhouse M., *et al.* Buprenorphine/naloxone and methadone effects on laboratory indices of liver health: a randomized trial. *Drug Alcohol Depend.* 2013; 128:71-6.
55. Shi J, Hui L, Xu Y, Wang F, Huang W, Hu G. Sequence variations in the mu-opioid receptor gene (OPRM1) associated with human addiction to heroin. *Hum Mutat.* 2002;19:459–460. doi:10.1002/humu.9026.
56. Simonin F., Befort K., Gaveriaux-Ruff C., *et al.* (1994). The human delta-opioid receptor: Genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol Pharmacol*. 46(6):1015-1021.
57. Somogyi AA, Barratt DT, Ali RL, Collier JK. Pharmacogenomics of methadone maintenance treatment. *Pharmacogenomics*. 2014; 15:1007-27.
58. Somogyi AA, Barratt DT, Ali RL, Collier JK. Pharmacogenomics of methadone maintenance treatment. *Pharmacogenomics*. 2014;15:1007-1027.
59. Stein Christoph. Opioid Receptors. *Annu Rev Med.* 2016;67:433-51. doi: 10.1146/annurev-med-062613-093100. Epub 2015 Aug 26.
60. Stephanie Carmack, Leandro Vendruscolo *et al.* Corticosteroid sensitization drives opioid addiction. *NIH. Molecular Psychiatry* 2022 May;27(5):2492-2501..
61. Strain, E. C. Pharmacology of buprenorphine. In E. C. Strain & M. L. Stitzer (Eds.). *The treatment of opioid dependence*. 2006 (pp. 213-229). Baltimore: Johns Hopkins Press.
62. Taqi MM, Faisal M, Zaman H. OPRM1 A118G polymorphisms and its role in opioid addiction: implication on severity and treatment approaches. *Pharmacogenomics Pers Med.* 2019;12:361-368.
63. Thomas Kyle Harrison, MD, Howard Kornfeld, MD, Anuj Kailash Aggarwal, MD, Anna Lembke, MD. Perioperative Considerations for the Patient with Opioid Use Disorder on Buprenorphine, Methadone, or Naltrexone Maintenance Therapy. *Anesthesiology Clin.* 2018; 1932-2275/18.
64. UNGASS. (1998). Declaration on the Guiding Principles of Drug Demand Reduction. A/RES/s-20/3.
65. Wang YJ, Huang P, Ung A *et al.* Reduced expression of the  $\mu$  opioid receptor in some, but not all, brain regions in mice with OPRM1 A112G. *Neuroscience* 2012; 205, 178–184.
66. Wittert G., Hope P., Pyle D. (1996). Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 218(3):877-81.

67. Wright D.A. (1968). The history of opium. *Med Biol Illus.* 18:62-70.
68. Xie Xiaohu, Jun GY Dingding Zhuang, Yun Zhou et al. Association between rs1799971 in the mu opioid receptor gene and methadone maintenance treatment response. *J Clin Lab Anal.* 2022; 36e24750.
69. Yaksh T. (1989). Opioid receptors and endorphins. Annual Refresher Course lectures. 134:1-7.
70. Yuferov V, Levran O, Proudnikov D *et al.* Search for genetic markers and functional variants involved in the development of opiate and cocaine addiction and treatment. *Ann. NY Acad. Sci.* 2010; 1187, 184–207.
71. Λιάππας Γ. (1992). Ναρκωτικά. Εθιστικές ουσίες, προβλήματα, αντιμετώπιση. Εκδόσεις Πατάκη: Αθήνα.
72. Μαρσέλλος Μ. (1997). Εξαρτησιογόνες ουσίες. Φαρμακολογία-Τοξικομανία-Ιστορία-Κοινωνιολογία-Νομοθεσία. Τυπωθήτω, Αθήνα.
73. Chin-Chuan Hung, Mu-Han Chiou, Bo-Hau Huang, Yow-Wen Hsieh, Tsung-Jen Hsieh, Chieh-Liang Huang, Hsien-Yuan Lane. Impact of genetic polymorphisms in ABCB1, CYP2B6, OPRM1, ANKK1 and DRD2 genes on methadone therapy in Han Chinese patients. *Pharmacogenomics.* 2011 Nov;12(11):1525-33. doi: 10.2217/pgs.11.96. Epub 2011 Sep 8.
74. Barratt DT, Collier JK, Hallinan R, Byrne A, White JM, Foster DJR, et al. ABCB1 haplotype and OPRM1 118A[G genotype interaction in methadone maintenance treatment pharmacogenetics. *Pharmacogenomics.* 2012;5:53–62.
75. Crettol S, Besson J, Croquette-Krokar M, Hammig R, Gothuey I, Monnat M, et al. Association of dopamine and opioid receptor genetic polymorphisms with response to methadone maintenance treatment. *Prog Neuropsychopharmacol.* 2008;32:1722–7.